



Kraków, 30 stycznia 2025 roku

dr hab. Małgorzata Brindell, prof. UJ
Zakład Chemii Nieorganicznej
Wydział Chemii UJ

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Sylwii Katarzyny Wu
zatytułowanej
„Rola zróżnicowania sekwencyjnego ludzkich metalotionein w komórkowej homeostazie
jonów Zn²⁺”**

Praca doktorska Pani mgr Sylwii Wu została przygotowana w Zespole Chemii Biologicznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Artura Krężła.

Metalotioneiny, białka regulatorowe uczestniczące m.in. w komórkowej homeostazie jonów cynku, znane są od ponad pół wieku i intensywnie badane przez wiele grup badawczych. Mimo tak wielu prac naukowych wciąż rola metalotionein na poziomie komórkowym pozostaje niejasna. Przegląd literaturowy przygotowany przez prof. Krężła i prof. Maret (*Chem. Rev.* 2021, 121, 14594) nakreśla wiele aspektów chemii, biochemii i biologii metalotionein, które muszą zostać wyjaśnione, aby lepiej zrozumieć złożoność funkcji tych białek w układach biologicznych. Jednym z wielu poruszanych tematów jest powiązanie różnych izoform metalotionein z ich funkcjami i w odniesieniu do tego aspektu badań pojawia się pytanie o ich rolę w kontroli stężenia jonów cynku w komórce. Odpowiedź na to pytanie jest tematem przewodnim przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej p. Sylwii Wu. Praca badawcza p. Wu skupia się na wyjaśnieniu roli różnorodności izoform metalotionein w kontroli homeostazy jonów cynku w komórce i została zrealizowana w ramach projektu badawczego OPUS (NCN: 2018/31/B/NZ1/00567) pt. „Wpływ polimorfizmu i metamorfizmu metalotionein na komórkową homeostazę jonów cynku – rola zróżnicowania sekwencyjnego, strukturalnego i stabilnościowego” kierowanego przez prof. Artura Krężła.

Praca doktorska ma układ klasyczny tj. składa się z takich rozdziałów jak wstęp teoretyczny, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja wyników, podsumowanie i bibliografia. W sumie cała praca doktorska obejmuje 239 stron. Rozpoczyna się od podziękowań, kolejno umieszczono spis treści, a następnie streszczenia w języku polskim oraz angielskim. Dalej w pracy znajduje się lista skrótów.

Pierwszy z rozdziałów pracy to wstęp teoretyczny obejmujący 54 strony i oparty na 357 pozycjach literaturowych. Jest on bardzo dobrze przygotowany i świetnie wprowadza w tematykę badań związanych z homeostazą jonów cynku w komórce. We wprowadzeniu Doktorantka opisała rolę jonów cynku w organizmie człowieka oraz skutki zdrowotne związane



z jego niedoborem oraz nadmiarem. Kolejno zostało zdefiniowane pojęcie wolnych jonów cynku, które dalej Doktorantka wykorzystuje w swojej pracy badawczej. W dalszej części Doktorantka skupiła się na omówieniu najważniejszych mechanizmów regulacji jonów cynku w komórce. Ostatnie dwa punkty tego rozdziału dotyczą ludzkich metalotionein oraz ich naturalnych wariantów, które są przedmiotem badań Doktorantki. Przedstawione doniesienia literaturowe pozwalają także na umiejscowienie jej badań na tle dotychczas prowadzonych prac w tym temacie a licznie przytoczone dane wskazują na dogłębną analizę tej tematyki przez Autorkę.

