



Dr hab. Nina Antos-Krzemińska, Prof. UAM
Zakład Bioenergetyki IBMiB, Wydział Biologii UAM
nina.antos@amu.edu.pl

Poznań, 5.03.2025

Recenzja pracy doktorskiej

Praca doktorska przedstawiona przez **Panią mgr Shur Karolinę Galecką** zatytułowana „**Mitochondrialny kanał potasowy typu BK_{Ca} o dużym przewodnictwie aktywowany jonami wapnia – budowa i interakcje**”.

Mitochondria to organelle fundamentalne dla szeregu procesów metabolicznych, ważnych dla utrzymania homeostazy energetycznej całej komórki. Kluczową ich rolą jest generowanie potencjału transmembranowego, który jest wykorzystywany do syntezy ATP lub transportu różnych cząsteczek. Równowaga redoks w mitochondriach zapobiega zarówno całkowitemu rozproszeniu potencjału, jak i generowaniu reaktywnych form tlenu w sytuacji wytworzenia się bardzo wysokiego potencjału. Regulacja potencjału jest możliwa dzięki tak zwanym systemom rozpraszania energii, które umożliwiają drobne zmiany wartości potencjału. Tę subtelną modulację zapewniają, wśród innych białek, mitochondrialne kanały potasowe m.in. mito BK_{Ca}, czyli kanał K⁺ o wysokim przewodnictwie aktywowany przez wapń - główny przedmiot badań w niniejszej pracy.

Głównymi celami pracy doktorskiej były:

1. weryfikacja hipotezy mówiącej, że izoforma VEDEC podjednostki α może tworzyć kanał mitoBK_{Ca}. Izoforma ta, będąca produktem alternatywnego składowania produktu genu KCNMA1, kodującego kanały BK_{Ca} zlokalizowane w błonie plazmatycznej, jest kierowana do mitochondriów. Jednakże brak było bezpośrednich dowodów, że białko to tworzy funkcjonalny kanał w mitochondriach.
2. próba identyfikacji nowych partnerów białkowych podjednostki regulatorowej $\beta 4$ kanału BK_{Ca} przy wykorzystaniu techniki biotynylacji przez ligazę TurboID.

Aby osiągnąć te cele, doktorantka wykorzystwała zestaw wielu technik, zarówno z zakresu szeroko pojętej biologii molekularnej i biochemii, jak przygotowanie niektórych wektorów plazmidowych, przejściowa transfekcja linii komórkowych z zastosowaniem

wektorów kodujących podjednostki kanału BK_{Ca}, BN-PAGE lub SDS-PAGE, a następnie immunodetekcja, jak i metod elektrofizjologicznych, takich jak patch-clamp błony wewnętrznej mitochondriów oraz technik obrazowania przy użyciu mikroskopu konfokalnego. W przeprowadzonych eksperymentach zastosowała odpowiednie metody eksperymentalne obejmujące hodowlę linii komórkowych, izolację mitochondriów, czy też koimmunoprecypitację. Wyniki zostały uzyskane dzięki wielu dobrze zaprojektowanym i pracochłonnym eksperymentom. Ich istotność została potwierdzona metodami statystycznymi.

Opisane przez autorkę wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Izofirma VEDEC może tworzyć funkcjonalny kanał typu mitoBK_{Ca}, gdyż przy użyciu techniki patch-clamp zarejestrowano obecność kanału o charakterystyce kanału potasowego o dużym przewodnictwie aktywowanego jonami wapnia w mitochondriach komórek HEK293T po przejściowej transfekcji plazmidem zawierającym gen kodujący izofর্মę VEDEC kanału mitoBK_{Ca}. Ponadto, obserwowany kanał ulegał regulacji przez modulatory kanału mitoBK_{Ca}. Stwierdzono częściową lokalizację tego kanału we frakcji mitochondrialnej.

Dowiedziano również, że komórki HEK293T stanowią nowy model badawczy możliwy do wykorzystania w badaniach mitochondrialnych kanałów potasowych.

2. Podjednostka $\beta 4$ kanału BK_{Ca} oddziałuje z licznymi białkami w wielu organelach komórkowych, jednakże nie potwierdzono jednoznacznie interakcji tej podjednostki z białkami łańcucha oddechowego. Stwierdzono, że białko TMX1 tworzy kompleksy z podjednostką regulatorową ($\beta 4$). Wykazano jednocześnie, że białko TMX1 może wchodzić w interakcję również z podjednostką α (VEDEC) kanału BK_{Ca} co sugeruje interakcję całego kanału z tym białkiem.

