

Rzeszów, dn. 19.06.2023 r.

dr hab. Małgorzata Kus-Liśkiewicz, prof. UR
Instytut Biotechnologii,
Uniwersytet Rzeszowski

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Irwina Matyjaszczyka
pt. „Stabilność genomów w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
w odpowiedzi na 3-bromopirogronian”
wykonanej w Zakładzie Mykologii i Genetyki
na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego
pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisław Ułaszewskiego oraz dr Magdaleny Cal**

Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo pana dr hab. Marcina Kadeja, prof. UW, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej nauki biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego z dnia 22 maja 2023 roku, które informuje o powierzeniu mi obowiązków recenzenta wspomnianej wyżej rozprawy doktorskiej.

Przewód doktorski procedowany jest na podstawie ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z art. 179 ust. 3 z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669 ze zm.).

Zgodnie z art. 13. 1. Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym, w niniejszej recenzji ocenione zostanie czy przygotowywana pod opieką promotora i promotora pomocniczego praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, czy praca wskazuje na posiadanie przez doktoranta ogólnej wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki biologiczne oraz czy doktorant posiada umiejętność prowadzenia samodzielnie pracy naukowej.

Rozprawa doktorska mgra Irwina Matyjaszczyka przygotowana została według klasycznego opracowania monograficznego i posiada typowy układ z poszczególnymi częściami wyodrębnionymi jako rozdziały: Abstrakt (2 strony), Wstęp (32 strony), Cel pracy (1 strona), Materiały i metody (11 stron), Wyniki (25 stron), Dyskusja (11 stron), Wnioski (2 strony), Bibliografia (19 stron) oraz Wykaz skrótów (2 strony). Łącznie rozprawa doktorska liczy 111 stron i zawiera 21 rycin. Przedstawiona

została również informacja, wskazująca na to, że prezentowane w rozprawie wyniki są przedmiotem dwóch publikacji:

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

Ocena merytoryczna recenzowanej rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska dotyczy ważnego zagadnienia związanego z możliwościami terapeutycznego wykorzystania 3-bromopirogronianu ze względu na jego wykazane właściwości przeciwnowotworowe. Kandydat wskazuje, że pomimo wielu przeprowadzonych dotąd badań nad tym związkiem, ciągle brak jest wnikliwej charakterystyki molekularnego mechanizmu jego oddziaływania. Z tego powodu, uważam za bardzo zasadne podjęcie tej tematyki. Szczególnie, że brak jest badań dotyczących potencjalnego oddziaływania genotoksycznego.

Pierwszym rozdziałem rozprawy doktorskiej jest „Wstęp”, w którym Doktorant w obszerny sposób prezentuje obecny stan wiedzy dotyczący źródeł uszkodzeń DNA, wskazując na ich endogenne i egzogenne pochodzenie. Aspekt ten jest dobrym i potrzebnym wstępem dla czytelnika do podejmowanego w kolejnych rozdziałach tematu badawczego, czyli określenia aktywności 3-bromopirogronianu jako egzogennego czynnika terapeutycznego. W kolejnych częściach tego rozdziału Kandydat prezentuje rozległą wiedzę na temat odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA obserwowane w drożdżach i opisuje charakterystyczne, zidentyfikowane dotąd mechanizmy. Szczegółowo, Doktorant opisuje też możliwe uszkodzenia i naprawę genomu mitochondrialnego oraz rolę enzymów w ochronie przed stresem oksydacyjnym. Pomocne w wyjaśnieniu i zrozumieniu omawianych zagadnień są tutaj licznie zaprezentowane ryciny, przedstawiane jako opracowania własne Doktoranta. Temat badawczy podjęty w prezentowanej rozprawie dotyczy badań aktywności 3-BP w komórkach drożdży, wybranych jako organizm modelowy i przykład komórki eukariotycznej. Pomimo tego, Doktorant opisując stan wiedzy na temat mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA, nie skupia się wyłącznie na danych dotyczących komórek drożdżowych. Co zasługuje na podkreślenie, to fakt, że w wielu częściach tego rozdziału omawiane mechanizmy prezentowane są i odnoszone do wiedzy jaką posiadamy na temat komórek ludzkich. To ubogaca ten rozdział i pozwala na wnioskowanie

