

Prof. dr hab. Michał Jasiński

Poznań, 14.02.2023

Ocena rozprawy doktorskiej mgr KATARZYNY MIZIO

Tytuł rozprawy: Charakterystyka transportera MpACR3 z *Marchantia polymorpha* oraz identyfikacja reszt aminokwasowych związanych ze specyficznością substratową eukariotycznych transporterów z rodziny ACR3

Promotor: dr hab. Ewa Maciaszczyk-Dziubińska, prof. UW

Promotor pomocnicza dr hab. Donata Wawrzyska

Arsen(As) i antymon(Sb) to toksyczne metaloidy występujące w środowisku. W zależności od stopnia utlenienia (III/V) w różny sposób dostają się one do komórek organizmów żywych wykorzystując transportery innych związków takie jak np. akwagliceroporyny, permeazy heksozowe czy transportery fosforanowe oraz wywierają różne toksyczne efekty m.in. wiążąc się do aktywnych form enzymów, a także bezpośrednio zaburzając fałdowanie białek. Skażenie wód gruntowych arsenem jest realnym zagrożeniem w wielu miejscach na ziemi a długotrwała ekspozycja na ten pierwiastek prowadzi do poważnych problemów zdrowotnych. Z drugiej strony, toksyczne właściwości związków arsenu czy antymonu wykorzystywane są np. w nowoczesnych chemioterapiach przeciwnowotworowych i przeciwprwotniakowych. Zatem zrozumienie molekularnych mechanizmów oporności komórek eukariotycznych na te pierwiastki jest niezbędne do opracowania skuteczniejszych metod terapeutycznych, ale także określania wrażliwości ludzi narażonych na długotrwałą ekspozycję na nie. Mimo, iż arsen przedostaje się do komórki korzystając z transporterów innych związków podlegając jednocześnie metabolizmowi (np. metylacji do form organicznych przez metylotransferazy ArsM), to komórki wykształciły specyficzne białka umożliwiające jego usuwanie z cytoplazmy. To naturalna konsekwencja presji selekcyjnej powodowanej obecnością arsenu w stosunkowo wysokich stężeniach w środowisku. Warto zauważyć także, iż oporność na antymon, który choć w niższych stężeniach w środowisku naturalnym współwystępuje z arsenem, nadawana jest przez transportery arsenu. Arsenowe transportery należą do sześciu odrębnych ewolucyjnie i różniących się specyficznością substratową rodzin. Dotychczas zidentyfikowano transportery specyficzne jedynie dla As(III) lub As(III)/Sb(III), ale nie Sb(III). Wśród nich białka ArsB, Acr3 oraz ArsK transportują nieorganiczne formy As(III) i Sb(III), ArsK i ArsP nadają oporność na organiczne związki As(III), ArsI warunkuje oporność na As(V), a niedawno opisany transporter ArsW na kwas monometyloarsenawy (MAsV). Rodzina transporterów błonowych ACR3 rozpowszechniona jest u bakterii, archeonów oraz wielu gatunków eukariontów a najlepiej scharakteryzowanym jej członkiem pozostaje Acr3 z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (ScAcr3). ScAcr3 wykorzystuje energię gradientu elektrochemicznego H^+ i eksportuje As(III) oraz Sb(III) z cytoplazmy do środowiska. W recenzowanej pracy dokonano kompleksowej charakterystyki białka Acr3 pochodzącego z wątrobowca *Marchantia polymorpha* (MpACR3). Swoistego rodzaju ważnym dodatkiem w tej historii jest także zestaw eksperymentów dedykowany innemu białku Acr3 z *Physcomitrella patens* (PpACR3). Autorka wykorzystując kompleksową wiedzę o ScAcr3 z *S. cerevisiae* a także przystępną heterologicznego systemu ekspresji jakim są drożdże piekarnicze, (i) pokazuje funkcjonalną zachowawczość roślinnych homologów, (ii) stawia ciekawe hipotezy (rola końca aminowego w funkcjonalności

MpACR3), (ii) przeprowadza wnikliwą analizę z wykorzystaniem serii mutantów by wykazać, iż aktywność transportowa białka MpACR3 zależy od obecności reszt m.in. Cys236, Glu407 i Glu434, które są wysoce konserwatywne w rodzinie białek ACR3 a aminowy dłuższy region białka (opisany dalej jako N-koniec) MpACR3 pełni funkcję sensora metaloidów w komórce i reguluje lokalizację subkomórkową tego transportera. Co więcej, na podstawie analizy mutacyjnej genu ScACR3 autorka identyfikuje reszty aminokwasowe zaangażowane w nadawanie specyficzności transportowej. Praca stanowi ważne źródło wiedzy nie tylko o ciągle słabo poznanych transporterach ACR3 występujących u glonów i roślin lądowych, ale przede wszystkim o mechanizmach regulujących funkcjonowanie tej ważnej grupy białek.

