

**Prof. dr hab. Hanna Jańska**

Wrocław, 21-09-2022

**email: hanna.janska@wroc.edu.pl**

### **Recenzja**

#### **rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Dominiak zatytułowana "Powiązanie produkcji reaktywnych form tlenu ze stopniem redukcji koenzymu Q w mitochondriach"**

Praca doktorska Pani mgr Karoliny Dominiak została wykonana na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii. Promotorem pracy była prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz, znakomity ekspert w dziedzinie bioenergetyki mitochondriów.

Rozprawę doktorską Pani mgr Karoliny Dominiak stanowi zbiór spójnych tematycznie czterech wieloautorskich publikacji pod wspólnym tytułem „Powiązania produkcji reaktywnych form tlenu ze stopniem redukcji koenzymu Q w mitochondriach”. Prace zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach w latach 2018-2022 i wszystkie są typu eksperymentalnego.

Istotnym punktem oceny formalnej rozprawy doktorskiej składającej się z współautorskiego cyklu publikacji jest ocena indywidualnego wkładu doktoranta w powstanie tego cyklu. W trzech publikacjach Karolina Dominiak jest pierwszą autorką, w dwóch z nich dzieli to pierwszeństwo z innym współautorem. Pierwszeństwo na liście autorów zwyczajowo odzwierciedla wiodącą rolę w powstawaniu publikacji. W czwartej z publikacji cyklu Doktorantka jest drugim autorem. Wiodący wkład Karoliny Dominiak w powstanie cyklu publikacji potwierdza również jej własne oświadczenie wskazujące, że we wszystkich czterech publikacjach obok wykonywania określonych eksperymentów, uczestniczyła ona w przygotowywaniu koncepcji badań, analizie wyników i przygotowywaniu manuskryptów. Wykonywane przez Doktorantkę doświadczenia we wszystkich czterech pracach opierały się na podobnej metodologii, która obejmowała: izolację mitochondriów czy ekstraktów, pomiary zużycia tlenu, pomiary potencjału błonowego, ilości i poziomu redukcji koenzymu Q, produkcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Chciałabym podkreślić, że wyniki tych doświadczeń stanowiły trzon każdej publikacji. Szkoda, że Doktorantka nie poszerzyła swojego doświadczenia laboratoryjnego o choćby niektóre analizy immunologiczne, która były wykorzystywane w dwóch z opublikowanych prac.

Rozprawę doktorską Karolina Dominiak rozpoczyna streszczeniem w języku polskim i angielskim, a następnie prezentuje wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy.

Następny rozdział to krótkie wprowadzenie teoretyczne z jasno określonym celem pracy i zadaniami badawczymi. Głównym celem było określenie powiązań pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu (RFT) i stopniem redukcji koenzymu Q w różnych warunkach i wykorzystując różny materiał biologiczny. Postawiony cel jest ważki i interesujący zarówno dla zrozumienia zjawisk biologicznych jak i medycyny, koenzym Q jest bowiem cząsteczką znajdującą zastosowanie w terapiach wielu chorób między innymi neurodegeneracyjnych. Rozdział „Podsumowanie wyników” składa się z czterech części opisujących osobno rezultaty badań czterech publikacji cyklu. Świetnym pomysłem było wprowadzenie do rozprawy oprócz „podsumowania wyników” rozdziału „wnioski”, który uwypukla ogólne konkluzje wynikające z prowadzonych badań oraz podkreśla ich nowatorski charakter. Rozprawa zawiera również wymagane przez ustawę oświadczenia Doktorantki i pozostałych współautorów o ich udziale w powstawaniu danej publikacji. Dowiadujemy się również, że Pani Karolina Dominiak jest współautorem trzech publikacji nie wchodzących w skład cyklu. Dwie z nich są pracami eksperymentalnymi, trzecia to praca przeglądowa opublikowana w *Postęпах Biochemii* w 2019. W publikacji tej Doktorantka jest pierwszym autorem. Tematyka pracy jest związana z tematyką rozprawy o czym świadczy tytuł „Różne oblicza mitochondrialnego koenzymu Q”. Dlaczego publikacja ta nie została włączona do cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej? Pod koniec rozprawy Pani mgr Karoliny Dominiak załączyła kopie czterech publikacji tworzących cykl. Poniżej omówię wnioski wynikające z tych publikacji uwzględniając jedynie wyniki pracy eksperymentalnej Doktorantki.

