



Dr hab. inż. Jolanta Łukasiewicz

Wrocław, 26.05.2017 r.

Zakład Immunochemii

Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek

## RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Drozd pt. *"Characteristics of stability and reactivity of the human metallothionein isoforms in the context of cellular zinc homeostasis"* wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Artura Krężela.

Przedstawiona do oceny praca obejmuje badania ludzkich metalotionein (MT), których celem było zdobycie szeregu nowych informacji na temat biofizycznych właściwości tych cząsteczek i molekularnych podstaw ich aktywności, co stanowi niezbędny etap do dalszego zgłębiania ich funkcji biologicznych w komórkach. Wiadomo, że te niskocząsteczkowe białka bogate w aktywne grupy sulfhydrylowe wiążąc nie tylko jony cynku, ale i jony metali takich jak  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , odpowiedzialne są za homeostazę pierwiastków śladowych kluczowych dla funkcji życiowych komórki, neutralizację toksycznych metali ciężkich, neutralizację wolnych rodników oraz dystrybucję jonów metali do metaloprotein. Pełniąc powyższe funkcje, MT mają istotne znaczenie dla podstawowych procesów komórkowych, takich jak proliferacja, różnicowanie, czy przekazywanie sygnału. Intrygująca jest ich rola w procesach nowotworzenia, na którą wskazuje wyraźny wzrost ekspresji niektórych izoform w tych stanach chorobowych, czy znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego. Co więcej, pomimo iż badania nad MT rozpoczęto w latach 50-tych XX w. i dysponujemy wiedzą na temat podstawowej struktury większości zidentyfikowanych izoform, dalsze badania nad rolą tych cząsteczek w kluczowych procesach zachodzących w komórce i organizmie w układach *in vitro* i *in vivo* wymagają zrozumienia ich biochemicznych podstaw w uproszczonych układach modelowych, czego przykładem jest przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Drozd. Od strony warsztatu badacza, MT są wymagającym obiektem badań, ze



względem unikatową elastyczność strukturalną, podatność na utlenianie i agregację oraz wysoką zmienność strukturalną kompleksów w fizjologicznym pH. W odniesieniu do opisanych trudności, na wyróżnienie zasługuje fakt, że w ocenianej pracy Pani mgr Agnieszka Drozd podjęła się badań biofizycznych aż 10 ludzkich MT z podrodzin MT1, 2, 3 i 4, gdzie dla większości wybranych izoform albo nie dysponowano dotychczas tak szczegółową charakterystyką albo wiedza na ich temat była fragmentaryczna, a opublikowane dotychczas parametry fizykochemiczne nieporównywalne ze względu na różnice w zastosowanych metodach analitycznych. Dodatkowym atutem pracy jest przeprowadzona z sukcesem konfrontacja wyników z kilkoma ogólnie panującymi opiniami dotyczącymi właściwości kompleksów MT z jonami  $Zn^{2+}$ .

Przedstawiona do recenzji praca doktorska to bogate, obejmujące 274 str., anglojęzyczne opracowanie aktualnego stanu wiedzy w odniesieniu do uzyskanych wyników. Charakteryzuje się prawidłowym układem, w którym wyróżniono Wstęp, Cele Pracy, Materiały i Metody, Wyniki oraz Dyskusję. W pracy dość niekonwencjonalnie wskazano na najważniejsze wnioski płynące z przeprowadzonych badań – podano je w formie tytułów podrozdziałów Dyskusji, co nie zmienia faktu, że zostały sformułowane prawidłowo i czytelnie. Przyznam, że taka forma ułatwia czytanie dyskusji i weryfikację wyników z danymi literaturowymi. Dopełnieniem opracowania jest bogaty w stabelaryzowane dane Załącznik (obejmujący m.in. szczegółową interpretację wyników uzyskanych przy pomocy spektrometrii mas), spisy piśmiennictwa i skrótów oraz streszczenia w j. polskim i angielskim.