Rozprawa przedstawia wyniki o dużej wartości naukowej i jest poprawnie napisana pod względem formalnym. Wstęp przygotowuje czytelnika do zrozumienia dalszej części pracy. W tej obszernej rozprawie omówiono zastosowane Materiały i metody, szczegółowo przedyskutowano uzyskane Wyniki, wskazano kierunki dalszych badań, a w Podsumowaniu i wnioskach przedstawiono najważniejsze uzyskane rezultaty. Dyskusja jest starannie przemyślana i wyważona.

Praca jednakże zawiera, szczególnie we Wstępie, pewne błędy składniowe i leksykalne, także literówki. Myślę, że można było wykonać staranniejszą korektę tekstu.

Recenzent byłby również wdzięczny za udzielenie odpowiedzi na następujące pytania i ustosunkowanie się do uwag:

1. W Materiałach i Metodach autorka podaje opis reakcji PCR, gdzie ilość składników mieszaniny reakcyjnej podano w objętościach, a powinno być podane w stężeniach roboczych. Ponadto, doktorantka informuje, że żele agarozowe do rozdzielania produktów PCR miały stężenie 0,7-1%, co wydaje się być nielogiczne, biorąc pod uwagę rozdział tak krótkich produktów (100-300 pz). W tym przypadku powinien być przygotowany żel ~2%.

2. W eksperymencie analizy ekspresji genów kodujących podjednostkę $\beta 4$ w liniach komórkowych HEK293T i astrocytoma U87 w opisie rysunku 29 podano spodziewane długości produktów: ścieżka 1/2 (118/119, 168 pz), ścieżka 3/4 (104/105, 278 pz). Jednak recenzent stwierdza tu pewną niespójność, ponieważ produkty przedstawione na zdjęciu po pierwsze są dość mocno rozmyte, co może świadczyć o niespecyficznym amplifikacji, a po drugie mają inne wielkości od podanych w opisie. Czy można to wyjaśnić? Czy została przeprowadzona kontrola dla poszczególnych par starterów bez matrycy? Ponadto, na wszystkich prezentowanych żelach nie pokazano ścieżki z markerem masy, co jest nieprawidłowością w odniesieniu do właściwej praktyki laboratoryjnej.

3. Odnośnie analizy ekspresji genów KCNMA1, izoformy VEDEC oraz KCNMB4 względem genów referencyjnych w reakcji RT-PCR, podawanie wartości Ct jako ostatecznych wartości ilościowych nie jest zalecane, ponieważ wartości Ct są dość abstrakcyjne. Sama wartość Ct jest niekompletna ilościowo, ponieważ interpretacja ilościowa wartości Ct zależy od wydajności fazy wykładniczej. Recenzent zdaje sobie sprawę, że wyniki z tej części pracy zostały opublikowane, co nie zmienia faktu, że lepiej byłoby zastosować analizę $\Delta\Delta Ct$. Ponadto, czy liczba $n=4$ dotyczy powtórzeń technicznych? Jeśli tak, czy było wykonane tylko jedno powtórzenie biologiczne?

4. Autorka badając występowanie w linii HEK293T podjednostki $\beta 4$ stwierdza, że przeciwciała firmy Proteintech znakowało prążek na żądanej wysokości (24 kDa), jedynie we frakcji zawierającej homogenat komórkowy. Recenzent nie jest przekonany o obecności tego prążka na kliszy. Dodatkowo, w całej pracy brak jest zdjęcia jakiegokolwiek membrany ze ścieżką z markerem masy. Recenzent jednocześnie zdaje sobie sprawę, że wyniki te nie miały istotnego znaczenia dla pracy i były tylko próbą sprawdzenia obecności podjednostki $\beta 4$ w komórkach HEK293T.

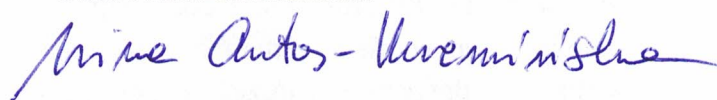
5. Na rysunku 40 doktorantka pokazuje zdjęcie kliszy po immunodetekcji z przeciwciałem anty-FLAG, gdzie znów marker masy zaznaczony po lewej nie koresponduje z opisem w tekście: znakowanie membrany przeciwciałem FLAG powinno wykazać obecność badanych białek na wysokości ~ 27 kDa dla $\beta 4$ -FLAG oraz ~ 62 kDa dla $\beta 4$ -FLAG-TurboID. Prążek $\beta 4$ -FLAG migruje na wysokości 35-40 kDa wg markera. Jak doktorantka tłumaczy tę rozbieżność?

