

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Agaty Wawrzekiewicz-Jałowickiej pt. „Studia teoretyczne i symulacyjne nad kanałowym transportem jonów potasu przez błony biologiczne”

Kanały jonowe to białka błonowe ułatwiające szybki transport jonów przez błony biologiczne. Kanały potasowe (których dotyczy recenzowana rozprawa doktorska) są tu klasycznym przykładem tej klasy białek. Wyjątkowość kanałów jonowych – w świecie błonowych białek transportujących - można najkrócej sprowadzić do:

- wyjątkowości „biofizycznej”
- wyjątkowości „funkcjonalnej”.

Przez wyjątkowość „biofizyczną” kanałów recenzent rozumie ich zdolność do regulowania potencjału błonowego. Wyjątkowość „funkcjonalna” oznacza, że np. kanały wapniowe ułatwiając napływ jonów wapniowych mogą indukować jakościowo nowe procesy biochemiczne. Lista zjawisk, w których kanały jonowe są zaangażowane jest bardzo długa. Można powiedzieć, że trudno wskazać procesy komórkowe, które w sposób bezpośredni lub pośrednie nie zależałyby od aktywności białek kanałowych! Prawdopodobnie jest to wynikiem wczesnego (w sensie ewolucyjnym) pojawienia się tych białek u organizmów.

Rok 1990 został nazwany przez Chrisa Millera w piśmie *Science* „Annus mirabilis of potassium channels” co można przetłumaczyć „cudownym rokiem kanałów potasowych” (*Science*. 1991; 252 (5009): 1092-1096). To określenie było wyrazem szacunku dla osiągnięć tamtego okresu w tematyce kanałów potasowych. Mogło się naiwnie wydawać, że zrobiono już wszystko w tej dziedzinie. Czy ponad 25 lat później można nadal poszukiwać intelektualnej ekscytacji i ważnych tematów w badaniach kanałów potasowych?

Odpowiedź jest jednoznacznie pozytywna: kanały potasowe przez swoją różnorodność strukturalną, ważną farmakologię, czy wreszcie udział w wielu procesach komórkowych stanowią nadal ekscytujący obiekt badawczy. Dotyczy to zarówno badań

eksperymentalnych jak i badań teoretycznych. Badania opisane w rozprawie doktorskiej mgr inż. Agaty Wawrzekiewicz-Jałowickiej wpisują się w ten ostatni obszar badawczy. Można go nazwać: poszukiwaniem modeli teoretycznych funkcjonowania kanałów potasowych. Stąd temat recenzowanej rozprawy doktorskiej jest ważny z punktu widzenia rozumienia transportu jonów potasowych przez błony biologiczne.

Rozprawę mgr inż. Agaty Wawrzekiewicz-Jałowickiej otwiera wstęp omawiający znaczenie biologiczne kanałów potasowych, elektrofizjologię i budowę kanałów typu Kv1.2 (regulowanych potencjałem elektrycznym) oraz kanałów BK (o dużym przewodnictwie). Przedstawiono także dotychczasowe modele aktywności kanałów typu Kv1.2 oraz BK. Na zakończenie wstępu przedstawiono technikę patch-clamp (technikę stabilizacji potencjału skrawka błony). Wstęp do rozprawy doktorskiej wydaje się recenzentowi wystarczający, aby w odpowiedni sposób wprowadzić czytelnika w omawiane zagadnienia. Choć dłuższe wprowadzenie byłoby zasadne, o czym poniżej w części opisującej pytania recenzenta.

Główny cel pracy doktorskiej Pani mgr inż. Agaty Wawrzekiewicz-Jałowickiej polegał na zaproponowaniu modeli aktywności kanałów potasowych zależnych od napięcia oraz stężenia jonów wapniowych w różnych warunkach mogących wpływać na stopień aktywacji kanałów. Modele były formułowane za pomocą tzw. procesów losowych lub obliczeń geometrycznych opartych na strukturze białka kanałowego.

