

Dr hab. Joanna Kamińska
Pracownia Genetyki i Biologii Molekularnej Drożdży
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
02-106 Warszawa; ul. Pawińskiego 5a

Warszawa, 18.03.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr. Katarzyny Mizio zatytułowanej:
Charakterystyka transportera MpACR3 z *Marchantia polymorpha* oraz identyfikacja
reszt aminokwasowych związanych ze specyficznością substratów eukariotycznych
transporterów z rodziny ACR3.**

Przedstawiona do recenzji praca wykonana została w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Komórki na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotorem pracy jest Pani dr hab. Ewa Maciaszczyk-Dziubińska, profesor Uniwersytetu Wrocławskiego, a promotorem pomocniczym Pani dr hab. Donata Wawrzycka.

Ocena merytoryczna

Trafność podjętej tematyki badawczej i jej oryginalność

Zakład w którym Pani mgr Mizio wykonała pracę doktorską od lat zajmuje się opisywaniem mechanizmów oporności komórek eukariotycznych na związki arsenu i antymonu. Arsen jest toksycznym pierwiastkiem, jednym z 10 związków chemicznych/pierwiastków, którego stężenie w środowisku monitoruje Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO). Jego stężenie w wodach pitnych w niektórych regionach świata przekracza znacząco obowiązujące normy WHO. Dodatkowo arsen jest pobierany i akumulowany przez rośliny oraz organizmy wodne. Wraz z wodą i pożywieniem dostaje się do organizmu człowieka. Z powodu globalizacji handlu problem jakim jest żywność skażona arsenem rozpowszechnia się po świecie. Najlepszym przykładem jest tu handel ryżem. Warto zwrócić uwagę, że długotrwałe narażenie na arsen może powodować między innymi raka i zmiany skórne. Z jego działaniem wiąże się również choroby układu krążenia i cukrzycę. Narażenie na arsen w okresie płodowym i we wczesnym dzieciństwie zostało powiązane z negatywnym wpływem na rozwój poznawczy i zwiększoną liczbą zgonów młodych dorosłych. Z powodu problemu jakim dla zdrowia jest arsen potrzebne jest poznanie mechanizmów jego tolerancji jakie wykształciły się w trakcie ewolucji. Ma to duże znaczenie praktyczne, między innymi pozwoli w dalszej perspektywie na wyhodowanie transgenicznych roślin, które nie będą akumulować arsenu w organach, które spożywamy. Inne znaczenie poznawania mechanizmów transportu arsenu związane jest z jego wykorzystywaniem w terapii nowotworów oraz chorób wywoływanych przez pierwotniaki i uzyskiwaniem oporności na taką terapię zarówno komórek nowotworowych jak i pierwotniaków. W poznawanie mechanizmów tolerancji arsenu wpisuje się przedstawiona do recenzji praca, w której Doktorantka postawiła sobie dwa cele (1) charakterystykę transportera arsenu z wątrobowca *Marchantia polymorpha* w układzie heterologicznej ekspresji genu kodującego to białko w drożdżach piekarskich *Saccharomyces*

cerevisiae; (2) poszukiwane reszt aminokwasowych drożdżowego białka ScAcr3, które nadają temu transporterowi zdolność selektywnego transportu arsenu lub antymonu.

Oba badane zagadnienia są oryginalne, chociaż z pracy nie dowiedziałam się dlaczego Doktorantka, spośród białek z rodziny Acr3 o długich końcach aminowych, wybrała do charakterystyki białko z wątrobowca.