o wszechstronnej wiedzy Doktoranta. W ostatniej części rozdziału pierwszego, Doktorant przedstawia stan wiedzy na temat aktywności 3-bromopirogronianu, w tym wskazuje nie tylko na jego aktywność przeciwnowotworową, ale też na możliwe synergistyczne działanie 3-BP w połączeniu z innymi terapiami oraz potencjał przeciwdrobnoustrojowy. To pokazuje na umiejętność poszukiwania informacji w bazach naukowych i co więcej, ich korelację z zaproponowanym tematem badawczym. W trakcie lektury tej części rozprawy, zauważyłam kilka błędów stylistycznych czy interpunkcyjnych. Dla przykładu, legenda ryciny numer 1 w zasadzie nie zawiera znaków przestankowych, co utrudnia jego interpretację. Moje wątpliwości budzi też użyte stwierdzenie „karcenogenny” (rozdział 1.2.2, strona 13). Według mojej opinii powinno ono być zastąpione słowem „kancerogenny”, ewentualnie „karcynogenny”. Przy omawianiu mechanizmu naprawy dwuniciowych złamań DNA przez niehomologiczne łączenie końców (rozdział 1.2.3) wspomniany jest po raz pierwszy również mechanizm naprawy homologicznej rekombinacji. W tym miejscu jednak użyty został tylko skrót pochodzący od nazwy tego mechanizmu, HR, tj. homologicznej rekombinacji. Czytając chronologicznie kolejne rozdziały, zrozumienie tego skrótu bez jego wyjaśnienia jest utrudnione, gdyż może mieć ono kilka znaczeń. Pomimo, że w dalszej części zjawisko to jest opisane szczegółowo.

Niezależnie od wskazania tych kilku spostrzeżeń, uważam, że rozdział „Wstęp” napisany jest w zrozumiały i wyczerpujący sposób, i wprowadza następnie czytelnika do rozdziału „Cel pracy”, który jest z kolei sformułowany czytelnie, jako jedno rozbudowane zdanie. Według mnie pracę wzbogaciłoby wyłonienie dodatkowo celów pośrednich czy szczegółowych. To pozwoliłoby również jednoznacznie odnieść zaprezentowany w rozdziale pierwszym stan wiedzy, do zaplanowanych i przeprowadzonych w pracy badań.

W kolejnym rozdziale pracy przedstawione są materiały i metody wykorzystywane w badaniach. Należy podkreślić, że w tej części znalazły się opisy wszystkich stosowanych technik badawczych, jednak w kilku przypadkach opis wykonanych metod powinien zostać zaprezentowany bardziej szczegółowo. Dla przykładu, w rozdziale 3.3 (strona 43) poddano analizie przeżywalność komórek po ekspozycji na badane związki. Należało tutaj umieścić też informację w jaki sposób wyrażono ostateczne wyniki, jaki rodzaj obliczeń zastosowano. Czytając lekturę niniejszej rozprawy doktorskiej czasami można napotkać stosowanie slangu laboratoryjnego (np. „szmir” czy „logarytmiczne hodowle”). Sformułowania takie nie powinny znaleźć się w tego typu opracowaniach. Jednak z drugiej strony, zdaję sobie sprawę, że Doktorant „przeziąknięty” takim słownictwem w trakcie pracy w laboratorium mógł nawet nie zauważyć tego rodzaju błędnego języka. W rozdziale 3.5 (strona 44) przedstawiono metodę analizy wrażliwości mutantów, jednak nie podano jak ostatecznie tą wrażliwość

