

Prof. dr hab. Andriy Sybirnyy  
Profesor zwyczajny Instytutu Biotechnologii  
Uniwersytetu Rzeszowskiego  
ul. Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszów

Rzeszów, dnia 23 czerwca 2023 r.

## RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Irwina Matyjaszczyka pod tytułem  
„Stabilność genomów w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w odpowiedzi na  
3-bromopirogronian”

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana Irwina Matyjaszczyka została wykonana w Zakładzie Mykologii i Genetyki na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotorem pracy był prof. dr hab. Stanisław Ułaszewski, natomiast promotorem pomocniczym – dr Magdalena Cal.

Wyniki rozprawy doktorskiej I. Matyjaszczyka zostały opublikowane w dwóch następujących publikacjach:

1. Cal, Magdalena, Irwin Matyjaszczyk, Ireneusz Litwin, Daria Augustyniak, Rafał Ogórek, Young Ko, and Stanisław Ułaszewski “The anticancer drug 3-bromopyruvate induces DNA damage potentially through reactive oxygen species in yeast and in human cancer cells.” *Cells* 9, no. 5 (2020): 1161.

2. Cal, Magdalena, Irwin Matyjaszczyk, Karolina Filik, Rafał Ogórek, Young Ko, and Stanisław Ułaszewski “Mitochondrial Function Are Disturbed in the Presence of the Anticancer Drug, 3-Bromopyruvate.” *International Journal of Molecular Sciences* 22, no. 12 (2021): 6640.

Te czasopisma wydawane przez MDPI posiadają wysokie wskaźniki parametryczne. Czasopismo *Cells* ma współczynnik wpływu IF 7,666 (według wydawcy) oraz 140 punktów MEiN, natomiast *International Journal of Molecular Sciences* ma współczynnik wpływu IF 6,208 i również 140 pkt

MEiN. Sumaryczny współczynnik wpływu tych publikacji wynosi 13,874 a liczba punktów MEiN wynosi 280. Świadczy to o wysokim poziomie przeprowadzonych badań. Niestety, I. Matyjaszczyk nie jest pierwszym autorem w żadnym ze wspomnianych artykułów i dlatego jego konkretny udział w ich wykonaniu nie jest zrozumiały. Jako podstawę rozprawy autor przedłożył monografię, choć trudno zrozumieć, w jakim stopniu materiał monografii jest podobny/identyczny do materiałów opublikowanych prac. Czy monografia zawiera wszystkie dane wykonane przez zespoły wieloautorskie czy tylko część danych uzyskanych przez Doktoranta? Zatem dobrze byłoby uzyskać odpowiedzi na te pytania. W monografii Doktorant wspomina o współpracy w wykonaniu nielicznych eksperymentów, głównie na komórkach ludzkich. Natomiast o współpracy w wykonaniu eksperymentów na drożdżach w monografii nie ma dostatecznej informacji, więc mam nadzieję, że Pan mgr Irwin Matyjaszczyk wyjaśni sytuację w trakcie obrony.

Monografia zawiera następujące rozdziały: spis treści, abstrakt, wstęp (faktycznie stanowiące przegląd literatury, razem 31 strona), sformułowany cel pracy, materiały i metody, wyniki (24 strony), dyskusję i wnioski. Abstrakt służy jako dobre wprowadzenie do lektury pracy, gdyż określa główne przesłanki podjęcia przez doktoranta badań nad wpływem 3-bromopirogronianu na genomy jądrowy oraz mitochondrialny u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. W przeglądzie literatury autor analizuje źródła uszkodzeń DNA w komórkach oraz odpowiedzi drożdży *S. cerevisiae* na takie uszkodzenia polegająca na różnych typach wycinania zasad lub nukleotydu, poprzez homologiczną i niehomologiczną rekombinację oraz post-replikacyjną naprawę uszkodzeń. W dalszej części przeglądu literatury Pan mgr I. Matyjaszczyk analizuje genom mitochondrialny drożdży, replikację i naprawę mitochondrialnego DNA. W następnym rozdziale przeglądu autor opisuje źródła stresu oksydacyjnego u drożdży oraz sposoby przeciwdziałania stresowi przy pomocy układów tioredoksyny, glutaredoksyny, glutationu, enzymów (oksydaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydazy) itp. W ostatnim krótkim rozdziale przeglądu literatury (2 strony) doktorant omawia dane dotyczące znanych mechanizmów działania 3-bromopirogronianu jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego. Uważam, że warto było poświęcić więcej uwagi analizie dotychczasowej wiedzy o na temat działania 3-bromopirogronianu, nawet kosztem materiału o uszkodzeniach jądrowego i mitochondrialnego DNA i jego naprawy. Dodatkowo chciałbym nadmienić, że w opisie mechanizmów uszkodzeń, naprawy DNA oraz stresu oksydacyjnego Doktorant nie zbyt przekonująco pokazuje możliwe powiązanie tego materiału z przedmiotem własnych badań, dlatego czytelnikowi trudno zrozumieć, po co właściwie ten materiał jest opisywany na tyle dokładnie a znane mechanizmy działania 3-bromopirogroninu podane są bardzo, a nawet zbyt krótko.

