

Prof. dr hab. Adam Szewczyk
*Kierownik Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN
w Warszawie*

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr Ewy Kosickiej pt. „Akwaporyny ślimaka winniczka *Helix pomatia* L. – identyfikacja, charakterystyka i znaczenie w procesie zapadania w stan estywacji”.

Nagrodę Nobla w 2003 roku z chemii przyznano Peterowi Agre (Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, MD) oraz Roderickowi McKinnonowi (Howard Hughes Medical Institute, The Rockefeller University, New York). W przypadku Petera Agre uzasadnienie Komitetu Noblowskiego było bardzo krótkie: “for the discovery of water channels” tzn. „za odkrycie kanałów wodnych” - zwanymi akwaporynami. I to właśnie akwaporyny były głównym obiektem badawczym rozprawy doktorskiej mgr Ewy Kosickiej.

Warto tu podkreślić, że pozornie proces katalizowany przez akwaporyny wydaje się być banalny: rzecz dotyczy przecież „tylko” przepływu wody przez błony biologiczne. Nic bardziej mylnego! Akwaporyny u ssaków są zaangażowane w zjawisku obrzęku mózgu, jaskry, nadwagi itd. Są one ważne w tak fundamentalnych procesach jak migracja komórek, metabolizm adypocytów, czy funkcje nabłonka. Mutacja akwaporyn może prowadzić do pewnych form cukrzycy. Przeciwnością przeciw akwaporynie (AQP4) mogą indukować pewne choroby autoimmunologiczne. Ekspresja akwaporyn jest korelowana ze wzrostem nowotworu m.in. płuca, wątroby i mózgu. Wszystkie te informacje dowodzą, że niezależnie od wykorzystanego w rozprawie doktorskiej mgr Ewy Kosickiej organizmu modelowego, badanie akwaporyn to ważny i interesujący temat. Jednocześnie, wiedza o akwaporynach u mięczaków jest bardzo ograniczona.

Warto także wspomnieć o drugim nobliście nagrodzonym w tym rozdaniu z roku 2003: o Rodericku McKinnonie. Nagrodę Nobla przyznano za badania struktury kanałów potasowych. Kanały jonowe to białka błonowe ułatwiające bardzo szybki transport jonów przez błony biologiczne. Kanały potasowe (których dotyczyły prace w/w noblisty) są klasycznym przykładem tej klasy białek. Lista zjawisk, w których kanały potasowe są zaangażowane jest bardzo długa. Trudno wskazać procesy komórkowe,

które w sposób bezpośredni lub pośredni nie zależałyby od aktywności białek kanałowych.

Przyznanie Nagrody Nobla w 2003 roku Peterowi Agre oraz Roderickowi McKinnonowi pozornie dotyczyło bardzo różnych białek. Zarówno akwaporyny jak i kanały potasowe są odpowiedzialne, za kontrolowany przepływ substancji przez błony biologiczne. Procesy transportu przez błony biologiczne są nie tylko fundamentem wielu procesów komórkowych, ale wydają się także być jednym z pierwotnych zjawisk leżących u podstaw powstania życia na Ziemi. To co łączy te dwa białka (akwaporyny i kanały potasowe) to ściśle określona budowa (struktura), która skutkuje logicznym mechanizmem działania. Mówiąc inaczej, pełnione funkcje przez akwaporyny i kanały potasowe ściśle wynikają z ich molekularnej budowy. Można także powiedzieć, że ich struktura została zoptymalizowana ze względu na pełnione funkcje w błonach biologicznych.

Rozprawa doktorska mgr Ewy Kosickiej została wykonana w Zakładzie Biologii Komórki (Wydział Biologii, Uniwersytet Adam Mickiewicza w Poznaniu) pod kierunkiem prof. Andrzeja Lesickiego oraz dr Joanny Pieńkowskiej, jako promotora pomocniczego.

Rozprawę mgr Ewy Kosickiej otwiera Wstęp omawiający (na 15 stronach) strukturę, selektywność i klasyfikację akwaporyn. W kolejnych rozdziałach Wstępu omówiono akwaporyny mięczaków oraz udział akwaporyn jako elementów odpowiedzi na stres środowiskowy. W osobnym rozdziale opisano zjawisko estywacji. Estywacja to spowolnienie procesów życiowych, zwiększające tolerancję organizmów wobec niesprzyjających warunków środowiskowych. W stanie estywacji następuje spowolnienie metabolizmu, ułatwiające zwierzętom przetrwanie okresu niedoboru wody lub pokarmu. Wreszcie, na zakończenie Wstępu, opisano obiekt badań, czyli ślimaka winniczka. Wstęp do rozprawy doktorskiej wydaje się recenzentowi wystarczający, aby w odpowiedni sposób wprowadzić czytelnika w omawiane w rozprawie doktorskiej zagadnienia. Pewien niedosyt recenzenta dotyczący Wstępu wynika z braku opisu budowy winniczka tzn. sposobu identyfikacji jego organów wewnętrznych.