determinowano. Kolejno, w rozdziałach 3.8 i 3.9 nie podano rodzaju obliczeń i sposobu wyrażenia końcowego wyniku genotoksyczności i indukcji stresu oksydacyjnego. Przy stosowaniu sonikacji (rozdz. 3.10.1, str. 47) należało też wskazać warunki prowadzenia tego procesu, gdyż nawet niewielkie różnice w mocy sonikatora, czasie trwania sonikacji, czy rodzaju naczynia, w którym proces się odbywa, wpływa na końcowy wynik przygotowywanej próby. I jeszcze ostatnia uwaga, według mnie najważniejsza, dotyczy braku opisu zastosowanych metod statystycznych w analizie wyników. Pomimo, że w następnym rozdziale przy niektórych tylko rycinach taka informacja jest zawarta, uważam, że w rozdziale „Materiały i metody” winien znaleźć się szczegółowy opis przeprowadzonych analiz statystycznych.

Rozdział „Wyniki” jest zestawieniem wszystkich przeprowadzonych analiz, przedstawionych jako kolejne rozdziały. Moja uwaga ogólna dotyczy sformułowań tytułów tych rozdziałów, których forma jest zmienna. Czasami są to właściwie określone wnioski z wykonanej analizy (na przykład „Przeżywalność komórek ... w obecności 3-bromopirogronianu”, rozdział 4.1), przedstawione zwięźle. Podczas gdy tytuły innych rozdziałów są w mojej ocenie zbyt rozbudowane, na przykład rozdział 4.3 „W obecności 3-bromopirogronianu w komórkach szczepu W303-1A *Saccharomyces cerevisiae* dochodzi do opóźnienia kinetyki wszystkich faz cyklu komórkowego”. W ten sposób sformułowany tytuł jest raczej opisem obserwacji. W przypadku badania przeżywalności komórek po ekspozycji wobec 3-BP, nie podano informacji jakim kluczem zostały dobrane testowane stężenia związku. Tym bardziej, że w kolejnych eksperymentach stężenia się różniły. Dla przykładu, w rozdziale 4.2 gdzie analizowano indukcję dwuniciowych złamań DNA, zastosowano dwie metody analiz, tj. Western blot oraz metodę nakropień. Jednak przy różnych stężeniach, zarówno dla 3-BP jak i kontroli pozytywnej, metanosulfonian metylu. Podobnie, na rycinie 14 A wskazano użycie różnych stężeń 3-BP zależnej od typów mutantów. Na rycinie 12 brak jest opisu, który wykres przedstawia wyniki określonej sondy. Można się domyślać, że układ jest tożsamy z układem fotografii.

Pomimo moich kilku uwag, pragnę podkreślić, że całość tego rozdziału jest czytelna i dobrze uorganizowana. Ważnym, dodatkowym aspektem jest to, że na początku omawiania wyników dla określonego typu badania Doktorant podaje krótki wstęp, który wyjaśnia zasadność jego przeprowadzenia. Wartym podkreślenia również jest fakt, że do oszacowania powstawania dwuniciowych złamań obok metody elektroforezy pulsacyjnej PFGE Doktorant przeprowadził badanie z wykorzystaniem alternatywnej techniki tzw. „komet assay”, podkreślając jej wyższą czułość. Wskazuje to na umiejętność samodzielnego prowadzenia badań i poszukiwania alternatywnych rozwiązań w celu realizacji postawionego celu pracy.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorant umiejętnie konfrontuje otrzymane wyniki z tymi przedstawianymi przez innych autorów. Bardzo cenne są końcowe spostrzeżenia zawarte w części „Dyskusja” oraz „Wnioski”. Doktorant opisuje prawdopodobny mechanizm molekularnego oddziaływania 3-BP, który polega między innymi na inicjowaniu uszkodzeń DNA jądrowego i mitochondrialnego. Co więcej, ustalono, że mitochondria pełnią rolę ochronną przed działaniem 3-BP. W tekście znajdują się bardzo liczne cytacje i odnośniki literaturowe, zebrane w ostatniej części dysertacji, jako rozdział „Bibliografia” (liczący 310 pozycji) oraz spis skrótów, który jest pomocny w lekturze rozprawy doktorskiej.

