

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Wu

pt.: „Rola zróżnicowania sekwencyjnego ludzkich metalotionein w komórkowej homeostazie jonów” wykonanej w Zakładzie Chemii Biologicznej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Artura Krężela

Metalotioneiny (MT) to niskocząsteczkowe, wewnątrzkomórkowe białka o niezwykle wysokiej zawartości reszt cysteiny, które odgrywają fundamentalną rolę w homeostazie metali, ochronie przed stresem oksydacyjnym oraz detoksykacji organizmu z metali ciężkich takich jak kadm, rtęć czy ołów. Od momentu ich odkrycia w 1957 roku przez Margoshesa i Vallee'a w nerce konia, metalotioneiny stały się przedmiotem intensywnych badań w dziedzinie biologii komórkowej, toksykologii i onkologii. Ich zdolność do selektywnego wiązania jonów metali, w tym cynku (Zn^{2+}), który jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania licznych enzymów i czynników transkrypcyjnych, podkreśla ich znaczenie w fizjologii człowieka. W organizmach ssaków wyróżniono cztery główne izoformy MT (MT1 do MT4), oraz kilka subizoform w obrębie MT1, MT2 oraz MT3, z których każda wykazuje unikalny wzór ekspresji tkankowej oraz odmienne właściwości biologiczne. Sekwencje aminokwasowe tych izoform różnią się długością, obecnością specyficznych reszt (np. treoniny lub glutaminianu), a także rozmieszczeniem motywów cysteinowych typu Cys-Cys i Cys-X-Cys, które decydują o architekturze domen koordynacyjnych. Zróżnicowanie sekwencyjne MT ma bezpośredni wpływ na ich powinowactwo do metali, stabilność termodynamiczną oraz zdolność do reagowania na czynniki stresowe, co w konsekwencji przekłada się na ich funkcje fizjologiczne i patologiczne, m.in. w kontekście nowotworzenia. Badania nad zróżnicowaniem sekwencyjnym metalotionein są istotne nie tylko z punktu widzenia podstawowej wiedzy biochemicznej, ale także

ze względu na ich potencjalne znaczenie kliniczne. Zmiany sekwencji mogą bowiem modyfikować zdolność MT do wiązania metali toksycznych, takich jak Cd^{2+} , a tym samym wpływać na skuteczność ochrony komórki przed ich cytotoksycznością. Ponadto, zidentyfikowanie sekwencyjnych determinant struktury i funkcji MT może posłużyć jako baza do opracowania biomarkerów ekspozycji na metale ciężkie lub nawet celów terapeutycznych w chorobach zależnych od stresu oksydacyjnego czy zaburzeń homeostazy cynku. Zważywszy na powyższe, niezwykle istotne jest prowadzenie szczegółowych analiz porównawczych izoform metalotionein, ich struktury przestrzennej oraz właściwości funkcjonalnych. Poznanie molekularnych podstaw różnorodności tych białek może przyczynić się do lepszego zrozumienia ich biologicznej roli i otworzyć nowe kierunki badań translacyjnych. To właśnie było motywacją dla mgr Sylwii Wu do pracy nad tą grupą białek.

Rozprawa doktorska została wykonana pod opieką prof. dr hab. Artura Krężela na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego w ramach realizacji projektu OPUS NCN. Profesor Krężel, od lat zajmujący się badaniami nad interakcjami metali z białkami, jest bez wątpienia jednym z czołowych specjalistów w tej dziedzinie na świecie. Doktorantka miała więc nie tylko okazję pracować pod opieką wybitnego naukowca, ale też – jak sama trafnie i z humorem zauważyła – wspólnie z nim dopłynąć do brzegu rozprawy doktorskiej. Choć momentami płynięcie odbywało się pod prąd, a fale eksperymentalnych niespodzianek nie omijały ich łodzi, to jednak dzięki cierpliwemu sterowi promotora kurs został utrzymany – i zakończył się, w mojej opinii, pełnym sukcesem.