Uzyskane wyniki i ich znaczenie dla nauki

Przeprowadzone badania wykazały, że ekspresja genu *MpACR3* w fuzji z genem białka zielonej fluorescencji (GFP) w drożdżach skutkuje powstawaniem białka fuzyjnego, które jest funkcjonalne. Dalsze prace charakteryzowały to białko fuzyjne. Badane białko *MpACR3* w warunkach hodowli komórek drożdży na standardowych podłożach lokalizowało się w retikulum endoplazmatycznym (ER), a po dodaniu arsenu lub antymonu ulegało przetransportowaniu do błony komórkowej. Dalsze badania wykazały, że za retencję białka *MpACR3* w ER odpowiada jego długi aminowy koniec. W tym końcu Doktorantka wytypowała motyw istotny dla zatrzymania białka *McACR3* w ER, a także stwierdziła, że, z 5 reszt cysteinylowych obecnych w tym końcu, 3 są niezbędne, aby białko mogło zostać wytransportowane z ER do błony komórkowej. Podjęła też próbę dla porównania scharakteryzowania innego transportera z tej samej rodziny pochodzącego z mchu *Physcomitrella patens*, co pozwoliło stwierdzić, że N koniec białka *PpACR3* ma znaczenie dla jego lokalizacji.

W dalszej drugiej części pracy przetestowane zostało znaczenie wybranych trzech reszt aminokwasowych z regionów transbłonowych białka *MpACR3*, dla jego aktywności. Były to reszty odpowiadające tym, które znane były z wcześniejszych badań jako istotne dla działania drożdżowego białka ScAcr3. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że wszystkie są potrzebne do działania *MpACR3* jako transportera, nie mają zaś wpływu na zatrzymanie/wytransportowanie białka w ER. Ciekawą jest obserwacja, że po dodaniu arsenu pojawiała się forma białka *MpACR3*, która wolniej migruje w żelu poliakrylamidowym. Jej obecność wydaje się być związana z aktywnością białka, a nie jego lokalizacją. Określenie czym jest ta wolniej migrująca forma przyczyni się do lepszego poznania mechanizmu transportu arsenu/antymonu przez *MpACR3*.

W drugiej części pracy wykorzystując mutagenezę spontaniczną i ukierunkowaną Doktorantka uzyskała wersje ScAcr3, które są specyficzne względem arsenu lub antymonu. Jest to bardzo istotny wynik. Wiadomo na przykład, że u roślin arsen dostaje się do komórek też przez transportery innych związków np. transportery fosforu. Dlatego poznawanie mechanizmów które odpowiadają za transport arsenu, sposobów modyfikowania specyficzności substratowej transporterów, ma fundamentalne znaczenie dla biotechnologii, medycyny i hodowli roślin. Uzyskane rezultaty mogą więc mieć znaczenie praktyczne.

W pracy uwagę zwraca wysoka jakość przedstawionych wyników (klarowne zdjęcia blotów i spod mikroskopu), co świadczy o dużej sprawności technicznej Doktorantki. Ryciny prezentują się dobrze wizualnie, ujednolicony jest sposób ich opisu, co ułatwia zapoznawanie się z wynikami.

Poprawności formalno-językowa

Praca napisana została w języku polskim. Pracę generalnie czyta się dobrze. Jednakże w warstwie poprawności formalno-językowej, stylistycznej i interpunkcyjnej Doktorantka nie ustrzegła się różnych błędów. Pierwszym typem błędu jest używanie nazwy białka zamiast

genu przykładowo na stronie 35 jest ekspresja kompleksu Fet3-Ftr1. Ekspresji ulegają geny kodujące podjednostki tego kompleksu. Tego typu błąd pojawił się kilkakrotnie. Kilkakrotnie też Doktorantka zapomniała o zapisie nazw genów kursywą. Inne błędy formalno-językowe to na str. 91 w podpisie Ryciny 4.6 „Komórki szczepu *acr3Δ* transformowanego [...] ScACR3-GFP lub MpACR3-GFP” – zapis wskazujący na transformację komórek białkiem.

Błędny jest podpis Ryciny 4.15: „Analiza fenotypowa ekspresji...” Raczej powinno być analiza fenotypowa komórek drożdży w których zachodzi ekspresja. W tejże w A i B jest napisane „Ekspresja *PpACR3* i ΔN -*PpACR3*” oraz „ekspresja genu”, podczas gdy rycina przedstawia wzrosty komórek drożdży.