6. W eksperymencie z zastosowaniem techniki patch-clamp w pipiecie pozostawał skrawek wewnętrznej błony mitochondrialnej tworząc konfigurację inside-out (strona zewnętrzna mitochondrium znajdowała się od strony elektrody pomiarowej, a strona macierzy mitochondrialnej skierowana była w stronę roztworu w szalce). Czy autorka mogłaby wyjaśnić sposób podawania aktywatora, który wg danych działa od strony zewnętrznej, czyli od strony elektrody pomiarowej? Doktorantka opisuje bowiem w Wynikach, że NS11021 podawano w czasie rejestracji kanału w buforze zawierającym $100 \mu M$ stężenie jonów wapnia, a jony wapnia przecież regulują kanał od strony wewnętrznej.

Powyższe pytania i komentarze nie umniejszają wartości naukowej rozprawy doktorskiej przedstawionej przez doktorantkę. Co więcej, w mojej opinii autorka wykazała się dobrym przygotowaniem zarówno teoretycznym, jak i eksperymentalnym. Podsumowując, eksperymenty przeprowadzone przez mgr Shur Karolinę Gałęcką opierają się na aktualnym

stanie wiedzy, a ich wyniki wnoszą istotny wkład w dziedzinę badań. Część wyników została opublikowana w czasopiśmie *Scientific Reports* z listy JCR z IF 3,8 (wg danych z 2023 roku). Omawiana rozprawa doktorska pokazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez autorkę pracy oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dowodzącego, że izoforma VEDEC może tworzyć funkcjonalny kanał typu mitoBK_{Ca} oraz, że białko TMX1, o aktywności reduktazy dwusiarczkowej, wchodzi w interakcję z tym kanałem. Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone przez art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie Pani mgr Shur Karoliny Gałęckiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Nina Antos-Krzemińska



Dr hab. n. med. Bartłomiej Szulczyk

Warszawa, 15.03.25

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Katedra i Zakład Farmakoterapii

i Opieki Farmaceutycznej

Ulica Banacha 1B, 02-097

Warszawa

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Shur Karoliny Gałęckiej

Pod tytułem:

„Mitochondrialny kanał potasowy typu BKCa o dużym przewodnictwie aktywowany jonami wapnia – budowa i interakcje”.

Aktywacja mitochondrialnego kanału potasowego typu BKCa zabezpiecza komórki przed negatywnymi efektami niedotlenienia, które ma miejsce na przykład podczas zawału serca lub udaru mózgu. Wspomniane patologie występują często i są obarczone dużą śmiertelnością. W związku z tym badania dotyczące mitochondrialnego kanału potasowego typu BKCa mają bardzo duże znaczenie.

Praca składa się z dwóch części. W pierwszej udowodniono, że izoforma VEDEC podjednostki α kanału BKCa tworzy funkcjonalny kanał w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Najpierw transfekowano komórki HEK293T plazmidem kodującym izoformę VEDEC a następnie przy pomocy techniki elektrofizjologicznej patch-clamp rejestrowano pojedyncze kanały z mitoplastów. Wykazano, że właściwości kinetyczne i farmakologiczne rejestrowanych kanałów są charakterystyczne dla kanałów BKCa. Zasugerowano również, że komórki HEK293T mogą stanowić model doświadczalny do badań mitochondrialnych kanałów potasowych. W drugiej części rozprawy doktorskiej zidentyfikowano potencjalnych partnerów białkowych podjednostki β kanału BKCa z wykorzystaniem techniki biotynylacji białek i spektrometrii mas. Ważnym rezultatem pracy jest wykazanie, że jednym z biotynylowanych białek było białko TMX1, którego interakcję z podjednostką β kanału BKCa potwierdzono przy pomocy koimmunoprecypitacji. Koimmunoprecypitacja wykazała także, że nie tylko podjednostka β ale również izoforma VEDEC podjednostki α kanału BKCa wchodzi w

interakcję z białkiem TMX1. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie postawionych problemów naukowych ponieważ wspomniane wyżej wyniki zostały opisane po raz pierwszy.

W jasno napisanym wstępie Doktorantka prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną dotyczącą tematyki pracy doktorskiej. W pierwszej części wstępu opisana została budowa i funkcja mitochondriów jak również różne podtypy kanałów potasowych znajdujących się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. W drugiej części natomiast opisano budowę, modulatory, interakcje oraz funkcje mitochondrialnego kanału potasowego typu BKCa o dużym przewodnictwie. Przeczytanie wstępu bardzo ułatwia zrozumienie całej pracy doktorskiej.

W metodyce bardzo szczegółowo scharakteryzowano techniki wykorzystane w pracy takie jak między innymi: patch-clamp, PCR, Western blot a także metody transfekcji, biotynylacji białek oraz koimmunoprecypitacji. Eksperymenty zostały wykonane wieloma metodami co bardzo wzmacnia całą pracę. Na uwagę zasługuje opanowanie przez doktorantkę trudnej technicznie metody elektrofizjologicznej patch-clamp.