Wstęp jest bardzo dobrze skonstruowany oraz napisany jasno i czytelnie. Doktorantka trafnie dobrała zakres przedstawionych informacji wyczerpująco ilustrując opisywane cząsteczki i procesy. Z lekkością pióra wprowadza czytelnika w kolejne aspekty dotyczące MT, wyjaśniając definicje większości parametrów fizykochemicznych badanych w niniejszej rozprawie (np.  $pZn$ ,  $K_d$  dla kompleksów Zn-MT, potencjał oksydacyjno-redukcyjny) w odniesieniu do ich znaczenia dla aktywności MT. Bogato ilustrowany Wstęp, rozpoczyna ogólna charakterystyka białek i domen wiążących jony  $Zn^{2+}$  poparta licznymi przykładami, po której Autorka przechodzi do opisu obiegu jonów cynku w komórce, omawiając procesy



utrzymujące stan homeostazy i skutki zaburzenia tych procesów. W kolejnych rozdziałach porusza sztanarowe funkcje tego typu cząsteczek, w tym MT, dotyczące utrzymania homeostazy jonów  $Zn^{2+}$ , roli transporterów  $Zn^{2+}$  do molekuł, których aktywność jest zależna lub regulowana przez te jony oraz udziału w reakcjach oksydoredukcyjnych w komórkach. Następnie Autorka skupia się na ludzkich MT, które stanowią przedmiot Jej rozprawy doktorskiej. Opisuje kolejno podłoże historyczne badań nad ludzkimi MT, geny kodujące i zidentyfikowane izoformy, ich sekwencje aminokwasowe, strukturę przestrzenną zarówno form związanych (MT), jak i niezwiązanych z jonami metali (apotionein – T), lokalizację w komórkach i tkankach, funkcję biologiczną oraz po krótkce stany chorobowe zależne od MT. Pewien niedosyt budzi podrozdział dotyczący struktury/konformacji apotionein, który mógłby być uzupełniony o dotychczasową wiedzę na temat zmian konformacyjnych zachodzących podczas przechodzenia z formy T do MT.

Cele pracy zostały precyzyjnie wskazane, a następnie konsekwentnie realizowane. Należy wyróżnić kompleksowe podejście do badań biofizycznych aż 10-ciu MT z grup 1, 2, 3 i 4 w kontekście komórkowej homeostazy jonów  $Zn^{2+}$ , które na tle opublikowanych prac wyróżnia zastosowanie tych samych warunków i metod analitycznych dla tak dużej grupy izoform. Pozwoliło to na przeprowadzenie rzetelnej analizy porównawczej i wzmocniło argumenty przeważające za kontestacją opinii dotyczących obecności miejsca słabiej wiążącego  $Zn^{2+}$ , wpływu warunków izolacji MT na właściwości biofizyczne oraz użyteczności izolowanych domen MT jako układów dla charakterystyki kompletnej cząsteczki MT.

Opis stosowanych materiałów i metod, uwzględniający spis odczynników i aparatury, został poprawnie i wyczerpująco opisany. Docenić należy fakt, że niektóre z metod uzupełniono o wyjaśnienie podstaw molekularnych badanych procesów, co należy docenić biorąc pod uwagę wysoce specjalistyczny charakter wykonanych doświadczeń. Brakuje mi jedynie listy wykorzystywanych sekwencji nukleotydowych ludzkich MT (po części można się odnieść do Ryc. 1.9) oraz opisu metody obliczania współczynnika *CI* (*Competitivity Index*) – jedynie w rozdziale Wyniki pojawia się wzmianka w postaci cytowania źródła dla tego parametru. Niektóre z metod nie posiadają informacji na temat liczby powtórzeń. Należy



podkreślić, że do realizacji zadań Autorka użyła bardzo bogatego zestawu metod – od nowoczesnych metod preparatyki białek (ekspresja w wydajnym systemie bakteryjnym, oczyszczanie przy pomocy chromatografii powinowactwa z użyciem segmentów inteiny jako łatwo usuwalnego znacznika oraz innych metod chromatograficznych) uzupełnionych o SDS-PAGE i analizy metodą spektrometrii mas. Charakterystykę biofizyczną kompleksów Zn-MT analizowano z użyciem szerokiego zakresu metod opartych na spektrofotometrii UV-VIS oraz spektrofluorymetrii. Praca pokazuje w jak szerokim zakresie można użyć metod spektrometrii mas ESI i MALDI-TOF do badań nie tylko struktury MT, ale przede wszystkim procesów asocjacji jonów  $Zn^{2+}$  i  $Cd^{2+}$  do T i MT oraz transferu jonów z Zn-MT do metaloprotein. Połączenie tych technik z analizami proteomicznymi MS i MS/MS oraz znakowaniem grup sulfhydrylowych reprezentuje nowoczesne trendy analizy MT. Należy podkreślić, że Autorka nie tylko dobrała metody zgodnie z aktualnym stanem wiedzy na temat ich użyteczności w badaniach MT, ale również zmodyfikowała niektóre z publikowanych wcześniej warunków, krytycznie ocenianych przez badaczy zajmujących się tą tematyką.