Następny rozdział to już cel pracy wraz z uzasadnieniem potrzeby podjęcia zaplanowanych badań. Głównym celem pracy doktorskiej Pani mgr Wu było otrzymanie: i) czterech izoform ludzkich metalotionein (metalotioneiny 1-4; MT1, MT2, MT3, MT4) obejmujących również osiem subizoform MT1; ii) siedmiu ich naturalnych wariantów oraz iii) białka MT1HL1. A następnie wykonanie dogłębnej charakterystyki otrzymanych białek w kontekście wiązania jonów cynku. Zostały również sformułowane poszczególne cele badawcze, których zadaniem było odpowiedzenie na postawione w tej części pytania. Rozdział ten jest napisany bardzo przejrzysto.

Kolejny rozdział pracy zatytułowany „Metody” zawiera dokładny opis przeprowadzonych eksperymentów. Doktorantka w tej części umieściła informacje o udziale innych osób w poszczególnych eksperymentach, co w żadnym wypadku nie umniejsza ogromowi pracy, którą wykonała. Z rozdziału tego można też wyciągnąć informacje jakimi technikami Doktorantka posługuje się w swoich badaniach naukowych. Obejmują one m.in.:

- prowadzenie mutagenyzy, wykorzystanie techniki PCR w celu otrzymania odpowiednich plazmidów;
- prowadzenie hodowli bakteryjnej, transformacja bakterii w celu produkcji odpowiednich białek;
- oczyszczanie białek z wykorzystaniem m.in. chromatografii cieczową białek (FPLC);
- identyfikacja białek z wykorzystaniem spektrometrii mas ESI-QTOF; oraz oznaczanie wysycenia jonami metali za pomocą ICP-AES;
- pomiary spektroskopowe: spektrofotometria UV-Vis i spektrofluorymetria do pomiaru stężeń białek, ustalania molowego współczynnika absorpcji, stochiometrii wiązania badanych jonów metali; kinetyki utleniania reszt cysteinowych, określeniu pozornej stałej pK_a dla reszt cysteinowych oraz transferu jonów cynku.

Jest to bardzo bogaty zestaw zaawansowanych metod badawczych, a każda z nich wymaga dobrego przygotowania zarówno podczas przygotowania próbek, wykonywania eksperymentów jak i analizy otrzymanych danych. We wszystkich tych aspektach Doktorantka wykazała się dużym profesjonalizmem. Należy nadmienić, iż praca z metalotioneinami jest niezwykle trudna ze względu na wysoką zawartość reszt cysteinowych z jednej strony łatwo



ulegających utlenieniu a z drugiej w formie zredukowanej koordynujących metale d-elektronowe w szczególności jony miedzi i cynku, które mogą być obecne w używanych roztworach buforowych jako zanieczyszczenia. Doktorantka dołożyła dużych starań, aby na każdym etapie badań zachować odpowiednią formę białek, co uważam za ogromny jej sukces.