Ocena formalna rozprawy

Formalna strona pracy nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa skonstruowana została w sposób tradycyjny. Otwierają ją, poza technicznymi informacjami (źródła finansowania, wykaz skrótów, spis treści), streszczenia w języku polskim i angielskim. Oba teksty są spójne i w sposób zwarty opisują całość dysertacji. Wstęp wprowadza czytelnika w zagadnienie opisując szczegółowo powiązania metaloidów (głównie arsenu) z organizmami żywymi, mechanizmy ich toksyczności czy rolę transportu poprzez błony biologiczne zarówno w akumulacji jak i detoksykacji komórek. Dość szczegółowo omówiono także transportery arsenu ze szczególnym naciskiem na rodzinę ACR3. Następny rozdział to cel pracy. Kolejne sekcje to zestawione ze sobą materiały i metody (3) oraz wyniki (4) i dyskusja (5). Całość zamyka bibliografia oraz aneks będący zestawieniem sekwencji ortologów ACR3 z roślin i glonów.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca napisana jest przejrzysto, z zachowaniem właściwych proporcji pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. Tekst jest wzbogacany estetycznymi ilustracjami. Te ostatnie np. we wstępie można umownie podzielić na dedykowane arsenowi 1.1.-1.4 oraz transporterom 1.1-1.14. Uzupełniają one przekaz, choć niekiedy (zwłaszcza część transportowa) cechuje je sporo żargonowych anglicyzmów w legendach. Anglicyzmy zresztą brylują także w tekście czasem nawet w hybrydowej formie np. „Procesy związane z wewnątrzkomórkowym transportem białek transmembranowych określa się mianem *traffickingu* błonowego (ang. membrane trafficking)„. Czasem brak jest opisu skrótów/elementów ilustracji np. ERES Ryc. 1.5 a tekst pisany jest kursywą bez uzasadnienia (fragment legendy Rys. 1.2). Dość swobodnie, zamiennie i w nieprzewidywalny sposób autorka stosuje binominalne nazewnictwo gatunków w wersji pełnej i skróconej, podobnie wygląda pisownia aminokwasów w zapisie jedno lub trzyliterowym. Swoboda jest także zauważalna w opisie/lub braku znaczenia kodu kolorów ilustrujących zachowawczość aminokwasów na wykresach np. Ryc. 4.28 vs. 4.51. Edytorsko nienajlepszym posunięciem jest pozycjonowanie tabeli 4.2 na stronie 105 kiedy wzmianki o niej pojawiają się pierwszy raz na stronie 85. Docenić należy uwagę przypisywaną dużej liczbie mutacji, nazw własnych, numerów akcesyjnych itp. pojawiających się w tekście. Niewielkie przejęzyczenia np. reszty anilinowe str. 118 czy alanilowe str. 124. Dobrze oceniam pragmatyczny koncept (np. sekcja 4.2.3.) krótkiego (czasem jednozdaniowego) podsumowania najważniejszego przesłania jakie płynie z danego rozdziału. Zastosowanie skrótów w tekście to dobry zabieg znacząco upraszczający pisanie. Ich obecność w tekście nie przeszkadza. Może niepotrzebne jest też przy takim podejściu powtarzanie rozwinięć niektórych skrótów w tekście głównym (np. UPS, RING, MFS). Niektóre skróty nie trafiły do spisu (np. NBD, TMD). Jest to szczególnie widoczne dla np. szeregu nazw buforów, odczynników (SDS, DTT, YPDA etc...) z rozdziału materiały i metody. Sprawdzają się odnośniki do materiałów i metod wplecione w tekst w sekcji wyniki. Całość rozprawy to 180 stron tekstu, 73 rycin i 282 cytowanych publikacji.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawę Pani Katarzyny Mizio otwiera streszczenie, które skupia się na rodzinie transporterów ACR3. Prosto, przejrzysto eksponuje z jednej strony swoisty układ modelowy tj. ScAcr3 z drugiej główny obiekt zainteresowania tj. MpACR3. Pozwala ono zrozumieć znaczenie heterologicznej ekspresji (drożdże), funkcjonalnej zachowawczości w proponowanych badaniach (komplementacja) oraz pozycjonuje rejony MpACR3 (N-koniec) jak i motywy aminokwasowe (np. LRCRF) jako istotne dla lokalizacji i jego funkcji w komórce. To przemyślana kompozycja, która klarownie pokazuje wartość odkrycia.