Pierwsza z publikacji cyklu ukazała się w 2018 roku w *Redox Biology*, o pięcioletnim współczynniku oddziaływania 12,038 i jest fundamentalna dla cyklu. Praca ma tylko trzech autorów, Karolina Dominiak jest jednym z dwóch pierwszych autorów, a promotor prof. Wiesława Jarmuszkiewicz jest autorem korespondencyjnym. Przeprowadzona w ramach tej pracy szeroka i szczegółowa analiza kinetyczna wykazała, że produkcja RFT w mitochondriach (mRFT) jest bezpośrednią funkcją poziomu redukcji mitochondrialnego koenzymu Q (mQ), a nie potencjału mitochondrialnego, jak się powszechnie uważało. Zwiększeniu poziomu redukcji mQ towarzyszy większa produkcja mRFT. Zależność ta jest silniejsza dla drogi cytochromowej niż drogi z udziałem alternatywnej oksydazy. Autorzy pracy proponują, że poziom redukcji endogennej puli mQ może być wykorzystywany jako marker całkowitego poziomu produkcji RFT w mitochondriach. Istnieje wyraźna potrzeba tego typów markerów gdyż pomiary RFT *in vivo* są trudne. Mam jednak pytanie: w jakim stopniu proponowany marker jest precyzyjny, biorąc pod uwagę fakt, że pomiar poziomu redukcji mQ odzwierciedla produkcję mRFT związaną z łańcuchem oddechowym, ale nie uwzględnia innych źródeł

tworzenia RFT w mitochondriach? Materiałem użytym we wspomianej pracy były izolowane mitochondria z jednokomórkowego organizmu, ameby, a zmiany poziomu redukcji koenzymu Q dokonywano za pomocą czynników chemicznych, inhibitorów transportu elektronów.

Pozostałe trzy prace wchodzące w skład cyklu opisują również badania zależności pomiędzy mQ i mRFT, ale w warunkach bardziej fizjologicznych. Druga z prac cyklu ukazała się w roku 2020 w *Free Radical Biology Medicine*, czasopiśmie o pięcioletnim współczynniku oddziaływania 7,934 i dotyczy wpływu treningu wytrzymałościowego na metabolizm tlenowy, w tym ilość i poziom redukcji koenzymu Q w płucach szczura. Pani Karolina Dominiak jest drugim autorem tej pracy ale pierwszym eksperymentatorem, gdyż pierwszym autorem jest prof. Wiesława Jarmuszkiewicz. Doświadczenia wykonywane przez doktorantkę obejmowały przygotowanie homogenatów i izolowanych mitochondriów, pomiary zużycia tlenu, potencjału błonowego, aktywności oksydazy cytochromu c, ilości i poziomu redukcja koenzymu Q oraz produkcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Badania potwierdziły odkrytą wcześniej zależność, że zmniejszony poziom redukcji mQ, tym razem w wyniku treningu wytrzymałościowego, jest powiązany ze zmniejszoną produkcją mRFT. Interesujący jest wynik wskazujący, że spadkowi mQ jako nośnika elektronów w mitochondriach towarzyszył zwiększony poziom koenzymu Q jako przeciwutleniacza w komórkach płuc. Ogólnie, wyniki tej pracy sugerują, że mRFT i Q są ważne dla homeostazy oksydoredukcyjnej płuc oraz zmieniają się w czasie adaptacji do treningu wytrzymałościowego.

Materiałem badawczym trzeciej pracy cyklu są różne tkanki szczura o różnej zawartości zredukowanej puli koenzymów Q. Artykuł ma dwóch współautorów, Karolinę Dominiak jako pierwszego autora i prof. Wiesławę Jarmuszkiewicz jako autora korespondencyjnego. Praca ukazała się na łamach czasopisma *Antioxidants* o pięcioletnim współczynniku oddziaływania 6,649 w roku 2021. W publikacji tej po raz pierwszy badano zmianę w uwalnianiu RFT zachodzącą w wyniku przejścia z warunków niefosforylujących do warunków fosforylujących i zaobserwowano, że produkcja mRFT w warunkach niefosforylujących była silnie zależna od ilości zredukowanego mQ. W oparciu o te wyniki zaproponowano nowy parametr o znaczeniu fizjologicznym tzn. kontrolę oddechową produkcji RFT, która określa zakres produkcji mROS, który towarzyszy funkcji mitochondriów, gdy łańcuch oddechowy nie jest hamowany.

