



Prof. dr hab. Janusz Maszewski
Katedra Cytofizjologii
Instytut Biologii Eksperymentalnej

Łódź, 1 czerwca 2019 r.

Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
Tel.: 48-42-6354512, M: (48) 601 876 272
E-mail: janusz.maszewski@biol.uni.lodz.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Romana Maślanki

„Wpływ glukozy i jej metabolizmu na stan fizjologiczny, potencjał reprodukcyjny i długość życia komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”

Zaproszenie do napisania recenzji rozprawy doktorskiej mgr. Romana Maślanki, za które jestem wdzięczny Wysokiej Radzie Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego, przedłuża mój dyskretny związek z niezwykle ciekawym modelem, jakim są komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Zainicjowała go prof. dr hab. Renata Zadrag-Tęcza, promotorka rozprawy mgra Romana Maślanki, przede wszystkim jednak kontynuatorka naukowej pasji profesora Tomasza Bilińskiego – współtwórcy zamojskiego Instytutu Nauk Rolniczych, wieloletniego kierownika Katedry Biochemii i Biologii Komórki na Wydziale Biologiczno-Rolniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego, wybitnego badacza reakcji wolnorodnikowych oraz wpływu tlenu na procesy starzenia się. Podczas mojej ostatniej rozmowy z Profesorem, jaką miałem przyjemność prowadzić w Rzeszowie w 2014 r., jednym z kilku poruszanych tematów była naturalna cecha ludzkiego umysłu – jego inklinacja do klasyfikowania i kwantyfikowania rzeczy, zdarzeń i zjawisk. Jak wspólnie uznaliśmy, skłonność biologa do hierarchizowania poszczególnych struktur komórkowych, szlaków metabolicznych, wartościowania procesów i znaczenia ich elementarnych składników molekularnych nie jest uzasadniona naukowo, ponieważ są one wzajemnie ze sobą sprzężone i we wciąż niepojęty dla nas sposób zintegrowane na poziomie fizjologii żywego organizmu. Ulegając jednak pokusie racjonalizowania owej słabości w odniesieniu do glukozy, za miarę jej biologicznego znaczenia należałoby przyjąć wielość warunkowanych

przez nią procesów, kluczową rolę we wzroście, reprodukcji, starzeniu się, udział w organizacji zdarzeń zachodzących w cyklu komórkowym, lub choćby tylko liczbę białek zaangażowanych w jej przemianach metabolicznych. Wszystko to jest jednak powodem skomplikowania problemów związanych z oceną roli, jaką glukoza odgrywa w utrzymywaniu prawidłowego stanu fizjologicznego komórek i stabilności ich wewnętrznego środowiska, a równocześnie miarą trudności związanych z badaniami nad skutkami jej zróżnicowanej podaży i wykorzystania. Jak wykazał w swoich pracach mgr Roman Maślanka, kłopot z glukozą polega także na tym, że zmiany jej stężenia prowadzące do restrykcji lub nadmiaru kalorii, nie pozwalają na łatwe i jednoznaczne przewidywanie ich konsekwencji.

Zbiór 4 współautorskich publikacji naukowych mgr Romana Maślanki, które składają się na Jego rozprawę doktorską obejmuje: 1 rozdział w opracowaniu monograficznym i 3 artykuły opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, rejestrowanych przez JCR: *FEMS Yeast Research*, *Journal of Microbiological Methods* i *Journal of Cellular Physiology*. Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich artykułów, a w pracy o charakterze przeglądowym i 2 pracach eksperymentalnych jest także autorem korespondującym. Ich sumaryczny *Impact Factor* wyliczony wg roku opublikowania wynosi 8,233, co odpowiada liczbie 95 punktów MNiSW. Załączone do rozprawy szczegółowe oświadczenia współautorów wyraźnie wskazują na istotny wkład pracy dr Romana Maślanki w formułowaniu koncepcji pracy doktorskiej, kształtowaniu linii badawczej, realizacji zadań eksperymentalnych, dokumentacji wyników i opracowaniu publikacji.

Polskojęzyczny artykuł wydany przez krakowskie *CREATIVETIME*, jest doskonale napisanym, zwięzłym przeglądem badań nad rolą glukozy jako substratu o kluczowym znaczeniu nie tylko ze względu na zaopatrzenie energetyczne komórki (poprzez wytwarzanie ATP na drodze fermentacji lub oddychania tlenowego), ale także jako związku, który dzięki szlakowi pentozofosforanowemu, dostarcza węglowe szkielety wykorzystywane w biosyntezie nukleotydów, aminokwasów, lipidów, kofaktorów reakcji enzymatycznych, a także w utrzymywaniu odpowiednio wysokiej puli zredukowanego glutationu. Niemniej istotną częścią tego opracowania są podrozdziały opisujące rolę mechanizmów kontrolujących wewnątrzkomórkowy poziom glukozy i konsekwencje zaburzeń jej homeostazy, będące podłożem rozwoju chorób metabolicznych.