Całość dysertacji liczy 238 stron maszynopisu i obejmuje siedem głównych rozdziałów: wstęp teoretyczny, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję wyników, podsumowanie oraz literaturę. Rozdziały te poprzedza streszczenie oraz przydatny wykaz skrótów. Bibliografia obejmuje aż 401 pozycji, co świadczy o doskonałym przygotowaniu teoretycznym doktorantki. W pracy zawarła szereg kolorowych ilustracji, tabel i widm, które znacząco ułatwiają zrozumienie i interpretację przedstawionych wyników. Praca ma klasyczny układ charakterystyczny dla rozpraw z dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych i została napisana w języku polskim w sposób niezwykle staranny i klarowny. Na uwagę zasługują również podziękowania, które wskazują, że Doktorantka potrafi nie tylko prowadzić skomplikowane eksperymenty, ale również budować trwałe i pełne szacunku relacje – zarówno w środowisku naukowym, jak i poza nim.

Mgr Sylwia Wu na początku swojej pracy przedstawiła w sposób możliwie syntetyczny i uporządkowany informacje dotyczące biologicznej i fizjologicznej roli jonów cynku (Zn^{2+}) w organizmie człowieka. W rozdziale tym omówiła zarówno znaczenie cynku jako pierwiastka niezbędnego do życia, jak i skutki jego niedoboru oraz nadmiaru. Z dużą dokładnością opisała mechanizmy utrzymywania homeostazy Zn^{2+} na poziomie komórkowym, w tym rolę transporterów,

cynkosomów oraz białek zależnych od cynku. Szczególne miejsce we wstępie poświęciła metalotioneinom – białkom regulującym dostępność jonów Zn^{2+} w komórce. Autorka przedstawiła ich klasyfikację, strukturę oraz funkcje fizjologiczne, a także dokładnie omówiła proces wiązania jonów cynku do ludzkich metalotionein. Na uwagę zasługuje również rozdział poświęcony naturalnym wariantom tych białek, w którym mgr Wu przeanalizowała zarówno ekspresję genów metalotionein, jak i znaczenie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w kontekście zmienności sekwencyjnej ludzkich izoform MT. Wstęp teoretyczny pracy doktorskiej jest wręcz naładowany ogromną dawką wiedzy – właściwie każde zdanie wymagało uważnej lektury i skupienia. Jako recenzentka z dużym uznaniem odnotowałam umiejętne wplatanie wątków historycznych, takich jak chronologia odkryć białek zależnych od cynku czy rozwój wiedzy na temat samych metalotionein. Tego typu wtrącenia nie tylko uatrakcyjniają tekst, ale również świadczą o szerokim horyzoncie naukowym i dużej dojrzałości Autorki. Muszę szczerze przyznać, że podczas lektury wstępu nie udało mi się „dopłynąć do brzegu” za jednym razem – miejscami przypominało to bardziej rejs wymagający licznych postojów i nawigowania w gęstej mgłę informacji. Po lekturze tej części pracy doktorskiej nasunęły mi się drobne uwagi: (i) Zgodnie z wytycznymi IUPAC, oznaczenia N-koniec i C-koniec powinny być zapisywane z użyciem kursywy dla liter N i C (*N*-koniec, *C*-koniec); (ii) W tekście pojawia się niekonsekwencja w zapisie nazwy "cis-platyna" – raz z łącznikiem, innym razem jako jedno słowo. Która forma jest zgodna z obowiązującymi normami? (iii) W tabeli 7 przedstawiono udokumentowane korelacje między występowaniem określonych polimorfizmów a stanami patologicznymi i chorobami. Czy jednak obecność tych form polimorficznych białek jest jedyną przyczyną wymienionych schorzeń?

Po obszernym wstępie literaturowym Doktorantka sformułowała hipotezę badawczą oraz cel swojej pracy doktorskiej. Założyła, że zróżnicowanie sekwencyjne ludzkich metalotionein wpływa na ich właściwości biofizykochemiczne, w tym powinowactwo do jonów Zn^{2+} . **Celem pracy była ich kompleksowa charakterystyka porównawcza z zastosowaniem ujednoczonych technik eksperymentalnych.**