Kolejne dwa rozdziały pracy obejmują prezentację wyników i ich dyskusję. Zakres wykonanych prac jest bardzo duży a rozdzielanie tych rozdziałów nieco utrudnia czytanie, w dalszej części omówię zbiorczo oba rozdziały dzieląc je tematycznie zgodnie z przedmiotem badań. Pierwszy z nich dotyczy izoform ludzkiej metalotioneiny. Niewątpliwie ogromnym sukcesem Doktorantki było otrzymanie wszystkich zaplanowanych białek tj. 8 subizoform MT1 oraz MT2, MT3 i MT4 jak i wykonanie dla nich badań porównawczych. Mimo, iż dla wybranych białek były dostępne różne informacje w literaturze jak do tej pory nikt nie przedstawił porównania aktywności dla wszystkich białek z wykorzystaniem dokładnie tej samej procedury badawczej. Proces produkcji i oczyszczania był wcześniej opracowany w Zespole prowadzonym przez prof. Krężła jednak Doktorantka musiała wprowadzić zmiany w protokołach obejmujące m.in. zmianę wartości OD₆₀₀ do indukcji ekspresji białek, dodatku jonów cynku czy pH buforu, aby otrzymać wszystkie zaplanowane białka a część z nich otrzymała po raz pierwszy, co świadczy o pionierskim charakterze tej pracy. Dla otrzymanej serii izoform ludzkiej metalotioneiny Doktorantka wyznaczyła molowe współczynniki absorpcji, stechiometrię wiązania jonów cynku oraz kadmu oraz szybkość utlenienia reszt cysteinowych. Kolejny eksperyment miał na celu wyznaczenie stałych dysocjacji wiązania jonów cynku z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej ZnAF-2F. Otrzymany zestaw stałych dla miejsc wiążących o mocnym, umiarkowanym i słabym powinowactwie dla wszystkich izoform metalotionein jest unikatowy, do tej pory nie było w literaturze danych pochodzących od tak licznej grupy białek otrzymanych z wykorzystaniem tej samej metody badań. Pozwoliło to Doktorantce na dogłębną analizę m.in. roli słabych miejsc wiązania, które warunkują transfer jonów cynku do odpowiednich ligandów i mogą wskazywać na ich odmienne role w komórce. Ciekawym eksperymentem było zbliżenie się do warunków *in vitro* poprzez badanie wiązania jonów cynku przez grupy metalotionein współlistniejących w układach komórkowych, o różnym wysyceniu jonami cynku. Wskazało to na różne zakresy buforowania jonów cynku co jest niezwykle ciekawe w kontekście zrozumienia homeostazy jonów cynku w różnych stanach patologicznych. Dalej została przedstawiona seria testów mająca na celu sprawdzenie właściwości metalotionein jako donorów i akceptorów jonu cynku. Zaprojektowane układy do badań zwierzały m.in. białka, których aktywność jest uzależniona od dostępności jonów cynku (dehydrogenaza sorbitolu, fosfataza tyrozynowa). Zastosowanie takich układów pozwoliło Doktorantce na odwzorowanie sytuacji, która może mieć miejsce w warunkach *in vitro*. Analiza otrzymanych danych wykazała, iż zdolność do transferu jonów cynku nie odzwierciedla w pełni ich reaktywności i aby lepiej zrozumieć mechanizm transferu jonów cynku pomiędzy białkami należy wziąć pod uwagę ich oddziaływanie. Uważam to za bardzo trafne spostrzeżenie. Tą część badań kończy analiza stechiometrii wiązania jonów cynku przez MT4 z wykorzystaniem



techniki ESI-MS, która pozwala na bezpośrednie zaobserwowanie współistnienia białka z różnym stopniem wysycenia jonami cynku w zależności od ilości dodanych równoważników jonu cynku. Pozwala to dodatkowo na pośrednią weryfikację wyliczonych stałych dysocjacji dla wiązania jonów cynku.

Kolejne dwa zagadnienia badawcze to jest naturalne warianty ludzkich metalotionein oraz białko MT1HL1 należą do całkowicie pionierskich badań. Doktorantka uzyskała, oczyściła i zidentyfikowała 7 naturalnych wariantów ludzkich metalotionein oraz białko MT1HL1, które do tej pory były jedynie teoretycznie przewidywanymi białkami na podstawie analiz bioinformatycznych genomu człowieka. Dla wszystkich tych białek zostały przeprowadzone kompleksowe badania, pokrótce wymienione przeze mnie w poprzednim rozdziale. Należy podkreślić, iż wszystkie zaprezentowane dane w tym rozdziale stanowią nowość naukową i niewątpliwie są podstawą do napisania świetnych publikacji. Jestem przekonana, że ukażą się one w najbliższym czasie.

O dojrzałości naukowej Doktorantki świadczy m. in. zamieszczenie w pracy rozdziału 5.5 zatytułowanego „*Analiza porównawcza izoform ludzkich metalotionein, ich naturalnych wariantów, oraz białka MT1HL1*”. W rozdziale tym Doktorantka na podstawie przeprowadzonych badań oraz danych zawartych w literaturze dokonuje analizy otrzymanych wyników wskazując równocześnie jakie dodatkowe aspekty powinny zostać zbadane. Tego typu dyskusja jest bardzo cenna i wskazuje, iż Doktorantka potrafi szerzej popatrzeć na swoje wyniki badań i sformułować ogólne trendy. Zważywszy na nowatorski charakter badań, unikatowy zestaw danych na tle istniejącej literatury oraz zaawansowaną dyskusję rozprawa ma duży potencjał publikacyjny.

