

dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN

Poznań, 7.02.2025 r.

**Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Martynty Baranek-Grabińskiej pt.:
„Udział ludzkich paralogów białka VDAC w przeciwdziałaniu skutkom stresu
oksydacyjnego wywołanego brakiem dysmutaz wewnątrzkomórkowych”**

Tematyka i cele rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Martynty Baranek-Grabińskiej powstała w Zakładzie Bioenergetyki Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotorem pracy jest Pani prof. dr hab. Hanna Kmita, a promotorem pomocniczym – Pan dr hab. Andonis Karachitos. Praca ta doskonale wpisuje się w tematykę badawczą prowadzoną przez Promotorów, którzy mają znaczące osiągnięcia w badaniach funkcjonowania białek VDAC (ang. *Voltage-Dependent Anion Channel*) w kontekście stanu redoks komórek oraz ich roli w ochronie przed stresem oksydacyjnym. Praca jest przygotowana według obowiązującej od roku 2018 ustawy o tytule i stopniach naukowych, pozwalającej na przedstawienie rozprawy doktorskiej w postaci zbioru opublikowanych prac.

Podjęta tematyka badawcza dotyczy funkcji paralogów białek VDAC, zwłaszcza w kontekście roli reszt cysteiny i ich wpływu na stan redoks oraz adaptację organizmów do zmiennych warunków środowiskowych. Chociaż od dawna znamy podstawy funkcjonowania VDAC i jesteśmy świadomi ich istotności u wielu organizmów, nadal jesteśmy jeszcze daleko od zrozumienia molekularnych detali tego procesu. Piszę o tym aby podkreślić, że tematyka wybrana przez Doktorantkę i Jej Promotorów jest w pełni oryginalna, a zaplanowane i wykonane przez mgr Martynę Baranek-Grabińską doświadczenia odpowiadają na ważne biologiczne pytania.

Ocena formalna rozprawy

Na rozprawę składają się trzy prace eksperymentalne, w dwóch z nich Pani mgr Baranek-Grabińska jest pierwszym autorem. Jedna praca ukazała się w rozpoznawanym czasopiśmie naukowym, kolejna – jest na etapie recenzji, a trzecia jest przygotowana do złożenia w redakcji. Na podstawie załączonego wykazu realizowanych zadań stwierdzam, że Doktorantka aktywnie uczestniczyła w wykonaniu znacznej części eksperymentów, co wskazuje na Jej znaczący udział w powstaniu wszystkich publikacji.

Zgodnie z wymogami publikacje te poprzedzone są w przedstawionej rozprawie omówieniem zagadnienia i uzyskanych wyników. W rozprawie, rozpoczynającej się od streszczenia w języku polskim i angielskim, znajduje się wstęp, omawiający kluczową rolę dysmutaz ponadtlenkowych (SOD) podczas stresu oksydacyjnego oraz ich powiązanie z VDAC, białkiem tworzącym kanał transportujący jony przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Doktorantka podkreśliła, że kanał VDAC jest istotny nie tylko dla prawidłowego działania mitochondrium, ale również całej komórki.

Następnie Doktorantka podała cel pracy, precyzyjnie definiując go w trzech punktach, tj. określenie występowania wariantu VDAC wrażliwego na stan redoks (rsVDAC) u bezkręgowców, poznanie znaczenia genotypu drożdży na przeżywalność w warunkach ekspresji ludzkich paralogów VDAC oraz określenie wpływu eliminacji dysmutaz ponadtlenkowych na przeżywalność i poziom stresu oksydacyjnego. Wszystkie cele są ze sobą powiązane i prowadzą do głównej tezy pracy.

Ocena merytoryczna rozprawy

Cele szczegółowe nakreślone przez Doktorantkę odpowiadają wynikom uzyskanym w trzech pracach. Ich wartość naukową najlepiej obrazuje fakt, że zostały opublikowane lub są kierowane do znanych czasopism naukowych.

W pierwszej z nich, opublikowanej w *Frontiers in Physiology* Pani mgr Baranek-Grabińska podjęła się bioinformatycznej analizy kanałów VDAC wrażliwych na stan redoks, z uwzględnieniem szczególnej roli reszt cysteiny w modulacji aktywności VDAC w odpowiedzi na zmiany stanu redoks w komórce. Badanie obejmowało szeroki zakres organizmów, od bezkręgowców po pasożyty, co rzutuje na uniwersalność wyników. Dużą zaletą tej publikacji jest, obok wspomnianej już złożoności badań, również innowacyjne podejście – kanały VDAC nie były dotąd badane w tak szerokim zakresie ewolucyjnym i ekologicznym. W tym rozdziale brakuje mi kilku informacji i proszę Doktorantkę o komentarz do następujących pytań:

- Czy używane narzędzia bioinformatyczne pozwoliły na pełną predykcję strukturalną, czy tylko na wskazanie miejsca występowania reszt cysteiny?
- Zaobserwowała Pani, że „*warianty VDAC w przypadku których istnieje możliwość tworzenia wiązań dwusiarczkowych przy udziale reszt cysteiny z końca N występują częściej w organizmach złożonych niż w organizmach prostych*”. Czy zaobserwowała Pani podobne różnice w zależności między liczbą reszt cysteiny a funkcjonalnością VDAC u różnych grup taksonomicznych?
- Ze swoich analiz wysunęła Pani wniosek, że u organizmów pasożytniczych w większości występuje jeden wariant VDAC, który jest jednocześnie czujnikiem redoks, istotnym dla adaptacji do stresu oksydacyjnego. Ciekawi mnie zatem jakie zmiany w strukturze VDAC byłyby szczególnie istotne w kontekście adaptacji pasożytów do tego stresu oraz czy na podstawie przeprowadzonych przez Panią analiz byłaby Pani w stanie wskazać różnice ewolucyjne w strukturze VDAC, które mogłyby wpływać na wybór konkretnego VDAC na ten działający jako rsVDAC?