Praca doktorska prezentuje dużą ilość wyników, które zostały zobrazowane na kilkudziesięciu dobrze skonstruowanych rycinach. Świadczy to o dużym nakładzie pracy doktorantki. Część wyników opisanych w pracy została opublikowana w prestiżowych międzynarodowych czasopismach. Przeczytanie metodyki i rezultatów pozwala stwierdzić, że Doktorantka wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Na początku dyskusji przeanalizowano podobieństwa kanału mitoBKCa rejestrowanego w niniejszej pracy do kanałów mitoBKCa z innych tkanek i narządów. Następnie przedyskutowano dostępne dane na temat budowy molekularnej mitochondrialnych kanałów potasowych. Przedyskutowano również zagadnienie importu kanałów potasowych do mitochondriów.

W drugiej części dyskusji omówiono potencjalne interakcje kanału mitoBKCa z białkami łańcucha oddechowego. Przedyskutowano również budowę, lokalizację w komórce i funkcję białka TMX1, którego interakcja z podjednostkami kanału BKCa została udowodniona przy użyciu techniki koimmunoprecypitacji. Omówiono również znaczenie i konsekwencje oddziaływania białka TMX1 z podjednostkami kanału BKCa.

Na uwagę zasługuje trafny i bardzo szeroki dobór literatury. W pracy doktorskiej zacytowano 279 publikacji co świadczy o dużym nakładzie pracy Doktorantki.

W ostatnim akapicie dyskusji Doktorantka pisze: „ Ponadto, białko TMX1 jest obiecującym celem terapeutycznym w kontekście chorób związanych z zaburzeniami homeostazy wapnia, stresem ER i nowotworami ”. W dyskusji zabrakło mi szerokiej odpowiedzi na pytanie w jaki sposób nowe leki działające na białko TMX1 mogłyby hamować rozwój wspomnianych chorób ? I kolejne pytanie,

jakie mogłoby być znaczenie interakcji białka TMX1 z podjednostkami kanału BKCa dla działania potencjalnych nowych leków wpływających na białko TMX1 ?

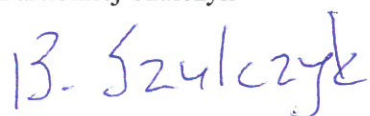
Na końcu pracy doktorskiej zaprezentowano tytuły prac, których współautorką jest Doktorantka. Nie podano jednak punktów Impact Factor i punktacji MNiSW wspomnianych prac. Taka informacja znacznie ułatwiłaby recenzję pracy doktorskiej.

Dyskusję podzielono na podrozdziały. Wyodrębnienie większej ilości podrozdziałów również ułatwiłoby czytanie dyskusji i w konsekwencji recenzję pracy.

W rezultatach na stronie 72 stwierdzono, że w badanych mitoplastach wyizolowanych z transfekowanych komórek obserwowano aktywność kanałową tylko w 12% rejestracji. W dyskusji zabrakło mi wyczerpującej odpowiedzi na pytanie dlaczego kanał mitoBKCa pojawiał się w tak niskim procencie rejestracji.

Powyższe pytania i uwagi nie zmieniają mojej bardzo pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej. Stwierdzam bez najmniejszych wątpliwości, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Shur Karoliny Gałęckiej **do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**

dr hab. n. med. Bartłomiej Szulczyk



**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**

ZAKŁAD BIOLOGII MOLEKULARNEJ KOMÓRKI

ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 62 49 | +48 71 375 62 73

fax +48 71 375 62 34

mitplant@ibmb.uni.wroc.pl | www.biotech.uni.wroc.pl

Wrocław, 31.03.2025 r.

Dr hab. Małgorzata Heidorn-Czarna
Zakład Biologii Molekularnej Komórki
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Shur Karoliny Gałeckiej „Mitochondrialny kanał potasowy typu BK_{Ca} o dużym przewodnictwie aktywowany jonami wapnia – budowa i interakcje”.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Shur Karoliny Gałeckiej została wykonana w Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie pod kierunkiem Pana dr hab. Bogusza Kulawiaka. Badania prowadzono w ramach projektu badawczego finansowanego z grantu Narodowego Centrum Nauki przyznanego w programie Sonata Bis dla dr hab. B. Kulawiaka.

Grupa badawcza Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN specjalizuje się od wielu lat w badaniach mitochondrialnych kanałów potasowych odnosząc w tej tematyce liczne sukcesy. Zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej kanały potasowe stanowią część mitochondrialnego cyklu jonów potasu. Kanały potasowe zostały odkryte w mitochondriach ponad 30 lat temu i od tego czasu badania dotyczące ich właściwości biofizycznych i farmakologicznych, regulacji aktywności, roli w ochronie komórek przed uszkodzeniami i funkcjonowaniu komórek nowotworowych stanowią niezwykle ważny wkład w opracowanie skutecznych terapii chorób człowieka. Wiedza o dostarczaniu podjednostek kanałów potasowych do różnych przedziałów komórki, mechanizmach leżących u podstaw roli ochronnej kanałów, ich oddziaływaniu z innymi białkami i znaczeniu tych oddziaływań jest wciąż mocno ograniczona.