Głównym celem badań mgr Romana Maślanki była weryfikacja hipotezy, zgodnie z którą różne stężenia glukozy, poprzez wpływ modyfikujący procesy metaboliczne *Saccharomyces cerevisiae*, zmieniają potencjał reprodukcyjny komórek i długość ich życia. Zamierzeniem towarzyszącym podstawowym zadaniom eksperymentalnym była próba

wykazania, że wysoki poziom glukozy – odpowiednik warunków nadmiaru kalorii – to czynnik o działaniu negatywnym, zaburzający biologiczne funkcje komórek drożdży. Wyniki przeprowadzonych przez Doktoranta eksperymentów i ich krytyczne analizy stanowią treść artykułów o istotnym znaczeniu poznawczym nie tylko w odniesieniu do biologii względnie prostych, jednokomórkowych organizmów eukariotycznych. Przy uwzględnieniu mnogości dodatkowych uwarunkowań wynikających ze złożonej organizacji wyższych eukariontów, rezultatem badań mgr Romana Maślanki jest także platforma dla wieloaspektowej dyskusji o charakterze ogólnobiologicznym, doszukująca się elementów uniwersalnych i wspólnych z obszarem fizjologii i patogenezy chorób człowieka. Ten kontekst wyjaśnia więc i w pełni usprawiedliwia nacisk, jaki przy interpretacyjnej własnych badań i wyników obserwacji innych autorów, Doktorant przykładła do kwestii przyczynowo-skutkowych związków między stanem utrzymującego się wysokiego stężenia glukozy a zaburzeniami funkcji komórek. Wysoka ranga czasopism, w których mgr Maślanka opublikował wyniki swoich badań, a także tematyczna homogenność zrecenzowanych przez specjalistów artykułów wchodzących w skład Jego rozprawy doktorskiej sprawiła, że omawianie poszczególnych artykułów uznałem za przedsięwzięcie zbędne.

Pomocą w realizacji celów, jakie wyznaczył sobie mgr Roman Maślanka, było precyzyjne sformułowanie zadań eksperymentalnych, szczegółowe określenie poszczególnych etapów prac badawczych i właściwy dobór środków do ich realizacji. Istotnym elementem metodycznego wyposażenia Doktoranta stał się dobrze przemyślany układ doświadczalny, konfrontujący dwa zmienne czynniki. Pierwszy z nich, o charakterze genetycznym, wynikał z zastosowania kilku szczepów drożdży: dzikiego (BY4741), trzech izogenicznych wobec niego szczepów pozbawionych genów biorących udział w wykrywaniu glukozy i zależnej od niej sygnalizacji ($\Delta gpa2$, $\Delta gpr1$ i $\Delta hxk2$), oraz – w kilku przypadkach – na użyciu dwóch dzikich szczepów o odrębnym tle genetycznym (BMA64-1A i SP4). Drugim czynnikiem było, zastosowanie różnych stężeń glukozy w podłożu hodowlanym: niskiego 0,5%-owego, tworzącego warunki restrykcji kalorycznej, standardowego, zoptymalizowanego stężenia 2%-owego, oraz wysokiego stężenia 4%-owego, prowadzącego do stanu nadmiaru kalorii. Wartość prac eksperymentalnych prowadzonych przez mgr Romana Maślankę podnosi wysoce profesjonalne dopracowanie warunków eksperymentalnych, uwzględniające zarówno naturalne różnicowanie badanych szczepów drożdży pod względem typu metabolizmu (przy jednoczesnym wyeliminowaniu potencjalnej możliwości uruchomienia komórkowej reakcji odpowiedzi na stres), jak i konieczność doboru odpowiedniego czasu hodowli, ustalonego na podstawie oceny szybkości zużywania glukozy i produkcji etanolu.