Wyniki, podobnie jak reszta pracy, są jasno opisane i w pełni udokumentowane rycinami i tabelami. Każda z sekcji poprzedzona jest krótkim uzasadnieniem wykonanych doświadczeń. Należy podkreślić, że MT są trudnymi białkami do izolacji, szczególnie z punktu widzenia otrzymywania form apotionein pozbawionych jonów metali, stąd na wyróżnienie zasługuje objęcie tak szerokim zakresem analiz aż 10 izoform ludzkich MT, gdzie dodatkowo wszystkie białka otrzymywano samodzielnie na drodze ekspresji w systemie bakteryjnym. Cele pracy zostały osiągnięte. Autorka dostarczyła oryginalnych wyników w zakresie porównawczych badań biofizycznych właściwości kompleksów Zn-MT w odniesieniu do ich roli w utrzymywaniu komórkowej homeostazy. Badania obejmowały zarówno apotioneiny oraz nasycone i częściowo nasycone formy Zn-MT. Wyznaczyła grupy o słabym, średnim i mocnym powinowactwie do jonów cynku, co w dalszej części pracy umożliwiło interpretację wyników dotyczących właściwości buforujących i transporterowych MT. W zależności od doświadczenia, wykazała rolę wszystkich lub wybranych MT jako transporterów jonów cynku do metaloprotein, na przykładach peptydu z motywem palca cynkowego, dehydrogenazy



sorbitolu, fosfatazy tyrozynowej 1B oraz niskocząsteczkowych ligandów, takich jak GSH, ATP i L-histydyna. Wybierając MT2a jako model, potwierdziła istnienie słabiej związanego jonu  $Zn^{2+}$  we wszystkich izoformach, wyraźnie pokazując, że jest to integralna cecha funkcjonalna, a nie efekt warunków preparacji MT (pH). Badania nad MT2a stanowią wartościową kontynuację prac zespołu kierowanego przez promotora pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Drozd nad tą izoformą. Przeprowadzając szczegółową analizę fizykochemicznych właściwości domen  $\alpha$  i  $\beta$  ludzkiej MT2a, wykazała ich odmienne właściwości w odniesieniu do parametrów fizykochemicznych obserwowanych dla kompletnej cząsteczki, w szczególności jeśli chodzi o powinowactwo do jonów metali i obecność słabo związanego jonu  $Zn^{2+}$ . Wykorzystując nowoczesne podejście proteomiczne oparte na spektrometrii mas zaproponowała model asocjacji jonów cynku i kadmu do MT2a oraz domen  $\alpha$  i  $\beta$  tej MT oraz zbadała proces asocjacji jonów w odniesieniu do ich transferu z MT2a do dehydrogenazy sorbitolu.

Wysoko oceniam jakość i oryginalność uzyskanych wyników, którym nie umniejszają nieliczne uchybienia merytoryczne lub techniczne opisane poniżej. W odniesieniu do etapu otrzymywania MT, Autorka wybiórczo pokazuje wyniki dotyczące ekspresji, oczyszczania i rozdziałów chromatograficznych dla MT i T, niemal w każdym z podrozdziałów opisując inny zestaw tych cząsteczek. Jest to po części zrozumiałe biorąc pod uwagę, że celem było otrzymanie i analiza aż 10-ciu MT. Rozdział 4.2.2, który wbrew tytułowi opisuje optymalizację ekspresji MT1e w *E. coli*, wymagałby zamieszczenia krótkich wniosków w stosunku do pozostałych izoform. W mojej opinii przejrzystej byłoby przedstawić komplet wyników choć dla 2-3 przedstawicieli z umieszczeniem pozostałych wyników w Załączniku. Odnośnie pomiaru mas cząsteczkowych T i MT, w opinii recenzenta różnice między obserwowanymi a teoretycznymi masami cząsteczkowymi (były wyższe o ok. 1 – 4 Da) dla T i syntetycznych peptydów (Tabele 4.2 i 4.3) wymagają głębszego przedyskutowania w oparciu o cytowaną pozycję nr 261 i podległe jej odnośniki literaturowe. Skoro jedną z przyczyn mógł być tryb liniowy detekcji jonów, wyniki te należałoby zweryfikować korzystając z ogólnodostępnych spektrometrów o wyższej rozdzielczości. Stanowiłoby to dodatkowy atut przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej, gdyż kwestie te, aczkolwiek obserwowane,