Głównym celem pracy doktorskiej Pani mgr Ewy Kosickiej była identyfikacja sekwencji nukleotydowych kodujących akwaporyny u ślimaka oraz charakterystyka bioinformatyczna oraz funkcjonalna białek przez nie kodowanych. Celem pracy było

również wyjaśnienie czy akwaporyny biorą udział w regulacji homeostazy wodnej organizmu w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji. Tak sformułowane cele rozprawy doktorskiej, według recenzent, są zasadne.

Bezpośrednie, zadania badawcze zostały zdefiniowane przez doktorantkę w następujący sposób:

- identyfikacja sekwencji nukleotydowych kodujących akwaporyny ślimaka winniczka oraz analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowych tych białek otrzymanych w wyniku translacji *in silico*.

- potwierdzenie funkcjonalności białek kodowanych przez zidentyfikowane sekwencje nukleotydowe za pomocą testu komplementacji w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

- określenie zmian w poziomie ekspresji genów akwaporyn w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji.

Badania opisane w rozprawie doktorskiej mgr Ewy Kosickiej dotyczą ważnego zagadnienia: udziału akwaporyn mięczaków w procesach fizjologicznych takich jak osmoregulacja, wydzielanie śluzu czy przeciwdziałanie stresowi związanemu z brakiem wody. Stąd jako obiekt badań wybrano akwaporyny ślimaka winniczka.

W swoich doświadczeniach mgr Ewa Kosicka wykorzystała szeroki wachlarz metod badawczych biologii molekularnej. Począwszy od oczyszczania RNA i DNA, różnego rodzaju reakcje PCR, elektroforezy kwasów nukleinowych i powielania produktów PCR metodą transformacji komórek bakteryjnych. Przeprowadzono także testy funkcjonalne akwaporyn dotyczące transportu wody, nadtlenku wodoru oraz glicerolu. Dodatkowo przeprowadzono tzw. analizę bioinformatyczną. Polegała ona na identyfikacji otwartych ramek odczytu w sekwencjach nukleotydowych otrzymanych w wyniku sekwencjonowania transkryptomu, translacji *in silico* i zestawienie sekwencji aminokwasowych, modelowanie struktury przestrzennej białek oraz analiza filogenetyczna. Dokonano charakterystyki sekwencji aminokwasowych tzn. wyznaczenie potencjalnych miejsc fosforylacji i glikozylacji oraz wyznaczenie profilu hydrofobowości badanych białek,

Opis przedstawionych metod jest dobry: wyczerpująco i szczegółowo przedstawia zastosowane techniki. Pewne wątpliwości dotyczące wybranych narzędzi bioinformatycznych przedstawiono poniżej.

Otrzymane wyniki rozprawy doktorskiej mgr Ewy Kosickiej można streścić w sposób następujący:

- w wyniku analizy transkryptomów nogi i nerki ślimaka winniczka zidentyfikowano sześć sekwencji nukleotydowych wykazujących podobieństwo do sekwencji kodujących akwaporyny. Ich translacja *in silico* umożliwiła przeprowadzenie analizy bioinformatycznej. Wskazała ona na obecność elementów strukturalnych charakterystycznych dla akwaporyn (m.in. dwóch motywów npa). Modele struktury przestrzennej otrzymane dla przewidywanych białek zawierały elementy typowe dla akwaporyn tzn. sześć regionów transbłonowych i pięć łączących je pętli.

Analizy poziomu transkryptów zidentyfikowanych akwaporyn wykazała, że są one obecne we wszystkich badanych organach ślimaka tzn. płaszcz, noga, ślinianki, żołądek, jelito tylne, wątrobotrzustka, zwoje mózgowe, płuco, nerka i gruczoł obojnaczy. Najwyższy poziom transkryptów oznaczono w jelicie, nerce oraz nodze. W organach tych transkrypt AQP6 występował w największej ilości. Analizę poziomu transkryptów oznaczono także dla ślimaków zapadających w stan estywacji. Najbardziej ogólna konkluzja, przeprowadzonych badań jest taka, że zapadanie w stan estywacji jest procesem dynamicznym z punktu widzenia obecności (ekspresji) akwaporyn. Mówiąc inaczej w procesie estywacji obserwuje się znaczne zmiany poziomu akwaporyn.

Wykonano także badania natury funkcjonalnej z wykorzystaniem zidentyfikowanych akwaporyn: wykorzystano tu test komplementacji w komórkach drożdży pozbawionych funkcjonalnych akwaporyn. Wszystkie transkrypty akwaporyn zidentyfikowanych u winniczka kodują białka funkcjonujące jako kanały wodne. Niektóre z nich oprócz wody transportują nadtlenek wodoru oraz glicerol.

Podsumowując. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Ewy Kosickiej charakteryzują strukturalnie i funkcjonalnie akwaporyny występujące u ślimaka winniczka. Otrzymane wyniki nie tylko poszerzają naszą wiedzę o występowaniu akwaporyn bezkręgowców, ale także pozwalają określić ich rolę w trakcie zapadania organizmów w stan estywacji. Uzyskane wyniki w opinii recenzenta są bardzo interesujące i wartościowe. Stanowią one ważny wkład w rozumienia badanych procesów tzn. transportu wody przez błony biologiczne.