Wnikliwe obserwacje i analizy będące przedmiotem publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wyjaśniły wiele istotnych problemów zdefiniowanych poszczególnymi zadaniami badawczymi. Ich realizacja możliwa była dzięki umiejętnemu wykorzystaniu i odpowiedniemu przystosowaniu metod i technik eksperymentalnych. W badaniach określających tempo pobierania glukozy, Doktorant zastosował, fluorescencyjny analog glukozy 6-NBDG (nie ulegający hydrolizie), dzięki któremu możliwe stały się analizy drożdży szczepu ($\Delta hxx2$), pozbawionego genu dla heksokinazy 2 (*HXX2*), oraz komórek dwóch innych szczepów z delecją genów zaangażowanych w metabolizm glukozy (*GPA2* i *GPR1*). Ponadto, użycie 6-NBDG pozwoliło na scharakteryzowanie i zobrazowanie autofluorescencji komórek drożdży, za którą odpowiedzialne są przede wszystkim tryptofan, ryboflawina i pirydoksyna – fluorofory biorące udział w zależnym od glukozy przepływie szkieletu węglowego szlakiem pentozofosforanowym; dwa spośród nich (ryboflawina i pirydoksyna) wywierają wpływ antyoksydacyjny, istotny w utrzymywaniu wewnątrzkomórkowego poziomu niezredukowanych cząsteczek glutationu.

Podstawą do oceny parametrów morfologicznych i stanu fizjologicznego komórek drożdży hodowanych w środowisku o zróżnicowanej zawartości glukozy były testy wzrostowe (m.in. analiza gęstości optycznej, pomiary z zastosowaniem tradycyjnej mikroskopii świetlnej i kontrastu Nomarskiego) oznaczenia biomasy i suchej masy komórek. Wykazując się dużym znanstwem technik opartych na wykorzystaniu barwników i sond fluorescencyjnych, Doktorant przeprowadził badania umożliwiające fluorymetryczną i fluorescencyjną analizę żywotności komórek z wykorzystaniem różnicującego barwienia dioctanem fluoresceiny, jodkiem propidyny i sondą FUN-1, wizualizację struktury sieci mitochondrialnej, potencjału błonowego mitochondriów, a także przeprowadzenie analiz umożliwiających ocenę zależności między stężeniem glukozy w podłożu a poziomem generowanych przez komórki reaktywnych form tlenu. Te ostatnie badania, wykonane z użyciem komórek niekompletnych oddechowo (*rho⁰*) i zdolnych do pozyskiwania energii jedynie na drodze fermentacji, dały podstawę do wnioskowania, że u drożdży istnieją mechanizmy tworzenia się wolnych rodników tlenowych niezależne od ich głównego źródła, jakim są mitochondria. Zmiany metaboliczne, wynikające z różnej zawartości glukozy w podłożu hodowlanym, oceniane były na podstawie analiz poziomu ATP, aktywności enzymów szlaku pentozofosforanowego oraz ilościowych oznaczeń całkowitej, utlenionej i zredukowanej puli $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$.

Poza parametrami oceniającymi fizjologiczny stan komórek drożdży w różnych warunkach podaży glukozy, głównym problemem badawczym mgr Romana Maślanki był

anonsowany w tytule Jego rozprawy potencjał reprodukcyjny i długość życia drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Z racji własnych zainteresowań, ten aspekt rozprawy doktorskiej mgr Romana Maślanki wydaje mi się najciekawszy i zarazem najtrudniejszy, wiąże się bowiem zarówno ze szczególnie interesującymi dla mnie procesami replikacji materiału genetycznego, mechanizmami regulacji cyklu komórkowego, starzenia się komórek i dotyczy zarazem najbardziej złożonych i najsilniej zintegrowanych zjawisk, w ich czasowej i przestrzennej całości wynikającej z superpozycji elementarnych procesów biologicznych.

Wyniki badań Doktoranta wskazują na znaczny spadek potencjału reprodukcyjnego komórek dzikiego szczepu drożdży (oceniający na podstawie jego wartości maksymalnych, średnich i występujących najczęściej) następujący wraz ze wzrostem stężenia glukozy w podłożu hodowlanym. Zależności tej nie obserwuje się w przypadku komórek $\Delta gpa2$ i $\Delta gpr1$ o zaburzonym mechanizmie poboru glukozy; obydwa szczepy wytwarzały więcej komórek potomnych niż szczep dziki, osiągając niemal dwukrotnie wyższe wskaźniki potencjału reprodukcyjnego w warunkach nadmiaru kalorii. Problemem związanym z potencjałem reprodukcyjnym drożdży jest uzależnienie tego parametru od wielkości komórki. Analizy przeprowadzone przez mgr Romana Maślankę potwierdziły istnienie negatywnej korelacji między obydwoma wskaźnikami, jeszcze silniejszej, jeśli proliferacyjną aktywność komórek konfrontuje się z ich możliwościami biosyntetycznymi, których miarą jest zawartość suchej masy. Kontynuacją badań nad zależnościami między dostępnością glukozy, warunkowaną jej podażą i pobieraniem, a możliwościami reprodukcyjnymi drożdży były analizy długości życia, obejmujące rzeczywisty czas trwania fazy proliferacyjnej (reprodukcyjnej), post-reprodukcyjnej i sumę obu tych okresów. Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że ten drugi, post-reprodukcyjny etap życia komórek drożdży jest ujemnie skorelowany z potencjałem proliferacyjnym, tj. liczbą wytworzonych komórek potomnych. Chociaż całkowita długość życia dla komórek wszystkich badanych szczepów zarówno w warunkach optymalnych, jak i podczas restrykcji kalorycznej jest porównywalna (mimo istotnych różnic w ich potencjale reprodukcyjnym), czas trwania życia drożdży wyraźnie skraca się w warunkach nadmiaru kalorii. Wydaje się więc, że warunki dostępności glukozy stanowią czynnik o zasadniczym znaczeniu dla biologicznej sprawności komórek, ich potencjału reprodukcyjnego i całkowitej długości czasu ich życia.

