



Warszawa 2025.01.20

prof. dr hab. Róża Kucharczyk

Pracownia Bioenergetyki i Mechanizmów Chorób Mitochondrialnych

email: [roza@ibb.waw.pl](mailto:roza@ibb.waw.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Martyny Baranek-Grabińskiej pt. „Udział ludzkich paralogów białka VDAC w przeciwdziałaniu skutkom stresu oksydacyjnego wywołanego brakiem dysmutaz wewnątrzkomórkowych”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Hanny Kmity i współpromotorstwem dr hab. Andonisa Karachitosa, w Zakładzie Bioenergetyki Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Martyny Baranek-Grabińskiej jest kolejnym efektem wieloletniej pracy, także we współpracy międzynarodowej, doświadczonego zespołu naukowego, kierowanego przez prof. dr hab. Hannę Kmitę, zajmującego się zrozumieniem funkcji kanału VDAC. Kanał ten tworzony jest przez jedno białko, ale u większości organizmów w genomie obecne kilka genów, kodujących jego paralogi i funkcja paralogów nie jest jasna. W zespole pani prof. dr hab. Hanny Kmity odkryto, że jednym z powodów obecności i ewolucji paralogów jest stres oksydacyjny w mitochondriach i potrzeba regulacji kanałów VDAC w funkcji równowagi redoks, a zatem także przekazywania sygnałów przez reaktywne formy tlenu. Zrozumienie funkcji i regulacji tych białek jest tym bardziej ważne, że zmiany w ich funkcjonowaniu wiążą się z szeregiem chorób, u podłoża których są dysfunkcje mitochondriów, np. cukrzyca, chorób układu krwionośnego, neurodegeneracyjnych i różnych typach nowotworów.

Recenzowana rozprawa ma typowy układ dla tego typu opracowań z dyscypliny nauk biologicznych, przygotowanych w formie cyklu dwóch publikacji naukowych i jednego manuskryptu przygotowanego do publikacji. Tekst rozprawy liczy 33 strony i zawiera: zwięzłe streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp teoretyczny, cel pracy, jej tezy i osiągnięcia, podsumowanie, bibliografię, listę własnych publikacji i doniesień konferencyjnych oraz artykuły jako załączniki. Dwie załączone prace są opublikowane w *Frontiers in Physiology* i *International Journal of Molecular Sciences* a trzecia w chwili składania rozprawy przygotowana była do wysłania do *BBA-Bioenergetics*. Czasopisma te znajdują się w wykazie MNiSW o odczynnikach oddziaływania (odpowiednio 100 i 140 pkt.), impact factor (odpowiednio 4,755 i 4,9) oraz wskaźniku JCI (odpowiednio 0.71 i 0.99). Artykuły są kilku-autorskie, mgr Martyna Baranek-Grabińska jest w dwóch pierwszą autorką a w jednej trzecią. W konsekwencji, ocena rozprawy jest recenzją manuskryptu przygotowanego do publikacji oraz faktyczną oceną wkładu Doktorantki w publikacje, które się na nią składają. Ponadto Doktorantka była wykonawcą w trzech projektach: dwóch NCN oraz jednego z macierzystej jednostki, sama uzyskała minigrant doktorancki na swoje badania, prezentowała 4-krotnie w formie ustnej prezentacji wyniki swoich badań i 13-krotnie w formie posterów. Powyższe aktywności Doktorantki świadczą o jej pracowitości i zaangażowaniu w prace związane z poruszaną tematyką a także umiejętności współpracy w zespole.

Rozprawa doktorska mgr Martyny Baranek-Grabińskiej rozpoczyna się od teoretycznego wstępu. Doktorantka w oparciu o najnowsze dane literaturowe wprowadziła czytelnika w tematykę, uzasadniając jednocześnie konieczność podjęcia danej tematyki badawczej. Kwestia różnych funkcji ludzkich kanałów VDAC, obecnej wiedzy na temat ich regulacji i różnych funkcji reszt cysteiny w tych białkach mogłaby być

rozwinęta bardziej, szczególnie, że VDAC2 i VDAC3 są bogate w reszty cysteiny i wydaje się, że ich funkcje są odmienne; co jest bardzo ciekawe.