Czas na pytania, komentarze i uwagi krytyczne recenzenta:

1. Czy badania dotyczące transportu nadtlenu wodoru u drożdży (w różnych konfiguracjach „genetycznych”) są wiarygodne? Pytanie o wiarygodność tych badań wynika z następujących pytań szczegółowych: Czy stres oksydacyjny indukowany nadtlaniem wodoru może wpływać na interpretację otrzymanych wyników? Czy zmiany stężenia nadtlenu wodoru, które muszą występować (opis Ryciny 17 na stronie 61) w trakcie kilkudniowego eksperymentu nie wpływają na interpretację otrzymanych wyników? Reasumując, czy przyjęta metodologia pomiaru transportu nadtlenu wodoru jest optymalna?
2. Z powyższych wątpliwości wynika prośba recenzenta o krytyczne przedyskutowanie przez doktorantkę stosowanych różnych metod pomiaru aktywności akwaporyn. Pytanie dodatkowe: Czy skład lipidowy błon drożdżowych może istotnie wpływać na badany w rozprawie proces transportu katalizowany przez akwaporyny w porównaniu do składu lipidowego błon ślimaka?
3. Jakie przesłanki kierowały doktorantką, aby wykorzystać określone narzędzia bioinformatyczne - używane w przygotowaniu rozprawy doktorskiej? Do jakiego stopnia wykorzystane narzędzia bioinformatyczne determinują uzyskane wyniki i wnioski uzyskane w rozprawie doktorskiej?
4. Kwestia wyboru organizmu modelowego wykorzystanego w przedstawionej rozprawie doktorskiej: jaki inny organizm modelowy mógłby służyć przeprowadzonym badaniom?
5. Jaka jest możliwość interakcji badanych akwaporyn z innymi białkami błonowymi, szczególnie w doświadczeniach z wykorzystaniem drożdży?
6. Recenzent czuje pewien niedosyt w zakresie dyskusji uzyskanych wyników dotyczących udziału badanych akwaporyn w procesie estywacji. Chodzi o udział innych białek, które potencjalnie mogą być także zaangażowane w tym procesie tzn. współdziałać z akwaporynami.
7. W związku z tym, że akwaporyny (lub poziom ich ekspresji) uważa się za możliwy cel działania substancji o możliwych zastosowaniach medycznych (np. inhibitory AQP4 mogą redukować obrzęk mózgu w czasie ischemicznego zatoru), pytanie recenzenta dotyczy potencjalnego wykorzystania ślimaka winniczka jako

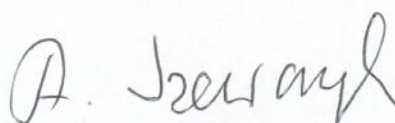
modelowego organizmu do identyfikacji substancji aktywnych np. hamujących aktywność akwaporyn? Jaka jest opinia doktorantki w tym zakresie?

8. Z racji zainteresowań recenzenta bioenergetyką oraz mitochondrialnymi białkami błonowymi - pytanie dotyczące występowania oraz funkcji akwaporyn w mitochondriach ślimaka winniczka? Czy jest ono podobne jak u ssaków. Oraz drugie pytanie o udział mitochondriów w procesie estywacji.
9. Dwie uwagi natury językowej. Recenzent chciałby prosić o wytłumaczenie sformułowania „Eksperyment przeprowadzono stosując trzykrotne powtórzenia biologiczne”, które pojawia się w kilku miejscach tekstu rozprawy doktorskiej.
10. Recenzent zdając sobie sprawę, że polskie terminy niektórych określeń w języku angielskim mogą sprawiać kłopot zwraca jednak uwagę, że sformułowanie „wyznaczenie hydrofobowego plotu” (strona 40) nie jest zbyt trafne.

Spis literatury według recenzenta jest poprawny i adekwatny. Załączenie odbitek prac już opublikowanych jest dobrym obyczajem pokazującym, że otrzymane wyniki rozprawy doktorskiej są w obiegu światowym. Nie ulegając współczesnej presji naukometrii, trzeba powiedzieć, że wedle bazy PUBMED rezultaty rozprawy doktorskiej są opublikowane w dwóch pracach, w dobrych czasopismach międzynarodowych Journal of Membrane Biology z 2014 roku oraz European Journal of Cell Biology z roku 2016 (tu mgr Ewa Kosicka jest pierwszą autorką publikacji).

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Ewy Kosickiej jest napisana dobrze, otrzymane wyniki są bardzo interesujące a zgłoszone uwagi nie rzutują na moją ogólnie bardzo pozytywną ocenę pracy. Autorka wykazuje bardzo dobrą orientację w zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy.

Wnioskuje zatem o uznanie pracy mgr Ewy Kosickiej za odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie mgr Ewy Kosickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Warszawa, 9 styczeń 2019

(Prof. dr hab. Adam Szewczyk)