Po zapoznaniu się z dysertacją, obok wskazanych wyżej nieścisłości lub niewielkich uchybień, miałbym kilka pytań do Doktoranta, i jeśli jest to możliwe, prosiłbym o odpowiedź podczas publicznej obrony:

- W rozdziale 1.3 omawiającym aktywność punktów kontrolnych cyklu komórkowego w odpowiedzi na uszkodzenia DNA Doktorant wspomina, że u „drożdży piekarniczych aktywacja punktów kontrolnych inicjowana jest w wyniku powstania podwójnych uszkodzeń DNA, które są najgroźniejszą formą uszkodzeń”. Proszę o wyjaśnienie tego sformułowania, dlaczego Doktorant tak uważa?
- W trakcie opisu aktywności peroksydaz (rozdział 1.5.2.3) pojawia się stwierdzenie, że „Gpx3 ... chroni komórki przed stresem oksydacyjnym spowodowanym przez metale ciężkie takie jak kadm”. Czy tylko wobec kadmu, czy istnieją jakieś doniesienia literaturowe na temat aktywności Gpx3 w przypadku ekspozycji na inne metale ciężkie?
- W opisie stanu wiedzy na temat stosowania 3-BP jako leku przeciwnowotworowego podano, że „różnica w ilości transporterów (chodzi o monocarboxylate transporters, MCT) między zdrowymi komórkami i komórkami nowotworowymi wyjaśnia wybiórczo toksyczne działanie 3-BP względem komórek nowotworowych”. Jest to bardzo ważne stwierdzenie w aspekcie przeprowadzonych analiz i określenia aktywności 3-BP, dlatego proszę o rozwinięcie i wyjaśnienie skąd wynika ta różnica w toksyczności.
- Proszę Doktoranta o wyjaśnienie czym kierował się dobierając linie komórkowe do przeprowadzonych analiz. Dlaczego też w niektórych testach zastosowano tylko wybrane typy linii komórkowych oraz z jakiego powodu stężenia testowanego związku były inne niż w przypadku prowadzonych analiz na komórkach drożdży.

- Czy Doktorant posiada wiedzę na temat możliwych interakcji produktów rozpadu 3-bromopirogronianu. Czy są dane dotyczące aktywności 3-BP (lub jego pochodnych) porównawczo prowadzonej w komórkach zdrowych i nowotworowych.

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że recenzowana przez mnie praca dowodzi posiadania przez Doktoranta wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki biologiczne, o czym świadczy zaprezentowanie stanu wiedzy na temat realizowanych badań i dobrze przeprowadzona dyskusja otrzymanych wyników. Ponadto, Doktorant posiada umiejętność planowania i prowadzenia badań, gdyż właściwie dobrał metody badawcze. Co więcej, mgr Matyjaszczyk ma umiejętności prowadzenia badań na różnych organizmach modelowych, w tym zarówno na komórkach drożdżowych jak i liniach komórkowych, co wskazuje na jego bogaty warsztat badawczy i umiejętność interpretacji zróżnicowanych wyników. Z uwagi na przedstawiony stan wiedzy, należy stwierdzić, że zaproponowana tematyka będąca podstawą dysertacji, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Faktem potwierdzającym moje przemyślenia jest opublikowanie przez Doktoranta części przeprowadzonych badań w dwóch czasopismach o zasięgu międzynarodowym, zawartych w wykazie Journal Citation Reports; tj. Cells (7.666 IF) oraz International Journal of Molecular Sciences (6.208 IF).

W związku z powyższym, ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Irwina Matyjaszczyka spełnia warunki określone w art. 13.1 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. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej nauki biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Irwina Matyjaszczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Małgorzata Kus-Liśkiewicz, prof. UR
Uniwersytet Rzeszowski