Bezpośrednie, szczegółowe cele zostały zdefiniowane przez doktorantkę w następujący sposób:

- dokonanie charakterystyki procesu,
- odpowiedź na pytanie, jakiego typu proces – markowski/niemarkowski i z jakimi dodatkowymi założeniami może reprezentować aktywność kanału, pozwalając na odtworzenie eksperymentalnej zależności
- prawdopodobieństwa otwarcia od czynników aktywujących kanał, rozkładów trwania poszczególnych stanów kanału oraz efekt pamięci długo zasięgowej,
- wyjaśnienie mechanizmów współdziałania poszczególnych podjednostek białka kanałowego podczas zmian jego aktywności w odpowiedzi na bodźce,
- uwzględnienie dodatkowych czynników mogących wpływać na dynamikę konformacyjną kanału,

Modele zaproponowane w rozprawie doktorskiej zostały sformułowane na podstawie informacji uzyskanych przez analizę obecnego stanu wiedzy na temat

budowy i właściwości fizykochemicznych kanałów jonowych. Istotne cechy strukturalne, fizyczne i chemiczne białek kanałowych znajdują bezpośrednie odzwierciedlenie w założeniach oraz parametrach wprowadzonych modeli stochastycznych. Walidacja modeli została dokonana przez porównanie danych wygenerowanych podczas symulacji z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi metodą patch-clamp.

Dodatkowo dokonano analizy wpływu niektórych czynników fizykochemicznych na aktywność kanału. Takie czynniki jak naprężenie membrany wywołane różnicą ciśnień po obu stronach czy temperatura powinny wpływać zarówno na amplitudę i częstość drgań błony i jednocześnie na aktywność samego kanału.

Tak sformułowany cel według recenzenta jest zasadny. Warto tu podkreślić, że rozprawa mgr inż. Agaty Wawrzekiewicz-Jałowickiej była realizowana pod kierunkiem prof. Zbigniewa Grzywny (Wydział Chemiczny, Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów, Politechnika Śląska) gdzie od wielu lat, z dużą ekspertyzą naukową realizuje się studia teoretyczne/symulacyjne dotyczące białek.

Badania opisane w rozprawie doktorskiej mgr inż. Agaty Wawrzekiewicz-Jałowickiej dotyczą ważnego zagadnienia w obszarze teoretycznych badań kanałów jonowych.

Otrzymane wyniki dotyczą m.in.

- wytypowania prawdopodobnego scenariusza aktywacji napięciowej,
- podkreślenia wagi zmian geometrii poru podczas aktywacji dla przewodności kanału oraz zależności prawdopodobieństwa otwarcia od potencjału błonowego,
- sugestii istotnego wpływu dodatkowych czynników jak np. drgania błony, obrotów łańcuchów bocznych aminokwasów, czy podatności helisy do zgięć na obserwowaną aktywność kanału.
- badania wpływu temperatury i ciśnienia na aktywność kanału potwierdzające istotną rolę właściwości błony komórkowej dla funkcjonowania kanału.

W opinii recenzenta faktyczne połączenie wyników i dyskusji nie jest typowym rozwiązaniem: stąd prośba o uzasadnienie przyjęcia takiego rozwiązania edycyjnego.

Spis literatury według recenzenta jest poprawny i adekwatny. Załączenie odbitek prac już opublikowanych jest dobrym obyczajem pokazującym, że otrzymane wyniki rozprawy doktorskiej mgr inż. Agaty Wawrzkiwicz-Jałowickiej są w obiegu światowym. Szczególnie, że wyniki opublikowano w czasopiśmie z wysokim impact factor. Dla BBA Biomembranes jest to 3,7 co powinno zadowolić najbardziej konserwatywnych analityków naukowych prac naukowych. Można tylko pogratulować promotorowi oraz doktorantce opublikowania wyników doktoratu w dobrych czasopiśmie naukowych. Na stronie 88 jest przedstawiony Wykaz osiągnięć naukowych doktorantki. Dodatkowo należy wymienić publikację zaakceptowaną 25 maja br do Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes pt. „The temperature dependence of the BK channel activity - kinetics, thermodynamics and long range correlations”. Mgr inż. Agata Wawrzkiwicz-Jałowicka jest pierwszym autorem tej pracy.