Rozdział :Materiały i metody” napisany jest z wyszczególnieniem konkretnych metod badań. Można dojść do wniosku, że Doktorant w pełni opanował wiele metod biochemii, fizjologii, genetyki i cytologii drożdży. Wykorzystane zostały różnorodne metody, zwłaszcza synchronizacje komórek w fazach G1, S i G2/M cyklu komórkowego, analiza kinetyki cyklu komórkowego, izolacje i elektroforeza białek wewnątrzkomórkowych, western (imuno)blotting, test kometowy do badania degradacji DNA, ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qRT-PCR) oraz analizy biochemiczne

(badania reaktywnych form tlenu, elektroforeza pulsacyjna chromosomów, obserwacje mikroskopowe), itp. Szczególnie warto podkreślić, że mgr I. Matyjaszczyk opanował metodę hodowle linii komórkowych THP-1, K562 i Jurkat, co poszerza arsenał wykorzystywanych przez niego metod dość znacząco. Niestety metody klonowania molekularnego nie zostały użyte w tej pracy. Wykorzystanie takich nowoczesnych metod pozwoliłoby zidentyfikować konkretne mutacje punktowe, delecje czy insercje oraz inne przebudowy na poziomie chromosomalnym, powstałe na przykład w wyniku rekombinacji, a wywoływane przez 3-bromopirogronian w konkretnych genach i bardziej zbliżyć się do zrozumienia odpowiednich mechanizmów.

Rozdział pracy doktorskiej opisujący badania własne rozpoczyna opis wpływu 3-bromopirogronianu na przeżywalność drożdży *S. cerevisiae*. Autor podkreśla przyczyny, dla których użyto sacharozę a nie glukozę jako źródło węgla, ale odpowiednie porównanie wrażliwości komórek na obydwu substratach nie zostało przeprowadzone. Następnie Autor udowadnia, że w procesie inkubacji komórek z 3-bromopirogronianem dochodzi do zależnej od replikacji aktywacji punktu kontrolnego uszkodzenia DNA. Zaobserwowano także, że inkubacja komórek z tym inhibitorem wywołuje zależną od replikacji fosforylację histonu H2A w komórkach szczepu W303-1A drożdży *S. cerevisiae*, a także dochodzi do opóźnienia kinetyki wszystkich faz cyklu komórkowego. Udowodniono ponadto, że mutanty z uszkodzoną naprawą DNA *Aku70*, *rad52*, *Arad5* oraz podwójny mutant *Arad51 Aku70* wykazywały wysoką wrażliwość na 3-bromopirogronian, co świadczy o tym, że ścieżka naprawy DNA na drodze HR i NHEJ jest potrzebna komórkom do przeżycia w obecności badanego związku.

Ponadto, udowodniono, że inkubacja komórek z 3-bromopirogronianem prowadzi do zwiększenia poziomu reaktywnych form tlenu, a także dwuniciowego uszkodzenia DNA, które mogły zostać wywołane poprzez działanie powstałych reaktywnych form tlenu. Kolejno w odpowiedzi na 3-bromopirogronian uruchamia się kilka ścieżek odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Ciekawy eksperyment z wykorzystaniem elektroforezy pulsacyjnej (PFGE) bezpośrednio wykazał obecność uszkodzeń DNA w komórkach drożdży traktowanych 3-bromopirogronianem.

Dzięki pracom Doktoranta ustalono, że uszkodzenie DNA wykryte poprzez test kometowym po inkubacji komórek z 3-bromopirogronianem zaobserwowano także dla ludzkiej linii nowotworowej THP-1 wywodzącej się z monocytów. Ten przeciwnowotworowy środek także istotnie obniżał żywotność komórek ludzkich.

Ciekawy rozdział pracy doktorskiej został poświęcony wpływowi 3-bromopirogronianu na mitochondrialny DNA drożdży. Najpierw okazało się, że szczep *S. cerevisiae rho<sup>0</sup>* pozbawiony mitochondrialnego DNA jest znacznie bardziej wrażliwy na 3-bromopirogronian niż szczep dziki. Badania pozwoliły również na wniosek, że mutanty *Δmgm101*, *Δhmi1* i *Δmhr1* z uszkodzeniami naprawy i rekombinacji mitochondrialnego DNA, wykazują większą wrażliwość na 3-bromopirogronian w porównaniu ze szczepem dzikim. Inhibitor powodował również obniżenie