Doktorantka jasno sprecyzowała cele swojej rozprawy, którymi było i) określenie występowania u bezkręgowców wariantu redoks-wrażliwego rsVDAC, i powiązanie jego występowania z ich środowiskiem i trybem życia; ii) charakterystyka funkcjonalności hVDAC1, hVDAC2 i hVDAC3 w komórkach drożdży pozbawionych genów *POR1* i *POR2* dla ich przeżywalności; iii) określenie wpływu eliminacji obu dysmutaz ponadtlennokowych Sod1 i Sod2 na przeżywalność komórek skonstruowanego modelu drożdżowego w warunkach heterologicznej ekspresji hVDAC1, hVDAC2, hVDAC3 i hVDAC3ΔCys oraz charakterystyka fizjologii mitochondriów i poziomu anionorodnika ponadtlennokowego (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>).

Wyniki uzyskane w publikacjach, które stanowią podstawę rozprawy mgr Martyny Baranek-Grabińskiej, zostały przedstawione w rozdziale **Główne tezy i osiągnięcia rozprawy doktorskiej**. Każdy z podrozdziałów, opisujący 3 artykuły naukowe, zawiera sprecyzowane cele / pytania badawcze, zastosowane podejście badawcze oraz opis wyników i wniosków i stanowi streszczenie 3 publikacji. Informacja o zaangażowaniu Doktorantki w każdą z prac zawarta jest w oświadczeniach współautorów dołączonych do każdej pracy odrębnie, w tym oświadczenie Doktorantki.

**W publikacji pierwszej** Doktorantka wraz z Zespołem przedstawia wyniki analizy obecności paralogów VDAC w różnych organizmach, ich ilości, obecności redoks-wrażliwego kanału VDAC w relacji do stylu życia. Ciekawą zależnością zaobserwowaną przez Autorów jest obecność jednej formy VDAC i zwykle redoks-wrażliwej u organizmów pasożytniczych, co sugeruje, że kanał VDAC może pełnić kluczową rolę w detekcji i adaptacji do stresu oksydacyjnego generowanego przez środowisko życia, tutaj organizm gospodarza, który broniąc się przed patogenem wykorzystuje różne mechanizmy, w tym ekspozycje patogenu na reaktywne formy tlenu. Udział Doktorantki w tej pracy nie był wiodący i limitował się do udziału w tworzeniu bazy danych, analizie struktur białek VDAC i redagowaniu części manuskryptu.

**W publikacji drugiej** Doktorantka otrzymała szczep w tle BY4741 (z mutacją w genie *MET15*) do konstrukcji podwójnego mutantu *por1Δ por2Δ* do badań efektów fenotypowych funkcji hVDAC1-3 oraz hVDAC3ΔCys. Eksperymenty przeprowadziła równolegle w szczepie w tle M3 *por1Δ por2Δ*, uprzednio używanym przez inne zespoły prowadzące podobne badania, w którym występuje gen *MET15* typu dzikiego. Do genomów obu szczepów w locus genu *POR1* wintegrowała sekwencje kodujące ludzkie białka hVDAC1-3 i hVDAC3ΔCys a następnie badała ich funkcjonalność poprzez analizę wzrostu w porównaniu do mutantów *por2Δ* i *por1Δ por2Δ*. Udział Doktorantki był wiodący w części eksperymentalnej pracy, a także, konsekwentnie, w części redakcyjnej już opublikowanego manuskryptu.

**W trzeciej pracy** (manuskrypt przygotowany do publikacji w *BBA-Bioenergetics*), Doktorantka postanowiła sprawdzić funkcjonalność ludzkich białek hVDAC1-3, w tym hVDAC3ΔCys, w warunkach endogenego stresu oksydacyjnego generowanego brakiem obu dysmutaz ponadtlennokowych Sod1 i Sod2, nie limitując się do wzrostu, ale badając wybrane parametry fizjologiczne funkcjonowania mitochondriów jak zużycie tlenu czy potencjał na błonie wewnętrznej oraz morfologię sieci mitochondrialnej. Na podstawie udostępnionych oświadczeń współautorów manuskryptu można wywnioskować, że jej wkład jest znaczący, bowiem obejmuje stworzenie szczepów modelowych, testy fenotypowe, analizę aktywności mitochondriów i zbadanie poziomu anionorodnika ponadtlennokowego.

Rozprawę zamyka podsumowanie osiągnięć naukowych, w którym zebrano najważniejsze wyniki, sformułowano uprawnione wnioski zgodnie z założonymi celami.

Do najistotniejszych wyników uzyskanych przez Doktorantkę można zaliczyć:

- poprzez jej udział w utworzeniu bazy danych białek VDAC u różnych organizmów i analizie obecności rsVDACs - uzyskanie ciekawych wniosków korelujących obecność rsVDACs ze stylem życia, szczególnie w organizmach patogennych;
- uzyskanie szczepów modelowych *por1Δ por2Δ* w tłach genetycznych BY4741 i M3 wyrażających z locus genomowego genu *POR1* ludzkie paralogi VDAC1-3 oraz VDAC3 pozbawiony reszt cysteiny i analiza ich funkcjonalności w kontekście komplementacji fenotypów wzrostowych szczepu *por1Δ por2Δ*;

- charakterystyka fizjologii mitochondriów w komórkach szczepu BY4741 *por2Δ* i *por2Δ sod1Δ sod2Δ* wyrażających ludzkie paralogi VDAC1-3;
- wykazanie, że funkcje paralogów hVDAC1-3 w komórkach drożdży są różne w procesie fosforylacji oksydacyjnej (wszystkie prowadzą do obniżonego potencjału na błonie wewnętrznej) i generowania ROS (bo tylko hVDAC1 i hVDAC2 prowadzą do zwiększonej ilości anionorodnika ponadtlenkowego);
- wykazanie funkcji redoks białka ludzkiego VDAC3, która zależy od reszt cysteiny w tym białku i koreluje z komplementacją fenotypu komórek *por2Δ sod1Δ sod2Δ*, przyczyniając się do utrzymania niskiego poziomu anionorodnika ponadtlenkowego, oraz większego zużycia tlenu w warunkach fosforylacji oksydacyjnej (ale nie poprawy potencjału na błonie wewnętrznej mitochondriów).

Praca doktorska mgr Martyny Baranek-Grabińskiej została przygotowana bardzo starannie. Zawiera jedynie drobne potknięcia edytorskie, nieliczne błędy redakcyjne, jak np. określenie „fermentujące” źródło węgla, które jest raczej „fermentacyjne”, czy „uzyskanie wysokiego poziomu H<sub>2</sub>S można uzyskać”. Znalazły się też nieliczne błędy nomenklaturowe – np. nazwy białek u drożdży pisane są z dużej litery a pozostałe literki nazwy małymi literami, nie tak jak u ludzi, gdzie całą nazwę pisze się dużymi literami, podczas gdy nazwy genów typu dzikiego dużymi literami i kursywą u drożdży i u ludzi. Błędy te nie mają istotnego wpływu na wartość naukową pracy.

Po analizie rozprawy nasunęło mi się kilka spostrzeżeń oraz pytań, względem których chciałabym aby Doktorantka odniosła się podczas obrony:

- Dlaczego to hVDAC3 ma przypisaną rolę czujnika stanu redoks w komórkach człowieka a nie hVDAC2, który ma o 3 reszty cysteiny więcej? Z czego to wynika? Jaka jest rola cystein w hVDAC2 – proszę o komentarz.
- Utrudnieniem w analizie wyników jest brak wszystkich wariantów szczepów na każdej rycinie. To jest ogólna uwaga, która mi się nasuwa i powtarza się w całej rozprawie.

#### **Publikacja 2:**

- W jaki sposób można byłoby zbadać hipotezę, że różnice w możliwości komplementacji fenotypu mutantów BY4741- $\Delta por1\Delta por2$  i M3- $\Delta por1\Delta por2$  przez hVDAC3 zależą od stanu utlenienia reszt cysteiny? To wyjaśnienie jakie Doktorantka formułuje, bazując na danych literaturowych, być może łatwe do sprawdzenia eksperymentalnie.
- Czy rozważano użycie BY4742 zamiast albo równolegle do szczepu M3, gdyż ten szczep byłby idealnym porównaniem do efektów heterologicznej ekspresji ludzkich VDACS w BY4741? Czy testy komplemetacji w BY4742 przez hVDACS były robione – jeśli tak to jak się mają w porównaniu do tła M3? Również czy sprawdzano fenotyp wzrostu wszystkich badanych szczepów w obecności nadtlenu wodoru?
- Dlaczego wybrano substytucje reszt cysteiny do reszt alaniny a nie seryny?
- Jak eksperymentalnie Doktorantka zweryfikowałaby swoje wyjaśnienie: „Sugeruje to, że w obecności *MET15*, reszty cysteiny w hVDAC3 mogą w sprzyjających warunkach ulec utlenieniu, co może utrudniać bramkowanie kanału tworzonego przez to białko.”? To stwierdzenie jest sprzeczne z modelem w manuskrypcie nr 3, na rycinie 8,: „hVDAC3, when oxidized, remains fixed in the open state, allowing continuous passage of metabolites”. Proszę o wyjaśnienie, czy tu się pojawił błąd?
- Na Ryc. 3E brakuje mi dwóch szczepów kontrolnych WT i podwójnych mutantów  $\Delta por1\Delta por2$ . Są one na Ryc. 2 niemniej to kontrole, które zawsze powinny być na jednej szalce i tak samo traktowane jak badane szczepy. Zakładam, że w tle BY4741 ekspresja hVDACS powodowała wzrost zależny od oddychania jak szczepu typu dzikiego. Czy słusznie?
- Na tej samej Ryc. 3 komplementacja wzrostu oddechowego w temperaturze permissywnej przez hVDAC2 jest taka jak hVDAC3 $\Delta$ Cys, efekt odwrotny do warunków w temperaturze restrykcyjnej. Jak Doktorantka to interpretuje? Brak dyskusji tego wyniku.