Kolejnym błędem jest konstrukcja zdania wskazująca na intencjonalność procesu. Są to sformułowania typu: „frakcja MpACR3, która zdołała uchylić się retencji i przejść do błony komórkowej”. Białko nie podejmuje decyzji.

Do grupy błędów formalno-językowych zalicza się tytuł ryciny 1.1. „Narodziny białka”. Białka pojawiły się w trakcie ewolucji.

W kilku miejscach wkradły się skróty jakimi posługujemy się w potocznych rozmowach w laboratorium. Przykładowo na stronie 110 jest: „migrowały w żelu poliakrylamidowym w postaci pojedynczego prążka i w ścieżce kontrolnej i po arsenie.” Rozumiem, że w analizie Western Blot badane warianty białka uwidaczniały się jako pojedynczy prążek zarówno gdy analizowano ekstrakty z komórek nie poddanych jak i poddanych działaniu arsenu. Tamże jest też „warianty błonowe (MpACR3-L45A...)” – wszystkie analizowane warianty są dalej białkami błonowymi. Ten sam błąd (str. 93) „opisana powyżej regulacja na poziomie lokalizacji błonowej” – badane białka są białkami błonowymi zawsze, chodziło chyba o lokalizację subkomórkową. Żargonem jest ponadto określenie „sekwencje glonowe” – str. 104.

Brak rozwinięcia nazwy motywu LRCRF w pierwszym miejscu gdy się on pojawia (str.108), a wyjaśnione jest na stronie 150. Podobnie jest z motywem di-lizynowym (str. 149), nie jest on określony. Jest on podany dwa wersety później, ale nie ma połączenia między informacjami, nie ma też wytłumaczenia, że K to lizyna. Nie ma wytłumaczenia czym są dwa motywy wspomniane na stronie 142.

Nie znam procesu degradacji endocytarnej (str.103 i str. 140), znam tylko degradację wakuolarną białek dostarczonych do wakuoli drogą endocytozy. Endocytoza to proces, nie przedział komórkowy. Nie spotkałam się z określeniem „degron endocytny” – str. 140.

W pracy są pojedyncze, nieliczne błędy edytorskie typu brak przerw między wyrazami oraz gramatyczne – niewłaściwe formy fleksyjne.

Ocena metodologii

Dobór literatury i jej wykorzystanie

W przedstawionej pracy doktorskiej Autorka odniosła się do 283 pozycji literaturowych, z których połowa to publikacje z ostatnich 10 lat. Jest to w większości literatura dotycząca transportu arsenu i antymonu. Na podstawie takiej lektury Doktorantka napisała obszerny wstęp i wykorzystwała ją do przeprowadzenia dyskusji. Inną grupę stanowią publikacje opisujące użyte materiały i metody. Dobór literatury uważam za adekwatny.

Poprawność formułowania problemów badawczych

Przeprowadzone badania przedstawiają ciąg logicznych eksperymentów. Jednakże pierwszy z postawionych celów czyli charakterystyka białka MpACR3 jest dość ogólny. Nie można przewidzieć z niego co konkretnie Doktorantka zamierza zbadać, co uważa za charakterystykę, a więc nie można stwierdzić czy cel został osiągnięty. Przykładowo charakterystyka białka może obejmować czas jego półtrwania, a tym Doktorantka się nie zajmowała.

W trakcie badań Doktorantka zaobserwowała pojawianie się inaczej (wolniej/szybciej) migrujących form białek odpowiednio MpACR3 i ScAcr3. W przypadku MpACR3 zinterpretowane zostało, że białko ulega potranslacyjnej modyfikacji, co spowalnia jego mobilność w żelu. Jest to jedna z możliwości. Jednakże obserwowane jest, że zmiany w konformacji białka błonowego powodują zmiany mobilności nawet w warunkach denaturujących – <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>. W tym przypadku badanie modyfikacji białka MpACR3 może zakończyć się opisaniem jego modyfikacji, co samo przez się jest interesujące, ale może nie odpowiedzieć na pytanie czym jest jego wolniej migrująca forma.