Co istotne, w pierwszej publikacji uzyskano ważne informacje na temat powiązania paralogów VDAC z adaptacją do warunków środowiskowych, co było punktem wyjściowym do analiz przedstawionych w drugiej publikacji (w trakcie recenzji w redakcji czasopisma *International Journal of Molecular Sciences*), w której Doktorantka obrała za cel zbadanie roli genotypu *Saccharomyces cerevisiae* w heterologicznej ekspresji ludzkich paralogów VDAC. Ponownie, zakres tematyczny i tej pracy jest w pełni nowatorski i skupia się na aspektach, które wcześniej były pomijane przez innych badaczy, tj. obecność u drożdży paralogu VDAC2 oraz rola genotypu drożdży. Doktorantka utworzyła nowy model drożdżowy do badań roli kanałów VDAC, tj. podwójny mutant ($\Delta\text{por1}\Delta\text{por2}$) w tle genetycznym różnych szczepów (BY4741 i M3) oraz zastosowała zróżnicowane warunki hodowli drożdży. Dzięki temu zaobserwowała istotne relacje genotyp-fenotyp oraz – ponownie – istotność reszt cysteiny. Takie badania mają szczególne znaczenie w kontekście ludzkich chorób. Do tej (świetnie opisanej w publikacji) części pracy mam następujące pytania:

- Zaobserwowała Pani zdolność komplementacji fenotypu podwójnego mutantu drożdżowego przez ludzki paralog VDAC3 Δ Cys (w którym wszystkie reszty cysteiny zastąpiono resztami alaniny), ale wyłącznie w szczepie M3. Szczep ten, w odróżnieniu do BY4741, posiada gen *MET15*, więc logiczne było wysunięcie wniosku o kluczowym znaczeniu *MET15* dla wyżej opisanej komplementacji. Czy sądzi Pani, że zaobserwowane różnice w komplementacji fenotypu pomiędzy szczepami BY4741 i M3 mogą wynikać również z innych różnic w ich genotypach?
- Czy zastosowanie innych warunków stresowych mogłoby ujawnić dodatkowe różnice w fenotypach mutantów BY4741- $\Delta\text{por1}\Delta\text{por2}$ i M3- $\Delta\text{por1}\Delta\text{por2}$? Czy istnieją dane literaturowe wskazujące na taką możliwość?

Trzecia praca wchodząca w skład rozprawy doktorskiej (przygotowana do wysłania do redakcji) ponownie wynika z pytań, które powstały jako pochodna odpowiedzi na zagadnienia poruszane w Publikacji 2. Doktorantka postanowiła uzupełnić otrzymany wcześniej model drożdżowy o eliminację dysmutaz ponadtlenkowych SOD1 i SOD2.

- Zastanawia mnie dlaczego próby usunięcia obu genów dysmutaz w mutantach BY4741- $\Delta\text{por1}\Delta\text{por2}$ nie powiodły się. Czy były specyficzne trudności z procedurą w tym tle genetycznym?
- W warunkach stresu oksydacyjnego drożdże z heterologiczną ekspresją hVDAC3 wykazują lepszą adaptację niż komórki z heterologiczną ekspresją paralogów hVDAC1 lub hVDAC2. Czy sądzi Pani, że obecność innych paralogów hVDAC mogłaby wpływać (pozytywnie lub negatywnie) na protekcyjne działanie hVDAC3 w warunkach stresu oksydacyjnego?

Wszystkie przedstawione powyżej komentarze w najmniejszym stopniu nie mają na celu umniejszania wartości merytorycznej pracy. Moje uwagi mają raczej charakter polemiczny i są podyktowane chęcią dyskusji. Naukowa wartość niniejszej rozprawy pozostaje bardzo wysoka i szczególnie cenię tę część, w której Doktorantka opisuje dyskusję nad uzyskanymi wynikami. Ta polemika z danymi uzyskanymi przez innych oparta jest na dobrze dobranej literaturze naukowej i wskazuje, że Pani Magister znakomicie zna literaturę naukową poświęconą tematyce pracy.

Wnioski końcowe

Rozprawę doktorską Pani mgr Martyny Baranek-Grabińskiej oceniam bardzo dobrze, uważam za wartościową naukowo i przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Autorka przedstawiła w niej oryginalne i interesujące wyniki naukowe, które dostarczają nowej wiedzy na temat funkcjonowania kanałów VDAC wrażliwych na stan redukcyjno-oksydacyjny.

Oceniana praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Martyny Baranek-Grabińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN