

Warszawa, 26.02.2025r.

dr hab. Bogusz Kulawiak  
Pracownia Wewnątrzkomórkowych  
Kanałów Jonowych  
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
e-mail: b.kulawiak@nencki.edu.pl

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Martyzny Baranek-Grabińskiej pt. Udział ludzkich paralogów białka VDAC w przeciwdziałaniu skutkom stresu oksydacyjnego wywołanego brakiem dysmutaz wewnątrzkomórkowych.**

Przedstawiona do recenzji praca wykonana została pod kierunkiem prof. dr hab. Hanny Kmity oraz dr hab. Andonisa Karachitosa w Zakładzie Bioenergetyki Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Głównym celem pracy była rola ludzkich paralogów białka VDAC (kanału zależnego od napięcia zlokalizowanego w zewnętrznej błonie mitochondriów) jako sensora zmian stanu redoks w mitochondriach.

Regulacja oraz rola kanałów VDAC zlokalizowanych w zewnętrznej błonie mitochondrialnej jest przedmiotem intensywnych badań wielu grup badawczych. Temat dotyczący roli tych białek w regulacji stanu redoks w komórkach jest szczególnie interesujący biorąc pod uwagę kluczową funkcję tych białek w regulacji transportu metabolitów w poprzek zewnętrznej błony mitochondrialnej, czyli między mitochondriami a cytoplazmą. Regulacja aktywności kanałów VDAC jest kluczowa dla utrzymania prawidłowego funkcjonowania mitochondriów, w tym procesu fosforylacji oksydacyjnej będącym głównym źródłem ATP w komórkach. Prawidłowa regulacja, tych procesów jest niezbędną dla funkcjonowania komórek i tkanek. Ludzkie białka rodziny VDAC obejmują trzy warianty tego kanału hVDAC1, hVDAC2 i hVDAC3. Regulacja aktywności tych kanałów w zależności od stanu redoks mitochondriów jest istotnym tematem badań podejmowanych w ostatnim czasie. Wiele wskazuje na to, że aktywność kanału hVDAC3, może być zależna od stanu redoks i przez to odpowiedzialna za pełnienia roli czujnika zmian związanych np. ze stresem oksydacyjnym. Tematyka badawcza podjęta w niniejszej pracy wpisuje się zatem w aktualny trend badań nad funkcją mitochondriów oraz ich udziałem w mechanizmach cytoprotekcyjnych.

Z uwagi na fakt, że duża część uzyskanych w trakcie realizacji pracy wyników została opublikowana praca nie została przedstawiona w klasycznym układzie jednolitej pracy doktorskiej, a jej główną część stanowią publikacje eksperymentalne, których współautorką

jest Doktorantka. Rozprawę otwiera streszczenie oraz życiorys naukowy w syntetyczny sposób pokazujący aktywność naukową Doktorantki. Życiorys zawiera listę prac składających się na rozprawę doktorską oraz listę osiągnięć naukowych a także pokazuje udział w konferencjach i zjazdach naukowych. W dalszej części zaprezentowany jest cel pracy, krótki wstęp oraz syntetyczny opis wyników rozprawy doktorskiej. Zasadniczą część pracy stanowi zestaw prac eksperymentalnych składających się na recenzowaną rozprawę. Uważam, że wybór takiej formy pracy za uzasadniony i w mojej ocenie pozwala na obiektywną ocenę osiągnięć Doktorantki.

Główny cel rozprawy jest jasno sformułowany i składa z trzech części. Celami pracy było określenie występowania wariantów białek VDAC u bezkręgowców potencjalnie będących sensorami stanu redoks, uzyskanie nowych modeli drożdżowych służących do ekspresji ludzkich paralogów białek VDAC oraz zbadanie wpływ tła genetycznego drożdży. Ponadto podjęto próbę określenia funkcji tych paralogów w przeciwdziałaniu stresu oksydacyjnemu.

Poszczególne cząstkowe cele rozprawy odpowiadają poszczególnym pracom eksperymentalnym. Układ tych prac jest logiczny i bardzo dobrze prowadzi czytelnika przez studiowane zagadnienia. Dwie pierwsze publikacje ukazały się w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Pierwsza we *Frontiers in Physiology*, druga w *International Journal of Molecular Sciences* a trzecia praca została załączona jako manuskrypt przygotowany do wysłania do czasopisma *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*. Wszystkie trzy czasopisma są uznane i rozpoznawalne. Mimo pewnych kontrowersji związanych z wydawnictwem MDPI (wydawcą IJMS) trzeba podkreślić, że czasopismo to jest jednym z najstarszych i chyba najbardziej rozpoznawalnym w puli tego wydawcy. Doktorantka jest pierwszym autorem w pracach eksperymentalnych (publikacje nr 2 i 3) oraz trzecim autorem (z czterech) w publikacji nr 1. Wkład Doktorantki i pozostałych autorów jest ponadto wskazany w załączonych oświadczeniach.

Elementem wprowadzającym w tematykę pracy doktorskiej jest krótki, ponad trzy stronicowy wstęp. Po wstępie następuje opis głównych tez i uzyskanych wyników zaprezentowanych w dołączonych pracach.

Wstęp w jasny, syntetyczny i konkretny sposób przedstawia podstawowe zagadnienia związane z funkcjonowaniem mitochondriów, funkcji dysmutaz ponadtlenkowych w regulacji homeostazy redoks oraz budowy i funkcji białek z rodziny VDAC. Z uwagi na formę pracy, której główną częścią są publikacje zawierające własny wstęp do danej pracy rozumiem i akceptuję zaprezentowaną formę wstępu. Pomimo krótkiej formy, wstęp pozwala na zorientowanie się i zrozumienie idei pracy. Całość napisana jest dobrym językiem bez większych błędów stylistycznych. Myślę jednak, że można było nieco dokładniej opisać pewne zagadnienia. Dotyczy to na przykład mechanizmu syntezy reaktywnych form tlenu w mitochondriach, a w szczególności wytłumaczyć dlaczego reaktywne formy tlenu mogą być wydzielane do przestrzeni międzymbłonowej i macierzy mitochondrialnej. Ponadto wydaje mi się, że więcej miejsca można było poświęcić roli  $H_2S$  jako regulatora funkcji mitochondriów i homeostazy redoks. Oba wątki są istotnymi elementami pracy, przewijają się w załączonych publikacjach i

z tego względu ich lepszy opis byłby wskazany we wstępie lub w części komentującej uzyskane wyniki zaprezentowane w załączonych publikacjach. Jednak mimo tych drobnych zastrzeżeń całość oceniam pozytywnie.

Podobnie do wstępu opis uzyskanych wyników zaprezentowany w formie krótkich streszczeń dołączonych prac jest napisany klarownie i w jasny sposób tłumaczy cel, metodykę i wnioski płynące z uzyskanych danych.

Pierwsza z zaprezentowanych prac skupia się na analizie ewolucji oraz obecności form VDAC wrażliwych na zmiany stanu redoks (rsVDAC) w różnych organizmach, z uwzględnieniem roli tego białka jako czujnika warunków środowiskowych. Jest to praca wykorzystująca analizy bioinformatyczne pozwalające na analizę ekspresji różnych wariantów białek VDAC, wskazanie różnic i podobieństw między tymi białkami występującymi w organizmach zamieszkujących różne środowiska. Autorzy dochodzą do wniosku, że białko VDAC może pełnić rolę czujnika stanu redoks a w przypadku współwystępowania kilku wariantów tego białka rolę czujnika prawdopodobnie pełni jeden z nich. Praca stanowi bardzo dobry punkt wyjścia do kolejnych prac eksperymentalnych. Domyślam się, że była ona bardzo cennym etapem pozwalającym Doktorantce dobrze zrozumieć badane zagadnienie.

Druga praca, w której doktorantka jest pierwszym autorem została opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*. W pracy opisano przygotowanie nowych modeli drożdżowych pozbawionych jednocześnie białek  $\gamma$ VDAC1 i  $\gamma$ VDAC2. W uzyskanych modelach ekspresjonowano następnie ludzkie paralogi białka VDAC w celu zweryfikowania ich zdolności do komplementacji uzyskanego fenotypu. Wszystkie trzy paralogi były w stanie komplementować fenotyp delecyjny, jednak zdolność ta w dużej mierze zależała od tła genetycznego drożdży. Zauważono też, że zdolność hVDAC3 jest zależna od modyfikacji cystein co sugeruje, że może on działać jako sensor redoks. Wiele wskazuje na to, że zdolność białka hVDAC3 do komplementacji jest zależna od poziomu  $H_2S$  i obecności cystein. Model drożdżowy zaproponowany przez autorów może być cennym narzędziem do badań nad mechanizmami regulacji kanałów VDAC w warunkach stresu oksydacyjnego.

Jak wspomniano wyżej podstawą dla opracowania modelu badawczego były drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Model drożdżowy jest często wykorzystywany do studiowania funkcji mitochondriów, ich biogenezy czy badań bioenergetycznych z uwagi na relatywną łatwość dokonywania manipulacji genetycznych oraz szybki wzrost. Wykorzystanie modeli drożdżowych pozwala na analizę podstawowych funkcji białek pochodzących z różnych organizmów a jednocześnie pozwala na uniknięcie technicznych komplikacji związanych z wykorzystaniem modeli opartych o komórki ssacze. Z tego punktu widzenia, uważam, że dobór modelu badawczego jest jak najbardziej uzasadniony.

W trzeciej pracy, której pierwszym autorem jest Pani mgr Martyna Baranek-Grabińska podjęto się próby zbadania roli ludzkich białek VDAC w modelach drożdżowych pozbawionych dwóch dysmutaz ponadtlenkowych SOD1 i SOD2 lokalizujących w mitochondriach. Oba białka pozwalają na efektywną eliminację anionorodników ponadtlenkowych powstających w mitochondriach, a ich brak skutkuje stresem oksydacyjnym i zwiększoną cytotoxycnością. W

niniejszej pracy autorzy podjęli próbę uzyskania mutantów pozbawionych obu enzymów w celu indukcji stresu oksydacyjnego. Skutkowało to ograniczeniem wzrostu uzyskanych mutantów. Następnie weryfikowano zdolność ludzkich paralogów białka VDAC jako elementów szlaków cytoprotekcyjnych mogących ograniczać efekty cytotoksyczne wynikające z zaburzonej homeostazy redoks. Ponadto monitorowano wpływ tych paralogów na funkcje mitochondriów takich jak zmiany potencjału błonowego czy szybkości oddychania, a także poziom reaktywnych form tlenu.

Autorzy jasno pokazują, że ludzki paralog hVDAC3 pozwala na dostosowanie się do sytuacji skutkującej stresem oksydacyjnym. Ekspresja paralogów hVDAC1 i hVDAC2 skutkuje obniżonym wzrostem w porównaniu do sytuacji gdy komórki ekspresjonują paralog hVDAC3. Co istotne mutageneza tego paralogu pozbawiająca białko cystein powodowała znaczące ograniczenie wzrostu uzyskanych mutantów. Obecność białka hVDAC3 skutkowała obniżeniem poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach pozbawionych obu dysmutaz. Badania skupiające się na funkcji mitochondriów, w tym potencjału błonowego czy morfologii mitochondriów również wskazały na kluczową rolę białka hVDAC3. Doceniam uwzględnienie w prezentowanych publikacjach schematów tłumaczących rolę białka hVDAC3 w regulacji zależnej od stanu redoks.

Uważam, że zaprezentowana praca doktorska jest ciekawa i inspirująca. Prezentacja pracy w oparciu o publikacje powoduje, że zapewne nie wszystkie uzyskane dane zostały uwzględnione w omawianej rozprawie. Skłoniło mnie to do pewnych przemyśleń i zadania kilku pytań dotyczących prezentowanych prac. Wynikają one również z własnych doświadczeń i zainteresowań naukowych.

1. W jaki sposób wytypowano gRNA mający na celu wprowadzenie mutacji skutkujących usunięciem  $\gamma$ VDAC1 oraz białek SOD1 i SOD2; czy wzięto pod uwagę możliwość oddziaływania zaprojektowanych gRNA w innych fragmentach DNA (tzw. off-targety) i w związku z tym uszkodzeniem/dysfunkcją innych genów?

2. W publikacji nr 2 wskazano na zauważalną różnicę we wzroście między uzyskanymi mutantami w zależności od tła genetycznego. Chciałem zapytać się o różnicę we wzroście podwójnego mutantu  $\Delta$ por1/ $\Delta$ por2 w porównaniu do szczepu  $\Delta$ por1 (Figura 2). Czy uzyskano jedynie jeden czy więcej klonów, a jeśli tak to czy wszystkie klony wykazują ten sam fenotyp?

3. Wykazano, że ekspresja paralogów hVDAC, w szczególności hVDAC3 w różny sposób wpływa na wzrost badanych szczepów. Wydaje się, że zastosowane podejście eksperymentalne powinno skutkować podobnym poziomem ekspresji wszystkich wprowadzonych paralogów jednak nasuwa się pytanie o rzeczywisty poziom białka w badanych komórkach. Czy porównywano poziomy paralogów hVDAC, w tym hVDAC3 typu dzikiego oraz mutantu  $\Delta$ Cys na poziomie białkowym w różnych szczepach?

4. Czy podjęto próbę zbadania bezpośredniego wpływu  $H_2S$  na aktywność hVDAC3 i jego mutantów cysteinowych?

5. W zaprezentowanym modelu sugeruje się, że N-koniec hVDAC3 oddziałuje z cysteinami wewnątrz kanału. Wiadomo, że w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej oraz błonie wewnętrznej mitochondriów występują białka wrażliwe na zmiany stanu redoks. Wiemy też, że wiele białek mitochondrialnych oddziałuje ze sobą tworząc mniej lub bardziej trwałe kompleksy białkowe. Czy należy wykluczyć oddziaływanie z innym białkiem/białkami, które miałyby wpływ na aktywność hVDAC3 jako sensora redoks?

6. Czy rozważano zastosowanie w otrzymanych modelach inhibitorów łańcucha oddechowego w celu indukcji stresu oksydacyjnego (np. z wykorzystaniem antymycyny A)? Być może pozwoliłoby to na obserwację roli hVDAC3 i jego mutantów cysteinowych w sytuacji nagłej deregulacji homeostazy redoks w mitochondriach i byłoby komplementarne do modeli z trwale indukowanym stresem oksydacyjnym?

7. Na koniec chciałem zadać pytanie o przyszłość - czy rozważano weryfikację uzyskanych wyników w modelach opartych o komórki ssacze? W mojej opinii opanowanie techniki CRISPR/Cas9 zaprezentowane w niniejszej pracy daje taką realną perspektywę.

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Martyny Baranek-Grabińskiej jest napisana dobrze, otrzymane wyniki są interesujące a uzyskane modele badawcze mogą być z powodzeniem wykorzystywane w badaniach roli ludzkich białek z rodziny VDAC. Dobór modeli oraz metod badawczych umożliwił realizację założonych celów badawczych. Zgłoszone uwagi i komentarze nie rzutują na moją bardzo wysoką ocenę pracy.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr Martyny Baranek-Grabińskiej pt. „Udział ludzkich paralogów białka VDAC w przeciwdziałaniu skutkom stresu oksydacyjnego wywołanego brakiem dysmutaz wewnątrzkomórkowych” spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ust. 1-2 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku i wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Martyny Baranek-Grabińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Bogusz Kulawiak