Przedmiotem badań recenzowanej rozprawy doktorskiej jest mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany napięciem i aktywowany jonami wapnia BK_{Ca}. Wcześniejsze badania wykazały, że izoforma VEDEC podjednostki α kanału potasowego BK_{Ca} jest kierowana do mitochondrium, jednak nie było bezpośrednich dowodów na to, że białko to tworzy funkcjonalny kanał w mitochondriach. W swej rozprawie Doktorantka podjęła się weryfikacji czy izoforma VEDEC podjednostki α kanału potasowego BK_{Ca} tworzy funkcjonalny kanał w mitochondriach komórek człowieka oraz identyfikacji partnerów białkowych podjednostki β kanału BK_{Ca} w całych komórkach i mitochondriach. Zagadnienia podjęte przez Panią Shur Gałecką są zatem aktualne i ważne, a otrzymane w trakcie realizacji rozprawy wyniki są w pełni oryginalne i nowatorskie. Na uwagę zasługuje fakt, że część wyników przedstawionych w pracy doktorskiej została opublikowana w formie oryginalnej pracy eksperymentalnej w czasopiśmie *Scientific Reports* (2021 r.), w której Pani mgr Shur Gałecka jest pierwszym (równorzędnym) autorem.

Ocena formalna

Rozprawa doktorska Pani mgr Shur Gałeckiej została przygotowana w języku polskim i pod względem strukturalnym nie odbiega od ogólnie przyjętego układu tego typu opracowań.



Rozprawa składa się z następujących rozdziałów: streszczenia w języku polskim i angielskim, bardzo starannie przygotowanego spisu używanych skrótów, wstępu, założeń i celów pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, podsumowania i wniosków oraz spisu literatury. Na końcu pracy umieszczone zostały w formie załączników dwie tabele zawierające zidentyfikowane w eksperymentach TurboID białka.

Dwudziestoosiemiostronicowy Wstęp zawiera wszystkie niezbędne informacje, by wprowadzić czytelnika w temat rozprawy i czyta się go z zainteresowaniem. Lektura tej części rozprawy nie pozostawia wątpliwości, że Doktorantka posiada dużą wiedzę w zakresie fizjologii mitochondriów, zwłaszcza w zakresie problematyki mitochondrialnych kanałów potasowych. Kilka samodzielnie przygotowanych przez Doktorantkę rycin ilustruje omawiane zagadnienia.

Założenia i główne cele badawcze zostały jasno i precyzyjnie zdefiniowane: zamiarem Doktorantki była weryfikacja hipotezy mówiącej o tworzeniu funkcjonalnego kanału mitoBK_{Ca} przez izoformę VEDEC oraz identyfikacja partnerów białkowych kanałów BK_{Ca} w komórce i w szczególności w mitochondriach.

Rozdział Materiały i Metody to również 28 stron szczegółowo przedstawionych metod biologii molekularnej i komórkowej, biochemii i biofizyki. Różnorodność wykorzystanych technik jest bardzo duża, a zastosowane w przedstawionej rozprawie podejścia badawcze zostały odpowiednio dobrane do założonych celów. Wykorzystane w badaniach wektory genetyczne opisano ze szczegółami, uzupełniając informacje mapą danego plazmidu. Opisy niektórych bardziej złożonych doświadczeń proteomicznych i elektrofizjologicznych zostały uzupełnione przez Doktorantkę o samodzielnie przygotowane schematy. Informacje, które zawarte są w tym rozdziale, umożliwią w przyszłości powtórzenie eksperymentów przez niezależne grupy badawcze. Zabrakło mi w tym miejscu jedynie zbiorczej informacji o zastosowanych przeciwciałach – źródle ich pochodzenia i stosowanym rozcieńczeniu.

Najważniejszą i najobszerniejszą część rozprawy doktorskiej Pani mgr Shur Gałęckiej stanowi rozdział Wyniki, który Doktorantka podzieliła na dwie główne części. W obu częściach opis uzyskanych danych jest uporządkowany i wyczerpujący i często zawiera krótką interpretację wyników. Układ kolejnych podrozdziałów jest logiczny. Wyniki zostały przedstawione na licznych rycinach i wykresach i w tabelach. Dodatkowo, Doktorantka przygotowała schematy ilustrujące przebieg badania aktywności kanałowej w mitochondriach komórek HEK293T oraz doświadczenia opartego na identyfikacji partnerów białkowych podjednostek kanału BK_{Ca} metodą TurboID. Większość ilustracji jest czytelna i zawiera dokładne opisy. Jedynie na rycinach przedstawiających wyniki analiz Western blot brakowało mi informacji o oczekiwanej (teoretycznej) masie molekularnej białka czy kompleksu białkowego. Taka informacja ułatwiłaby interpretację wyników immunoblottingu, zważywszy, że bardzo często zastosowane przeciwciała nie były w pełni specyficzne wobec badanego białka.