Kolejny rozdział pracy, zatytułowany „Materiały i metody”, został przez Doktorantkę opracowany z dużą starannością i szczegółowością – obejmuje ponad 30! podrozdziałów, co dobrze odzwierciedla złożoność i interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań. Mgr Sylwia Wu zastosowała szeroki wachlarz nowoczesnych technik eksperymentalnych, niezbędnych do otrzymywania, oczyszczania oraz charakterystyki biofizykochemicznej metalotionein, ich naturalnych wariantów oraz białka MT1HL1. W swojej pracy zastosowała następujące techniki: (i) techniki inżynierii genetycznej i biologii molekularnej; (ii) procedury oczyszczania i rekonstrukcji białek, umożliwiające uzyskanie funkcjonalnych metalotionein oraz ich form wiążących jony metali; (iii) metody spektrofotometryczne i spektrofluorymetryczne, wykorzystywane do oznaczania stężenia białek, analizy powinowactwa do jonów metali (Zn^{2+} , Cd^{2+}), badania transferu jonów oraz

lokalizacji miejsc wiązania o zróżnicowanym powinowactwie; (iv) analiza właściwości chemicznych reszt cysteinowych, w tym oznaczanie pKa, kinetyki utleniania i reaktywności grup tiolowych; (v) badania funkcjonalne, polegające na analizie zdolności badanych metalotionein do buforowania jonów Zn^{2+} oraz transferu tych jonów do biologicznych akceptorów, w tym białek enzymatycznych. Wszystkie zastosowane techniki zostały opisane w sposób przejrzysty i dokładny, dzięki czemu rozdział ten może stanowić cenne źródło wiedzy i gotowych procedur dla innych badaczy zajmujących się białkami metalowiązującymi. Zastosowanie spójnych i powtarzalnych metod dla wszystkich analizowanych białek dodatkowo podkreśla wysoką jakość warsztatu eksperymentalnego Autorki i doskonale koresponduje z celem pracy doktorskiej. Do rozdziału „Materiały i metody” mam jedynie dwie drobne uwagi: (i) W tabeli 11 przedstawiono sekwencje aminokwasowe badanych białek. Warto byłoby uzupełnić ją o informację, ile dokładnie reszt aminokwasowych liczy każde z białek oraz podać ich masy cząsteczkową lub molową – dane te ułatwiłyby szybkie porównanie analizowanych izoform i wariantów; (ii) W podrozdziale 3.3.1.3 opisano modyfikację N-końca jednego oraz C-końca drugiego z peptydów. Wskazane byłoby krótkie wyjaśnienie, z czego wynikała potrzeba takiej modyfikacji.

Następny główny rozdział rozprawy doktorskiej został zatytułowany „Wyniki” i został przez Doktorantkę podzielony na trzy zasadnicze części, odpowiadające głównym obszarom jej badań. W pierwszej części Doktorantka skupiła się na charakterystyce izoform ludzkich metalotionein (MT). Otrzymała wszystkie znane izoformy, a dzięki zastosowaniu spójnej metodologii porównała je pod względem właściwości biofizykochemicznych. Wykazała, że każda z izoform posiada siedem miejsc wiązania jonów Zn^{2+} o zróżnicowanym powinowactwie, a także różni się pod względem właściwości buforujących. Pani Sylwia Wu dowiodła również, że izoformy różnią się sposobem wiązania jonów cynku, co sugeruje ich komplementarne funkcje w regulacji poziomu Zn^{2+} w komórkach. Przeprowadzone przez doktorantkę badania transferu jonów oraz interakcji z różnymi ligandami jednoznacznie potwierdziły istotną rolę metalotionein w utrzymywaniu homeostazy jonów cynku i ich dynamicznej dostępności. W drugiej części pracy Doktorantka zajęła się naturalnymi wariantami izoform metalotionein (nwMT), które powstają w wyniku pojedynczych zmian aminokwasowych. Przeprowadzone przez nią analizy pozwoliły jej wykazać, że takie zmiany mają istotny wpływ na stabilność i reaktywność badanych białek. Szczególnie interesujące były wyniki dotyczące izoformy MT4, dla której udokumentowała duże różnice w stabilności i reaktywności w porównaniu z pozostałymi formami. Dzięki temu Kandydatka wskazała, że zróżnicowanie sekwencyjne nawet na poziomie jednej reszty aminokwasowej może mieć znaczące konsekwencje funkcjonalne. W ostatniej części rozdziału Autorka podjęła się charakterystyki białka MT1HL1, dotychczas nieopisanego w tak szerokim zakresie. Udało jej się wykazać wysokie podobieństwo tego białka do klasycznych metalotionein, zarówno w zakresie właściwości biofizycznych, jak i zdolności wiązania jonów Zn^{2+} . Na tej podstawie zasugerowała, że MT1HL1 może zostać uznane za kolejną izoformę ludzkich metalotionein. Ponadto, w oparciu o uzyskane wyniki, Doktorantka podkreśliła potrzebę