Trafność doboru metod i narzędzi badawczych

W badaniach mechanizmów oporności komórek na różnego typu stresy w tym na ten wywoływany przez różnego typu związki toksyczne od lat z powodzeniem wykorzystuje się modelowy organizm jakim są drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae*. Wynika to z faktu, że budowa komórek tych grzybów nie różni się od budowy komórek organizmów wyższych, za to posiadają kilka istotnych cech jak krótki czas generacji, łatwość hodowli i przeprowadzania analiz genetycznych jak i biochemicznych. To podejście wykorzystywała Pani mgr Mizio wprowadzając do wspomnianych drożdży gen *MpACR3* w celu scharakteryzowania białka MpACR3, które jest kodowane przez ten gen. Doktorantka w trakcie realizacji pracy wykorzystywała szereg metod badawczych, którymi typowo posługuje się biologia molekularna. Specyficzną dla tej pracy była metoda pomiaru transportu metaloidów *in vitro* przez odwrócone błony komórkowe zamknięte w pęcherzyki. Wykorzystując natomiast mutagenezę ukierunkowaną i spontaniczną genów *MpACR3* i *ScACR3* uzyskiwała allele kodujące białka z substytucjami reszt aminokwasowych. Jest to metoda powszechnie stosowana do poznania znaczenia poszczególnych reszt dla fałdowania, właściwej lokalizacji, czy aktywności białek. Takie podejście eksperymentalne było adekwatne do założonych celów i pozwoliło na opisanie znaczenia aminowego końca MpACR3, znalezienia reszt aminokwasowych w domenach transbłonowych istotnych dla transportu arsenu, a w przypadku ScAcr3, otrzymania wersji białka transportującego albo wyłącznie arsen albo wyłącznie antymon.

Prawidłowość struktury pracy

Praca liczy 180 stron, ma typowy układ, zawiera kolejno streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, spis treści, wstęp, rozdziały cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, bibliografia i aneks. W mojej opinii w pracy zabrakło na koniec, po dyskusji, krótkiego fragmentu przedstawiającego perspektywę dalszych badań i rozdziału podsumowującego, zawierającego najważniejsze wnioski, osiągnięcia tej pracy.

Uwagi

We wstępie Doktorantka napisała: „V-ATPazy, F-ATPazy i A-ATPazy zaliczane są wspólnie do grupy syntaz ATP, ponieważ w warunkach fizjologicznych najczęściej wykazują aktywność odwrotną do ATP-azowej – wykorzystują gradient H^+ do syntezy ATP”. Ponieważ

zdanie to było niezgodne z moją wiedzą dotyczącą V-ATPazy, że jest to enzym który raczej zużywa ATP i to w dużych ilościach i dlatego jego aktywność jest limitowana w warunkach niedoboru składników pokarmowych. Przeszukałam więc cytowaną publikację. Owszem jest tam napisane, że V-ATPaza może syntetyzować ATP, ale w warunkach *in vitro*. Mam więc pytanie gdzie Autorka znalazła informację, że V-ATPaza w warunkach fizjologicznych syntetyzuje ATP?

Niefortunne jest zdanie: „V-ATPaza Vma1, obecna także w błonach innych organelli.” V-ATPaza to kompleks wielopodjednostkowy, a białko Vma1 to jedna z wielu podjednostek tego kompleksu. Jest to białko subkompleksu określanego V₁, który znajduje się w cytozolu i który nie oddziałuje bezpośrednio z błonami lecz z subkompleksem błonowym V-ATPazy - V₀.

Str. 27 Miałam problem ze zdaniem: „Domeny zaangażowane w translokację substratu budują przenikające się regiony transbłonowe”. Proszę o komentarz, bo w obecnej formie odbieram, że domeny zaangażowane w transport jako struktury większe, wyższego rzędu niż regiony transbłonowe, czy też chodziło jednak o to że domeny zaangażowane w translokację substratu są zbudowane z przenikających się regionów transbłonowych?