Rozdział Dyskusja podzielony został na dwie główne części, które odnoszą się do zdefiniowanych celów badawczych i uzyskanych wyników. Doktorantka wyczerpująco dyskutuje otrzymane wyniki. Problematyka badań została tu przedstawiona przystępnie i jasno, nie ma przeładowania treścią, co powoduje, że rozdział ten czytałam z dużą przyjemnością.

Pracę kończy rozdział Podsumowanie i wnioski, w którym Doktorantka zwięźle przedstawiła najważniejsze osiągnięcia.

Recenzowana praca została starannie przygotowana pod względem edytorskim, układu i estetyki. W pracy występują dość liczne błędy językowe, jednak nie wpływają one na ostateczny odbiór tekstu. Odnośniki do literatury stosowane są prawidłowo. Autorka nie ustrzegła się żargonu laboratoryjnego: w pracy znalazły się np. zwroty typu „komórki z nokautem” czy „dzikie serce”. Z kolei zdanie „Poza tym inne białka jak: lamina A i C, oraz białka zawierającego walozynę (VCP, ang. *valosin-containing protein*), zasadowym białkiem

mieliny, białko mieliny P0, izoforma L periaxin, apolipoproteina, białko podobne do hipokalcyny 1, prekursor retikulokalbina 3, kalmodulina, czynnik inicjujący syntezę 4A i kalbindyna 2” (str. 36) jest niezrozumiałe. W pracy zastosowano sformułowania „mitochondrialne DNA”, „plazmidowe DNA” czy „transferowe RNA” zamiast mitochondrialny/plazmidowy/transferowy DNA/RNA (ten kwas). Pomimo powyższych krytycznych uwag, moja ocena pracy od strony formalnej jest wysoka.

Ocena merytoryczna

Na wstępie chciałabym podkreślić, że Pani mgr Shur Gałęcka wykonała ogromną pracę opartą na zróżnicowanych metodach badawczych z obszaru biologii molekularnej, biologii komórki, biofizyki i biochemii. Szeroki zakres i złożoność przeprowadzonych badań, które stanowiły logiczny ciąg doświadczeń zasługuje na uznanie.

Celem przeprowadzonych badań było znalezienie odpowiedzi na dwa główne pytania: (i) czy izoforma VEDEC podjednostki α kanału BK_{Ca} tworzy funkcjonalny kanał w mitochondriach komórek HEK293T; (ii) jakie białka wchodzi w interakcje z podjednostką β kanału BK_{Ca} w całych komórkach i w mitochondriach.

W swoich badaniach Doktorantka wykorzystowała linię komórek eukariotycznych HEK293T, w których ekspresja i aktywność kanałów typu BK_{Ca} i mitoBK_{Ca} jest niewielka. W pierwszym etapie badań, Doktorantka wykorzystując komórki HEK293T przejściowo transfekowane plazmidem kodującym izoformę VEDEC kanału BK_{Ca} wykazała, że w komórkach tych dochodzi do ekspresji izoformy VEDEC, która tworzy funkcjonalny kanał w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Aktywność elektrofizjologiczną kanału zbadano z wykorzystaniem izolowanych mitoplastów i techniki patch-clamp. Doktorantka dowiodła, że aktywność kanału w transfekowanych komórkach HEK293T odpowiada parametrom elektrofizjologicznym kanału potasowego o dużym przewodnictwie aktywowanego jonami Ca²⁺: kanał wykazywał zależność od przyłożonego napięcia i był aktywowany jonami wapnia. Dodatkowo zastosowanie modulatorów kanałów BK_{Ca} wykazało, że badany kanał był aktywowany przez NS11021 i hamowany przez heminę i paksylinę.

Doktorantka potwierdziła lokalizację mitochondrialną izoformy VEDEC podjednostki α kanału BK_{Ca} z wykorzystaniem techniki Western blot i izolowanych frakcji mitochondrialnych oraz w oparciu o analizy immunofluorescencyjne z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. Badania przeprowadzone za pomocą mikroskopii konfokalnej dodatkowo wykazały, że podjednostka VEDEC kanału BK_{Ca} lokalizuje się nie tylko w mitochondriach, ale i w retikulum endoplazmatycznym.

Otrzymane wyniki są bardzo wartościowe, gdyż wskazują po raz pierwszy na tworzenie przez izoformę VEDEC podjednostki α funkcjonalnego kanału potasowego BK_{Ca} w mitochondriach komórek ssaków.