#### **Publikacja 3:**

- Ryc. 2B – czy dla wszystkich hodowli pomiary OD<sub>600</sub> wykonywano na 10-krotnie rozcieńczonych hodowlach? Gęstość hodowli szczepów w tle  $\Delta sod1\Delta sod2$  była bardzo niska, rozcieńczenie generowałoby duży błąd pomiaru.

- brak informacji o warunkach hodowli komórek w eksperymentach oznaczania poziomu  $O_2^-$ , badania sieci mitochondrialnej i potencjału błony wewnętrznej. Pomiary na komórkach z pożywki glicerolowej byłyby trudne, bo te komórki praktycznie nie rosną, niemniej taka informacja jest w rozdziale opisującym metodykę pomiarów zużycia tlenu? Dobrym rozwiązaniem byłaby pożywka z galaktozą. Proszę o uzupełnienie. W jaki sposób uzyskano aż OD = 4 komórek do pomiarów zużycia tlenu przy tak słabym wzroście?

- Ryc. 4B – w mojej ocenie mutant *por1Δ por2Δ* nie ma obniżonego potencjału na błonie. Tło pochodzące z mCherry jest na podobnym poziomie w tym mutancie co w szczepie kontrolnym bez CCCP w ref. 15. Jednocześnie dla szczepów *por1Δ por2Δ yVDAC1* oraz *hVDAC1*, *hVDAC2*, i *hVDAC3*, o podobnym a nawet większym poziomie tła mCherry jak w komórkach mutantu *por1Δ por2Δ* Autorzy wnioskuje, że potencjał na błonie jest normalny. Dlaczego? Czy w szczepie *POR1 por2Δ* wykonane były pomiary potencjału sondą TMRM? Jakie są to wartości w porównaniu do szczepu *por1Δ::hVDAC1 por2Δ*?

Podsumowując, pomimo licznych pytań, uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa ma wysoką wartość naukową, jest pracą oryginalną. Cykl doświadczeń wykonanych w ramach tej pracy, którego celem było poszerzenie naszej wiedzy na temat funkcji białek VDAC, ze szczególną koncentracją na paralogu VDAC3 i jego redoks zależnej funkcji, jest logiczny i spójny, i został już częściowo poddany krytycznej ocenie przez ekspertów na etapie ich publikacji. Rozprawa doktorska, z którą miałam przyjemność się zapoznać wskazuje, że Pani mgr Martyna Baranek-Grabińska opanowała warsztat technik szczególnie genetyki i inżynierii genetycznej oraz biologii komórki drożdży a także w pewnym zakresie analizy bioinformatyczne. Brakuje mi doświadczenia z zakresu biochemii czy biologii molekularnej, m. in. techniki Western blot, która byłaby doskonałym uzupełnieniem przeprowadzonych badań zwłaszcza, że przeciwciała rozpoznające hVDAC3 i pozostałe paralogi są dostępne komercyjnie. Doktorantka zrealizowała postawiony cel swojej rozprawy, co wskazuje, że potrafi rozwiązywać problemy badawcze. Nie bez znaczenia w ocenie rozprawy jest liczna prezentacja wyników, szczególnie ustna.

Uważam, że recenzowana praca doktorska odpowiada wszystkim ustawowym wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 187 ust. 1-2 i art. 190 ust. 3 Ustawy z dn. 20.07.2018 r. Prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571). Na tej podstawie składam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Martyny Baranek-Grabińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. Dr hab. Róża Kucharczyk