pomijane są w dostępnej literaturze prezentującej widma masowe dla MT. W dalszej kolejności, czy możliwe jest, że nieznaczne różnice dotyczące stechiometrii  $Zn^{2+}$  do T w kompleksach  $Zn_7MT$  (Tabela 5.3), najczęściej zaniżone w przypadku testu z użyciem PAR wynikają z faktu, że w przypadku niektórych izoform powinowactwo PAR do  $Zn^{2+}$  jest niższe niż powinowactwo niektórych miejsc wiążących jony tego metalu w MT (patrz: Tabela 1.4). Dalej pojawia się pytanie, czy pewna heterogenność jonów obserwowanych w szczególności dla procesu asocjacji izolowanych domen T2a z jonami  $Cd^{2+}$  nie wynika z rozpadu słabszych kompleksów w źródle jonów ESI w wyniku mniejszego powinowactwa  $Cd^{2+}$  do miejsc wiążących w MT, wynikającego nie tylko z samych właściwości MT, ale też konformacji przyjmowanych na etapie asocjacji (Ryc. 7.3)? Ciekawa, w aspekcie zadanego pytania, jest znacznie mniejsza i porównywalna do Zn-MT heterogenność obserwowana podczas miareczkowania uformowanych kompleksów „nienasyconych” form  $Zn_4\beta MT_2a$  i  $Zn_3\alpha MT_2a$  jonami  $Cd^{2+}$  (Ryc. 7.9B). Pomimo iż praca została przygotowana starannie i napisana w sposób przejrzysty dla czytelnika, przy tak obszernym opracowaniu Autorka nie uniknęła drobnych błędów technicznych. Poniżej wymieniono najważniejsze z nich. Na Ryc. 4.2 i 4.3 brakuje szczegółowych opisów dla poszczególnych ścieżek. W metodzie dotyczącej chromatografii powinowactwa na złożu z chityną brakuje etapu przemywania złoża 0.5% SDS. Chromatogramy na Ryc. 4.8 i 4.9 wskazują na nastryk manualny, w związku z czym nie zawsze uogólnione wnioski na temat czasów retencji frakcji zgadzają się zamieszczonymi profilami elucji. Pojawiają się błędne odniesienia do Tabeli 9.12 w Załączniku (np. Ryc. 4.10, 4.12, 7.2). Numery buforów na Ryc. 5.5 i 5.6 nie zgadzają się z numeracją podaną w Materiałach i Metodach. Błąd w symbolach dla kompleksów jonów  $Cd^{2+}$  (str. 151). Odnosząc się do powinowactwa, Autorce zdarza się czasem stosować skrót myślowy nazywając przykładowo wartość 8.6 stałą dysocjacji (np. str. 127).

Dyskusja została przeprowadzona przejrzyście z naciskiem na najciekawsze i oryginalne wyniki badań Pani mgr Agnieszki Drozd, które wymieniłam w początkowych fragmentach recenzji. Sposób prowadzenia dyskusji i wyciągane wnioski świadczą o bardzo dobrej znajomości tematu, o czym świadczy pośrednio liczba 365 cytowanych pozycji



literaturowych. Autorka wnikliwie ustosunkowała się do wyników badań własnych, odnosząc je do aktualnej wiedzy na temat MT w każdym z obszarów przeprowadzonych badań. Praca dotyczy specjalistycznych aspektów biochemii MT, więc tym bardziej doceniam rzetelne odniesienie wyników i wniosków do biologicznej roli tych białek.

Podsumowując stwierdzam, że cel pracy został osiągnięty, a praca wnosi oryginalny i istotny wkład do wiedzy o budowie i funkcji MT, podważając z sukcesem kilka powszechnie panujących opinii na temat biochemicznych właściwości tych białek oraz wykorzystywania izolowanych domen jako układów modelowych dla całych cząsteczek. Autorka uzyskała wysokiej jakości wyniki dzięki połączeniu nowoczesnych metod i dużego wkładu pracy. Nieliczne uwagi merytoryczne przedstawione w niniejszej recenzji, które mają raczej charakter dyskusji, w żaden sposób nie umniejszają jakości przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 18 marca 2011 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej i dorobek naukowy Autorki, wnoszę o przyjęcie ocenianej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Agnieszki Drozd do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na względzie znaczenie, szeroki zakres, nowatorski charakter i jakość otrzymanych wyników, które gwarantują ich opublikowanie w wysokiej rangi czasopismach o zasięgu międzynarodowym, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drozd.

Dr inż. hab. Jolanta Łukasiewicz