metabolicznej aktywności komórek, co ustalona na podstawie testu ogólnego polegającego na konwersji soli tetrazolowej MTT do formazanu. Co ciekawe, badania pozwalają również sądzić, że 3-bromopirogronian indukuje stres oksydacyjny w mitochondriach drożdży piekarskich wywołując powstanie ROS. Mutant z delecją genu kodującego mitochondrialną dysmutazę nadtlenkową *Asod2* *S. cerevisiae* wykazywał się nadwrażliwością na 3-bromopirogronian, co świadczy o ważnej roli mitochondriów w oporności na tę substancję. Niestety Autor nie porównał wrażliwości na 3-bromopirogronian mutanta z delecją genu cytozolowej Cu,Zn-zależnej dysmutazy nadtlenkowej *Asod1*, stąd nie możemy twierdzić, że tylko mitochondrialna dysmutaza nadtlenkowa bierze udział w oporności na badany środek przeciwnowotworowy. Co więcej, 3-bromopirogronian obniżał również ekspresję mitochondrialnego genu *COX1* kodującego podjednostkę oksydazy cytochromowej. Dowiedziono również synergistyczne działanie 3-bromopirogronianu ze związkami wywołującymi stres oksydacyjny (nadtlenek wodoru) oraz inhibitorami transportu elektronów (antymicyna A) na zahamowanie wzrostu komórek. Na ludzkich liniach komórkowych 3-bromopirogronian działa synergistycznie z fenforminą. Taka oryginalna obserwacja może mieć znaczenie praktyczne w farmacji dla opracowania nowych protokołów leczenia chorób nowotworowych.

Rozdział dyskusja napisany został poprawnie i porównuje własne spostrzeżenia z wynikami innych autorów opublikowanymi w literaturze naukowej. Wnioski pracy odpowiadają treści wyżej wymienionych publikacji naukowych oraz wynikają bezpośrednio z wyników uzyskanych przez Doktoranta w trakcie wykonywania niniejszej pracy.

Podsumowując, można stwierdzić, że Pan mgr Irwin Matyjaszczyk opanował wiele nowoczesnych metod biochemii, cytologii, genetyki i fizjologii mikroorganizmów oraz komórek ludzkich i uzyskał wiele nowych oryginalnych wyników, które istotnie wzbogacają naszą wiedzę o działaniu potencjalnego środka przeciwnowotworowego 3-bromopirogronianu. Mam jednak jedną zasadniczą uwagę. Doktorant nie przeanalizował mechanizmu działania 3-bromopirogronianu: pozostaje zatem niezrozumiałe czy ta substancja bezpośrednio wywoływała uszkodzenie DNA oraz inne zjawiska czy odwrotnie, działanie 3-bromopirogronianu było pośrednie. Doktorant sugeruje o roli reaktywnych form tlenu w uszkodzeniu DNA, jednak w jaki sposób 3-bromopirogronian inicjuje ich powstanie, pozostaje nie całkiem zrozumiałym. Wiadomo, że 3-bromopirogronian aktywuje alkiłowanie pewnych białek oraz obniża poziom ATP. Może właśnie to jest przyczyna zaobserwowanych zjawisk? Hipotezę o roli ATP można byłoby stosunkowo łatwo sprawdzić poprzez zastosowanie innych substancji obniżających wewnątrzkomórkowe stężenie tego nukleotydu oraz obserwowanie czy działają one zbieżnie do 3-bromopirogronianu. Niestety Doktorant w ogóle nie porusza kwestii mechanizmów działania 3-bromopirogronianu w tym przekazywania sygnału po dodawaniu tego inhibitora do komórki. A w jaki sposób 3-bromopirogronian wywołuje fosforylację histonów czy mutacje jądrowego i mitochondrialnego DNA? Czy to działanie 3-bromopirogronianu w tych przypadkach bezpośrednie czy jest ono pośrednie i być może jest spowodowane wynikiem pewnych innych zdarzeń inicjowanych poprzez 3-bromopirogronianem? Oczywiście jest, że badania jednej pracy doktorskiej być może nie pomogą nam w rozwiązaniu tych niejasności, jednak warto jest



z głębić i dyskutować nad nimi proponując różne hipotezy. Uwagi te są jednak tylko sugestiami oraz nie wpływają one w istotny sposób na ocenę wysokiego merytorycznego poziomu przedłożonej mi do recenzji pracy doktorskiej.

Recenzowana przeze mnie praca doktorska Pana mgr Irwina Matyjaszczyka wykonana jest z zachowaniem właściwej metodologii badań biologicznych, uważam, że temat pracy jest bardzo aktualny a nawet innowacyjny. Wyniki otrzymane w toku wykonywania pracy mają znaczenie dla rozwoju nauk podstawowych, ale także zawierają wysoce aplikacyjny potencjał, który może zostać wdrożony do praktyki medycznej.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr Irwina Matyjaszczyka pod tytułem „Stabilność genomów w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w odpowiedzi na 3-bromopirogronian” pozwalają mnie z pełnym przekonaniem stwierdzić, że recenzowana praca spełnia wszelkie warunki ujęte w art. 13 pkt 1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 14 czerwca 2003 r. (Dz.U. Z 2017 r. Poz. 1789) z późniejszymi zmianami, stąd też wnoszę o dopuszczenie jej do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Andriy Sybirnyy