dalszej, pogłębionej charakterystyki zarówno MT1HL1, jak i innych mniej zbadanych izoform (np. MT3 i MT4) w warunkach jak najlepiej odzwierciedlających fizjologię komórkową. Po lekturze rozdziału zatytułowanego „Wyniki” nasunęły mi się następujące pytania: (i) Jakie znaczenie biologiczne, zdaniem Doktorantki, mają różnice w liczbie i rodzaju miejsc wiązania Zn^{2+} w różnych izoformach MT? (ii) W jakim stopniu badania transferu jonów Zn^{2+} *in vitro* można przełożyć na warunki panujące w żywej komórce? (iii) W jakim stopniu naturalne warianty MT mogą wpływać na różnice indywidualne w odpowiedzi organizmu na stres oksydacyjny lub toksyczność metali ciężkich? (iv) Na str. 107 Doktorantka napisała, że „krzywa nie przybiera obłego kształtu”, ale ja nie zauważyłam żeby krzywa nie przybierała obłego kształtu; (v) Str. 131 – dlaczego nie zostały użyte konkurujące ligandy?

Rozdział „Dyskusja wyników” został opracowany przez Doktorantkę z ogromną starannością i imponującą szczegółowością. Zawarła w nim szeroką analizę wszystkich przeprowadzonych badań – od otrzymywania i oczyszczania metalotionein, przez ich charakterystykę biofizykochemiczną, aż po analizę powinowactwa do jonów Zn^{2+} , reaktywności, właściwości buforujących i zdolności do transferu jonów. Doktorantka wnikliwie omówiła różnice między izoformami, uwzględniając liczbę miejsc wiązania Zn^{2+} , ich zróżnicowane powinowactwo oraz formy zmetalizowane. W pracy po raz pierwszy zestawiała i porównała wszystkie izoformy ludzkich metalotionein przy zastosowaniu spójnej metodologii, co umożliwiło rzeczywiście wiarygodną analizę porównawczą. Muszę jednak przyznać, że w przypadku tego rozdziału dopłynięcie do brzegu zajęło mi nieco więcej czasu niż zazwyczaj – kilkakrotnie musiałam zawracać do portu, by ponownie wypłynąć na szerokie wody tej niezwykle bogatej treści. Dyskusje są bardzo obszerne, miejscami wręcz drobiazgowo, co z jednej strony świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i jej doskonałej orientacji w temacie, ale z drugiej strony sprawia, że lektura tej części pracy jest wymagająca. Uważam, że rozdział ten mógłby być nieco bardziej skondensowany – z zachowaniem wartości merytorycznej, ale z pewnym ułatwieniem dla czytelnika. Po lekturze tej części pracy nasunęły mi się następujące pytania: (i) Białka MT są stosunkowo małe, liczące około 65 reszt aminokwasowych. Takie białka można obecnie syntetyzować chemicznie. Czy podjęto już próbę ich syntezy w warunkach eksperymentalnych? (ii) W kontekście tego, co zostało napisane na stronie 167, jakie mogłyby być hipotetyczne przyczyny toksyczności tych białek dla komórek bakterii, jeśli założymy, że mogłyby one wpływać na funkcje komórkowe? (iii) Czy istnieje możliwość skorelowania odmiennego zachowania białka MT4, które osiąga punkt wysycenia bardzo wcześnie, z jego szczególnymi właściwościami biologicznymi lub lokalizacją w komórce?

Reasumując, uważam, że tematyka recenzowanej pracy doktorskiej jest bardzo interesująca, część doświadczalna pracy doktorskiej została doskonale zaplanowana, wyniki zinterpretowane poprawnie. Warto wspomnieć, że Doktorantka jest współautorką czterech publikacji opublikowanych w prestiżowych czasopismach z listy JCR. Uważam, że cele pracy zostały w pełni

zrealizowane. Rozprawa mgr Sylwii Wu zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Czytając rozprawę można zauważyć ogrom pracy Doktorantki jaką włożyła w realizację pracy oraz w interpretację i dyskusję wyników. Mgr Wu wykazała się umiejętnościami prowadzenia badań w swojej dziedzinie oraz przygotowała rozprawę, która wnosi nową wartość naukową. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Sylwii Wu do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