W czasie obrony doktorskiej prosiłabym Doktorantkę o ustosunkowanie się do poniższych pytań i komentarzy:

- 1) Rozdział 3.3.3.6.3 opisuje test aktywności SDH (dehydrogenazy sorbitolu), str. 95 linia 11: czy stężenie apo-SDH nie powinno być 20 nM? Proszę również o wyjaśnienie w jaki sposób uzyskano dane z tego testu przedstawione na Rycinie 23. W opisie doświadczenia wskazano, że metalotioneinę inkubowano z apo-SDH w różnych odstępach czasowych a następnie przeprowadzano esej na aktywność. Dla jakiego czasu pokazano dane na Rycinie 23, jak to wyglądało dla innych odstępów czasowych?
- 2) Rozdział 4.1.4 ATP, trójfosforan oraz NTA dodawano jako chelatory nie związki utleniające (str. 109, linia 8).
- 3) Czy na podstawie przeprowadzonych badań transferu jonów cynku z metalotionein do badanych enzymów można coś powiedzieć o kinetyce tego procesu?
- 4) W pracy pojawia się określenie na białko wysyczone jonami metali: *zmetalizowane*, zostało użyte również określenie *kompetytor* w odniesieniu do związków chelatujących, które współzawodniczyły o jony cynku w obecności wysyczonej tym metalem



metalotioneiny. Czy wcześniej te określenia były już wykorzystywane w języku polskim czy są one wprowadzone po raz pierwszy?

- 5) Czy Doktorantka mogłaby przedstawić kierunki dalszych badań, które mogłyby stanowić kontynuację prac badawczych ujętych w pracy doktorskiej?
- 6) Czy w literaturze można znaleźć informacje o białkach oddziaływujących z metalotioneinami i czy coś wiadomo o sile takiego oddziaływania?

Podsumowując, przedstawione w pracy dane, ich analiza i interpretacja są na najwyższym poziomie i jestem pewna, że wielu badaczy z nich skorzysta w przyszłości po ich opublikowaniu. W pracy doktorskiej został zaprezentowany bardzo spójny zestaw metod badawczych, co pozwoliło Doktorantce na otrzymanie danych dla różnych układów, które można ze sobą porównać i dzięki przeprowadzeniu badań dla tak licznych układów było możliwe wyciągnięcie wielu wniosków ogólnych, ale też wskazanie dalszego kierunku badań. Uważam to za ogromny sukces Doktorantki. Wykazała się ona dużym profesjonalizmem i dojrzałością naukową.

W kolejnym rozdziale zostało umieszczone podsumowanie, które w sposób zwięzły, ale jednocześnie dokładny przedstawia najważniejsze wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań.

Ostatnia część doktoratu to bibliografia obejmująca 401 pozycji.

Podsumowując moją ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Sylwii Wu chciałabym podkreślić wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań. Duża część badań, które przeprowadziła Doktorantka niewątpliwie można uznać za pionierskie. Należy podkreślić, iż przygotowana rozprawa doktorska oprócz ogromnej ilości danych eksperymentalnych obejmuje również ich dogłębną analizę i dyskusję na tle istniejącej literatury, co dobitnie pokazuje ich wysoką wartość i unikatowość. Praca ta niewątpliwie zasługuje na wyróżnienie.

Ja niżej podpisana stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Sylwii Wu stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdzając wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę, zatem spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim 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.). Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Wu do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników, omówioną przeze mnie we wcześniejszej części recenzji oraz ich dużą wartość publikacyjną, stawiam wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.