Drugą część pracy poświęcono identyfikacji białek oddziałujących z podjednostką β kanału BK_{Ca} w całych komórkach i frakcjach mitochondrialnych w oparciu o technikę TurboID, która umożliwia identyfikację białek z bliskiego otoczenia białka docelowego. Należy podkreślić, że zastosowane przez Doktorantkę podejście proteomiczne wymagało starannego opracowania różnych konstruktów genetycznych i wielu innych czasochłonnych przygotowań związanych z analizą ekspresji i lokalizacją komórkową badanej podjednostki kanału sprzężonej z ligazą TurboID. Na uznanie zasługuje zastosowanie dodatkowych kontroli w postaci konstruktów, których produkty ekspresji swobodnie i przypadkowo biotynyłowały białka w macierzy i przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, co ograniczyło liczbę wykrytych białek w próbie docelowej. Przeprowadzone doświadczenia nie potwierdziły interakcji podjednostki β kanału BK_{Ca} z elementami łańcucha oddechowego. Jednocześnie uzyskane wyniki wskazują na istnienie oddziaływań podjednostki β z wieloma białkami pochodzącymi z różnych przedziałów komórki. Jednym z „ciekawszych” moim zdaniem

partnerów białkowych mitochondrialnej podjednostki β kanału BK_{Ca} są białka kompleksu MICOS. Brak potwierdzenia interakcji komponentów MICOS z tą podjednostką na drodze ko-immunoprecypitacji może jednak wskazywać na przejściowe oddziaływania tych białek. Jak słusznie zauważyła Doktorantka, otrzymane dane należałoby zweryfikować innymi metodami.

Białkiem, które zostało zidentyfikowane we frakcjach mitochondrialnych we wszystkich czterech powtórzeniach eksperymentu TurboID było białko TMX1. Oddziaływanie TMX1 z podjednostką β kanału BK_{Ca} zostało potwierdzone metodą opartą na ko-immunoprecypitacji. Co więcej, Doktorantka wykazała interakcję TMX1 również z podjednostką α kanału BK_{Ca}. Znaczenie oddziaływania białka TMX1 z podjednostkami kanału BK_{Ca} w kontekście aktywności kanału i funkcjonowania mitochondriów zostało szczegółowo omówione przez Doktorantkę w Dyskusji.

Chciałabym w tym miejscu wyrazić słowa uznania dla Doktorantki za dołożenie wszelkich starań, aby wytypowane interakcje białkowe zidentyfikowane na drodze analiz TurboID weryfikować innymi metodami proteomicznymi. Doktorantka zastosowała podejścia proteomiczne typu ko-immunoprecypitacja i rozdział BN-PAGE połączony z immunodetekcją, co wymagało kolejnych przygotowań konstrukcji genetycznych. Wysiłek ten zaowocował dużą ilością danych, które niestety nie zawsze dostarczyły jednoznacznych dowodów potwierdzających interakcje podjednostki β kanału BK_{Ca} z wytypowanymi na drodze TurboID białkami.

Podsumowując, otrzymane dane mogą w przyszłości pomóc w lepszym zrozumieniu roli fizjologicznej kanału potasowego mitoBK_{Ca} i złożonej sieci zależności pomiędzy podjednostkami tego kanału a białkami w mitochondriach i innych organellach w komórkach człowieka.

Lektura rozprawy doktorskiej Pani mgr Shur Gałęckiej nasunęła mi kilka uwag i pytań, na które chciałabym prosić Doktorantkę o udzielenie odpowiedzi:

1. We Wstępie umieściła Pani informację o MIA jako kompleksie wewnętrznej błony mitochondrialnej (str. 15). Czy miała Pani na myśli kompleks zaangażowany w import i składanie białek przestrzeni międzybłonowej? Według mojej wiedzy białko Mia jako element szlaku MIA to białko przestrzeni międzybłonowej.
2. Pisząc „Zgodnie z bazą danych Ensembl odnotowano 96 transkryptów genu kodującego ludzki kanał BK_{Ca}” (str. 29) wydaje się, że raczej nie miała Pani na myśli rzeczywistej liczby transkryptów, lecz liczbę różnych produktów alternatywnego splicingu?
3. Również we Wstępie wspomniała Pani o miejscu fosforylacji w obrębie sekwencji podjednostki α kanału mitoBK_{Ca} (str. 28). Czy fosforylacja/defosforylacja podjednostek kanału może być jedną z form regulacji aktywności kanału? Czy ta modyfikacja postranslacyjna może wpływać na interakcję z podjednostkami regulatorowymi kanału lub innymi białkami mitochondrialnymi?
4. Tytuł rozdziału 6.1.1. wskazuje, że przeprowadzone doświadczenie polegało na analizie jakościowej ekspresji podjednostki α w komórkach HEK293T transfekowanych plazmidem kodującym izofর্মę VEDEC. W tekście opisującym doświadczenie oraz w podpisie Ryciny 11 wymienia Pani jednakże typ dziki komórek HEK293T, czyli jak rozumiem komórki, które nie były transfekowane plazmidem. Z kolei wynik poziomu ekspresji genu *KCNMA1* kodującego podjednostkę α w komórkach U-87 MG i komórkach HEK293T sugeruje, że w badaniu zbadano komórki HEK293T transfekowane plazmidem kodującym izofর্মę VEDEC. Bardzo proszę o wyjaśnienie.
5. W doświadczeniach badającym regulację aktywności kanału mitoBK_{Ca} przez jony wapnia (rozdziały 6.1.4 i 6.1.5) zaobserwowała Pani niezdolność do powrotu do pełnej aktywności