Czas na pytania i uwagi krytyczne recenzenta:

- Pierwsze pytanie dotyczy uzasadnienia dlaczego wybrano/wykorzystano w rozprawie doktorskiej te dwa kanał potasowe a nie np. kanał potasowy regulowany przez ATP czy kanał dwu porowy np. typu TASK?
- Czy przeprowadzone studia teoretyczne i symulacyjne (lub wykorzystana metodyka) mogą pozwolić na zrozumienie procesów regulacji aktywności kanałów potasowych przez ich modulatory tzn. inhibitory i aktywatory kanałów potasowych. Np. w przypadku kanału potasowego BK przez niskocząsteczkowe peptydy, takie jak chrybdotoksyna czy iberiotoksyna?
- Podobne pytanie wynika z obserwacji opisujących oddziaływania różnych białek z białkami kanałowymi: czy wykorzystany aparat badawczy może pomóc zrozumieć jak np. aktywność kanału BK jest modulowana przez regulatorowe jednostki beta (oraz gamma) lub inne białka błonowe, które mogą oddziaływać z kanałami potasowymi?
- Pytanie wynikające z naukowych zainteresowań recenzenta. Kanały potasowe obecne są także w błonach wewnątrzkomórkowych np. wewnętrzna błona

mitochondrialna. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej stwierdzono obecność kanałów typu Kv oraz BK. Potencjał elektryczny mitochondriów dochodzi do -200 mV, co zdecydowanie jest wartością większą od wartości potencjału na błonie plazmatycznej. Czy proponowane w rozprawie modele aktywności kanałów jonowych zależnych od potencjału są nadal „ważne” przy tak wysokich wartościach potencjału błonowego?

- Recenzent z dużym zainteresowaniem wysłucha opinii doktorantki na temat opisywanego wpływu ciśnienia na aktywność innych kanałów potasowych obecnych nie tylko w błonach komórkowych. Wewnętrzna błona mitochondrialna ulega dramatycznym naprężeniu w różnych stanach metabolicznych. W zjawisku apoptozy mitochondria pęcznieją, uwalniając cytochrom c co prowadzi do śmierci komórki. Do jakiego stopnia opisywane modele mogą służyć opisowi takich zjawisk zachodzących na poziomie mitochondrialnych kanałów potasowych typu Kv lub BK?
- Czy doktorantka może skomentować/wyjaśnić swoją opinię wyrażoną na stronie 75 rozprawy (4. Podsumowanie pracy, jej znaczenie i perspektywy) sugerując możliwość projektowania niespecyficznych modulatorów białek kanałowych działających bezpośrednio na błonę komórkową: modulatorów wykorzystywanych w aplikacjach medycznych?
- Jak wspomniano na początku recenzji rozprawy doktorskiej - dłuższy Wstęp byłby przydatny. Szczególnie dla osób (tak jak to ma miejsce w przypadku recenzenta), których głównym sposobem badania kanałów potasowych typu Kv i BK, są doświadczenia biochemiczne.
- Czy wykazana zależność aktywności kanał BK od temperatury może być ważna w sytuacjach patofizjologicznych? Czy taki model może zostać wykorzystany do analizy (symulacji) złożonych układów komórkowych w czasie przekazywania sygnałów elektrycznych np. w mózgu?

- Czy opracowane modele mogą przewidzieć / tłumaczyć aktywność kanałów potasowych w sytuacjach zmieniających się innych warunków makroskopowych (nie temperatury) np. stan stresu oksydacyjnego w komórce?
- Tytułowy zwrot „... studia nad kanałowym transportem...” jest raczej zapożyczeniem z obcego języka. Powinno być „...studia kanałowego transportu...”

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Agaty Wawrzkiwicz-Jałowickiej 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 inż. Agaty Wawrzkiwicz-Jałowickiej za odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie mgr inż. Agaty Wawrzkiwicz-Jałowickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



(Prof. dr hab. Adam Szewczyk)

Warszawa, 18 czerwiec 2017 r.