Podstawowe wnioski, jakie wypływają z badań mgr Romana Maślanki, zebrane są w krótkim podrozdziale doskonale napisanej „Syntezy najważniejszych zagadnień pracy doktorskiej”, która jest przejrzystym i zwięzłym przewodnikiem po cyklu publikacji

wchodzących w skład Jego rozprawy doktorskiej. Skracając te wnioski i nieznacznie je modyfikując wymienić trzeba:

1) wykazanie istnienia „specyficznego kompromisu metabolicznego” pomiędzy różnymi sposobami wykorzystania glukozy,

2) wykazanie zależności między sposobem wykorzystania glukozy a jej stężeniem zewnątrzkomórkowym,

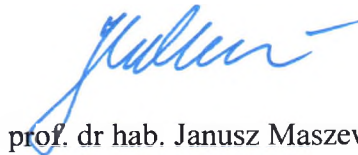
3) wykazanie zależności między stężeniem glukozy w podłożu hodowlanym drożdży a wytwarzaniem przez nie reaktywnych form tlenu,

4) wykazanie silnej zależności między stężeniem glukozy a stanem fizjologicznym i możliwościami biosyntetycznymi drożdży (w tym kontekście, przede wszystkim wykazanie negatywnego wpływu nadmiaru kalorii), co – z kolei – poprzez wpływ na osiągnięte przez komórki rozmiary, determinuje ich potencjał reprodukcyjny i długość życia.

Wyniki opisane w przedłożonej przez Doktoranta rozprawie i płynące z nich wnioski są zarazem Jego rzeczywistymi osiągnięciami. Wiele z nich prowokuje do kontynuacji badań, stawiania nowych pytań i rozszerzenia zakresu poszukiwań. Plany takie anonsuje mgr Roman Maślanka w rozdziale „Perspektywy”. Oceniając bardzo wysoko dotychczasowy dorobek naukowy Doktoranta, jestem głęboko przekonany, że są one w pełni osiągalne. Kierując się własnymi zainteresowaniami, chciałbym poruszyć dwie kwestie, licząc na dyskusję w trakcie obrony rozprawy doktorskiej. Pierwsza dotyczy potencjalnych relacji między dostępnością oraz sposobem wykorzystywania glukozy a molekularnymi czynnikami napędowymi cyklu komórkowego, które w sposób bezpośredni zaangażowane są w okresie aktywności reprodukcyjnej drożdży. Formułując to zagadnienie inaczej postawiłbym więc pytanie o rolę glukozy w tego rodzaju sygnalizacji, która w różnicującym stopniu wpływa na aktywność kluczowych regulatorów replikacji i specyficznej dla drożdży mitozy. Drugi problem dotyczy reaktywnych form tlenu generowanych w warunkach wysokiej podaży glukozy. Do jakiego stopnia stanowią one element sygnalizacji pokrewnej mechanizmom wyzwalającym obronne reakcje odpowiedzi komórkowej, do jakiego zaś niezależny od tych mechanizmów efekt przemian metabolicznych o działaniu destrukcyjnym wobec poszczególnych składników komórek drożdży.

Kończąc, chciałem stwierdzić, że recenzowałem dobrze wykonaną pracę o istotnym znaczeniu poznawczym. Jej efektem są nie tylko odpowiedzi na wiele ważnych pytań, ale także ukazanie szeregu nowych problemów, wyznaczających kierunki, w które należy zmierzać dążąc do ich rozwiązania w przyszłości. Z uznaniem stwierdzam więc, że rozprawa doktorska mgr Romana Maślanki spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca

2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 593 z późniejszymi zmianami) i składam Wysokiej Radzie Naukowej Wydziału Biologiczno-Rolniczego w Rzeszowie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej Autora do publicznej obrony. Pragnę również wyrazić przekonanie, że Jego praca powinna być wyróżniona stosowną nagrodą, o co niniejszym wnioskuję.



prof. dr hab. Janusz Maszewski