- kanалу pomimo przywrócenia warunków kontrolnych (100 μM Ca^{2+}). Jak można wytłumaczyć takie zjawisko?
6. W podsumowaniu analiz Western blot potwierdzających lokalizację mitochondrialną podjednostki VEDEC w komórkach HEK293T (rozdział 6.1.7.) stwierdza Pani, że „Wynik ten sugeruje, że w komórkach HEK293T pomimo obecności transkryptów genu *KCNMA1* prawdopodobnie nie występuje białko tworzące kanał BK_{Ca} ”. Biorąc pod uwagę, że zastosowane przeciwciała rozpoznają wszystkie izoformy podjednostki α kanału BK_{Ca} , moim zdaniem taki wniosek mogłaby Pani wyciągnąć, gdyby do badań zostały wykorzystane całe komórki (transfekowane i nie poddane przejściowej transfekcji), a nie izolowane organella.
 7. Analiza ekspresji podjednostki $\beta 4$ na poziomie białka w komórkach HEK293T (rozdział 6.1.8.) nie jest wiarygodna. Czy można mieć pewność, że komercyjne przeciwciała są rzeczywiście swoiste dla podjednostki $\beta 4$ kanału BK_{Ca} ?
 8. Zastanawiająca jest mała liczba białek mitochondrialnych (jedynie około 6% spośród zidentyfikowanych białek biotynylowanych) zidentyfikowanych jako białka wchodzące w interakcje z podjednostką $\beta 4$ kanału BK_{Ca} we frakcji wzbogaconej w mitochondria. Dlaczego do doświadczenia zastosowano frakcje „wzbogacone” w mitochondria, a nie oczyszczone organella?
 9. W Dyskusji zabrakło mi krytycznego podejścia do zastosowanej metody TurboID. Biorąc pod uwagę ogromną liczbę zidentyfikowanych białek, spośród których jedynie niewielka część została ostatecznie wzięta pod uwagę jako unikatowe białka biotynylowane we frakcjach mitochondrialnych (rozdział 6.2.5., Rycina 46), czy podejście proteomiczne oparte na TurboID nie wydaje się Pani być mało specyficznym?

Podsumowanie

Pani mgr Shur Karolina Gałęcka zrealizowała wszystkie sformułowane cele rozprawy wykonując bardzo szerokie i zróżnicowane pod względem metodycznym badania. Doktorantka próbowała również odpowiedzieć na pytania pojawiające się podczas realizacji tej rozprawy. Otrzymane wyniki są w pełni oryginalne i dostarczają ważnych informacji na temat mechanizmów funkcjonowania kanału mito BK_{Ca} w komórkach ssaczych. Doktorantka wykazała się dojrzałością w planowaniu i prowadzeniu prac badawczych. Eksperymenty zostały przeprowadzone rzetelnie, a prezentowane dane były weryfikowane z użyciem różnych technik badawczych. Moje krytyczne uwagi nie mają wpływu na wysoką ocenę powyższej rozprawy, zaś pytania i uwagi zawarte w ramach oceny merytorycznej stanowią punkt wyjścia do dyskusji w czasie obrony. W tym miejscu chciałabym również podkreślić, że Pani mgr Shur Gałęcka jest współautorką pięciu publikacji naukowych: wspomnianej pracy eksperymentalnej opublikowanej w czasopiśmie *Scientific Reports* oraz trzech prac przeglądowych i protokołu stanowiącego rozdział książki. Jedna publikacja jest obecnie w przygotowaniu.

W podsumowaniu stwierdzam, że oceniana przeze mnie rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie Pani mgr Shur Karoliny Gałęckiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie, z uwagi na szeroki zakres prac badawczych i dużą złożoność prowadzonych badań prowadzących do uzyskania wartościowych wyników składam wnioski do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Shur Karoliny Gałęckiej.

Dr hab. Małgorzata Heidorn-Czarna

Małgorzata Heidorn-Czarna