Ostatnia wieloautorska publikacja cyklu ukazała się w *International Journal of Molecular Sciences* w roku 2022 (IF<sub>5y</sub>= 6,132), w której Doktorantka jest pierwszym autorem. Praca ta jest kontynuacją badań nad wpływem treningu wytrzymałościowego na pulę koenzymu Q oraz tworzenie RFT na poziomie tkanek i izolowanych mitochondriów szczura. Tym razem badano tkanki o dużym zapotrzebowaniu na energię, tj. serce, wątroba, mózg. Są

to pierwsze badania odpowiedzi mitochondriów na trening wytrzymałościowy pod kątem roli koenzymu Q z użyciem różnych organów tego samego zwierzęcia. Potwierdzono, że trening wytrzymałościowy może indukować inną odpowiedź tkankową i mitochondrialną związaną z koenzymem Q działającym jako przeciwutleniacz w błonach komórkowych tkanek i nośnik elektronów w łańcuchu oddechowym mitochondriów. Wyniki badań zwracają również uwagę na rolę utlenionej mitochondrialnej puli Q (mQ) w adaptacji systemu OXPHOS i modulowaniu produkcji mROS w odpowiedzi na trening wytrzymałościowy.

Wszystkie publikacje są na bardzo wysokim poziomie naukowym. Ich rezultaty wzbogacają wiedzę na temat homeostazy redoks mQ jako kluczowego czynnika w modulowaniu produkcji RFT. Poniżej przedstawiam kilka komentarzy i pytań do Doktorantki. Są to raczej pytania ogólne biorąc pod uwagę, że każda z publikacji cyklu była już szczegółowo recenzowana przed opublikowaniem w prestiżowych czasopismach naukowych. Dotyczą one głównie metodologii, która w publikacjach jest opisywana zazwyczaj krótko.

1. Co było wiadomo na temat związku pomiędzy koenzymem Q i RFT przed rozpoczęciem badań opisywanych w rozprawie doktorskiej? Ten aspekt został dość pobieżnie przedstawiony we wprowadzeniu. Trochę informacji znalazłam w dyskusji do pierwszej publikacji cyklu. Między innymi informację, że mała liczba badań w tym kierunku wynikała z trudności w pomiarze poziomu redukcji koenzymu Q. Jak Doktorantka poradziła sobie z tym problemem?

2. We wszystkich pracach cyklu Doktorantka mierzy poziom RFT za pomocą gotowego zestawu do użycia (Amplex Red Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay kit), specyficznego dla  $H_2O_2$  czyli faktycznie określa poziom tylko jednego z typów RFT. Czy podejmowano próby pomiaru poziomu innych reaktywnych form tlenu i/lub innych metod oznaczenia ilości  $H_2O_2$  dla uwiarygodnienia wyników ?

3. W doświadczeniach mierzona jest produkcja/uwalnianie  $H_2O_2$ , a nie stężenie w stanie równowagi (ang. steady-state level). Czy należy się spodziewać, że zależność między poziomem zredukowanego koenzymu Q i stężeniem RFT w stanie równowagi będzie podobna do tej zaobserwowanej dla uwalnianego  $H_2O_2$ ? Czy w kalkulacjach poziomu  $H_2O_2$  w mitochondriach brano pod uwagę, że cząsteczka ta łatwo dyfunduje przez błonę?

4. Czy według Doktorantki znaleziona zależność między produkcją RFT a stopniem redukcji koenzymu Q jest uniwersalna? Innymi słowy czy poziom zredukowanego mQ można wykorzystywać jako marker poziomu RFT również w mitochondriach roślinnych ?

5. Ostatnie pytanie do Doktorantki: jaki problem badawczy, który wyłonił się w czasie badań uważa Pani za najbardziej zasługujący do wyjaśnienia w najbliższej przyszłości?

Ponadto chciałabym dodać, że środki na realizację ocenianej pracy pochodziły z dwóch projektów NCN : OPUS11 przyznanego prof. Wiesławie Jarmuszkiewicz oraz PRELUDIUM 19 przyznanego mgr Karolinie Dominiak .

Podsumowując, przedstawiona przez mgr Karolinę Dominiak rozprawa doktorska pt. „Powiązania produkcji reaktywnych form tlenu ze stopniem redukcji koenzymu Q w mitochondriach” ma charakter nowatorski, jest zbiorem solidnie wykonanych i zinterpretowanych prac naukowych i w pełni spełnia wszystkie warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 z poprawkami wprowadzonymi Ustawą z dnia 18 marca 2011 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz.882). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Dominiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę ważkość rozprawy, solidność wyników oraz fakt opublikowania ich w bardzo prestiżowych czasopismach naukowych wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

*Wiesława Jarmuszkiewicz*