Co oznacza kod kolorystyczny na Rycinie 1.9 i na Rycinie 1.10? Czy na Rycinie 1.10 gen *gapdh* u *Pseudomonas* zaznaczony jest właściwym kolorem?

Rycina 1.10 Wymienione geny u *Bacillus subtilis* Tn to *arsR* ORF2, *acr3* *arsC* a w opisie w tekście *acr3* opisany jako *arsY* – powinno być ujednolicone.

W rozdziale Materiały i Metody zabrakło:

- pełnego genotypu używanego szczepu, będącego pochodną W303-1A. Ze względu na to, że szczep W303-1A nie był używany, więc genotypu trzeba szukać w pracy Wysocki i wsp., 2001.

- w tabeli przedstawiającej wykorzystane w pracy plazmidy spisu plazmidów, które Doktorantka skonstruowała, a które niosą geny *MpACR3* i *ScACR3* z mutacjami, skutkującymi badanymi substytucjami aminokwasowymi. Tu jest się czym pochwalić, nie trzeba tego ukrywać.

W rozdziale Warunki hodowli nie ma opisu pożywek z dodatkiem soli arsenu i antymonu. Opis tych pożywek jest dopiero na stronie 72 w podrozdziale 3.17 – dlaczego?

Na Rycinie 4.2 zabrakło dla porównania pokazania wzrostu szczepu typu dzikiego. Czy gdy ekspresja *ScACR3* zachodzi z plazmidu to obserwowana jest pełna komplementacja wrażliwości na arsen szczepu *acr3Δ*?

W opisie na stronie 90 jest odwołanie „Dla porównania drożdżowy homolog *ScAcr3* lokalizuje się w błonie komórkowej niezależnie od obecności swoich substratów (por. Ryc.4.44....). Niestety na Rycinie 4.44 nie przedstawiono lokalizacji *ScAcr3* w komórkach hodowanych w podłożu bez dodatku substratów.

Rycina 4.6 - Czy powtarzalnie obserwuje się wyższy poziom *ScAcr3*-GFP po dodaniu do hodowli soli antymonu?

Na rycinie 4.33 Czy zawsze było widać wyższy poziom białka z substytucjami przed dodaniem arsenu w porównaniu do białka bez substytucji, czy to tylko na przedstawionej rycinie?

Pytania

W trakcie obrony chciałabym się dowiedzieć:

- co Doktorantka uważa za najważniejsze osiągnięcie swojej pracy i dlaczego oraz
- jakie są dalsze perspektywy tego projektu.

Dlaczego Doktorantka używa nazwy *ScACR3* zamiast *ARR3*, którą podaje baza danych SGD?

Czy z przeprowadzonych eksperymentów można wnioskować, którego fragmentu białka MpACR3 dotyczy modyfikacja, która skutkuje wolniejszą jego migracją w żelu poliakrylamidowym?

Czy da się rozróżnić dwie sytuacje, które mogą być skutkiem wprowadzonych substytucji aminokwasowych w N-końcowym fragmencie białka MpACR3, tj.:

akumulację białka MpACR3 w ER związaną z zaburzeniem rozpoznawania tego białka przez maszynę odpowiedzialną za jego wytransportowanie od

akumulacji tegoż białka ze względu na spowolnienie rozpoznawania go przez białka odpowiedzialne za jego translokację do ER i odpowiednie wstawienie do błony lub/oraz wydłużone oddziaływanie z białkami opiekuńczymi?

Pomimo wypisanych zastrzeżeń moja ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Mizio jest pozytywna. Badania są oryginalne, na odpowiednim poziomie technicznym i merytorycznym. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa doktorska „Charakterystyka transportera MpACR3 z *Marchantia polymorpha* oraz identyfikacja reszt aminokwasowych związanych ze specyficznością substratów eukariotycznych transporterów z rodziny ACR3.” spełnia warunki określone ustawie z dnia 14 marca 2003 r. Składam więc wniosek Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Mizio do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Joanna Kamińska