Kolejny rozdział to wstęp. Dostarcza on solidnej dawki wiedzy podstawowej o arsenie, transporterach błonowych oraz ich roli w akumulacji i detoksykacji komórek z jego związków. Wolumen informacji o arsenie jest uzasadniony. Szczególnie podkreślić należy opis interakcji tego pierwiastka z organizmami żywymi oraz jego transformacje w komórkach (np. metylacja). Nieco nieobecny jest antymon. W pewnym sensie jest to uzasadnione, gdyż w środowisku naturalnym współwystępuje z arsenem ale w znacząco mniejszych ilościach, niemniej jednak szkoda, że wzmianka o nim pojawia się (prawie jako poboczny tekst) dopiero w rozdziale 1.3.1. dedykowanemu ...ścieżkom poboru arsenu przez komórki. Trochę niepotrzebne są powtórzenia w kilku miejscach informacji dotyczącej powinowactwa As(III) do grup sulfhydrylowych (-SH) i jego konsekwencji w postaci zmian konformacyjnych białek str.19 i 21. Ciekawy wątek wstępu stanowią transformacje arsenu *in vivo*. Informacje o transporterach koniugatów tego pierwiastka (glutation/fitochelatyny) są istotne w rozumieniu funkcjonowania tego systemu detoksykacji zwłaszcza u roślin. Wakuola to ważny kompartment w tym ostatnim scenariuszu i dobrze, że ma swój podrozdział 1.3.2.4. Duży fragment wstępu dedykowany jest transporterom błonowym (klasyfikacja), ich biogenezie oraz specyficzności. Wiedza ta zdecydowanie ułatwia odbiór dalszej części dysertacji, może nieco zbyt rozbudowany (w moim odczuciu) jest fragment dotyczący mechanizmów transportu. Owszem poglądowy ale o wiele lepszy i równie obszerny jest np. przegląd „importerów i eksporterów” arsenu. To bardzo systematyczny tekst. Historycznie sięga do lat 80 ubiegłego wieku i prokariotycznych operonów ars by ostatecznie wyeksponować głównego bohatera ScArs3. Ten ostatni, i to warto podkreślić, przedstawiony jest kompleksowo z uwzględnieniem: (i) regulacji ekspresji na poziomie transkrypcji (Yap8), (ii) struktury (modelowanie homologiczne), jak i (iii) roli modyfikacji potranslacyjnych (ubikwitynacja/fosforylacja) w aktywności transportowej. Szczegółowy opis funkcjonowania kompleksu ScAcr3/Fps1/Rgc1/Rgc2/Hog1 świetnie pokazuje gdzie jesteśmy dziś w rozumieniu znaczenia interakcji białko-białko w regulacji dystrybucji arsenu poprzez błony biologiczne. Chciałbym wyeksponować w recenzji jeszcze jedną informację przewijającą się we wstępie a mianowicie brak homologów ScAcr3 u roślin nasiennych. To nie tylko informacja ale cały wątek (ekspresja drożdżowych i eukariotycznych ortologów Acr3 w roślinach nasiennych takich jak ryż czy rzodkiewnik i jej konsekwencje fenotypowe) na którym można zbudować ciekawą dyskusję. Brakuje zdecydowanie, choć kilku zdań, na temat Porostnicy wielokształtnej. To organizm modelowy z ugruntowaną pozycją w badaniach podstawowych i w pewnym sensie kluczowy (unikalny charakter N-końca) dla ocenianej pracy.

Kolejna część rozprawy to cel pracy. Wspominam o nim gdyż czasem staje się niepotrzebnie rozpisany całym podrozdziałem. W recenzowanej dysertacji jest precyzyjny, krótki, taki jak być powinien.

Dalszą część rozprawy stanowi opis materiałów i metod wykorzystanych podczas realizacji prezentowanych badań. Dominującą formą przekazu są tu tabele. To dobre rozwiązanie. Trochę mieszają się materiały z metodami ale nie jest to rażące i zebrane logicznie (np. sekcja 3.18 opis mutagenезы razem z tabelą starterów). Wyróżnia się opis metod. To często skręcany lub skrótowo opisywany zbiór informacji. W ocenianej pracy kompletny, bardzo dobrze zbalansowany i doskonale opisowy (wszyscy wiemy jak ważne jest pochodzenie mleka odtłuszczonego dla sukcesu immunodetekcji!).

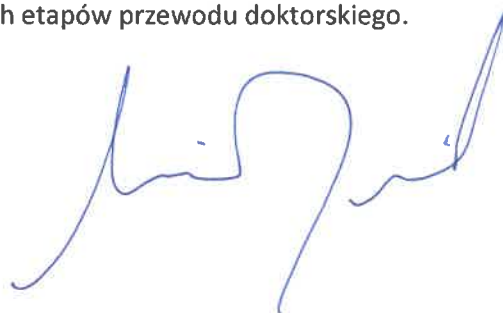
Tradycyjnie, główny trzon pracy stanowią rozdziały, w których przedstawione i omówione zostały wyniki. Punktem wyjścia do badań są poczynione obserwacje dotyczące składu aminokwasowego N-końcowych regionów białek ACR3 pochodzących z roślin lądowych (Embryophyta) i glonów (Chlorophyta, Charophyta). Autorka skupia się na tych o długich N-końcach (przynajmniej 106 aminokwasów) a ostatecznie wybiera ACR3 z *Marchantia polymorpha* (N-koniec o długości 147 reszt aminokwasowych). Tworzenie zbioru tych białek wydaje się być istotne i poprosiłbym o komentarz dotyczący stojącej za nim metodologii a także o krótki komentarz co przemawiało na korzyść selekcji MpACR3? GenBank jest oczywiście pewnym wyborem (zwłaszcza na danym etapie realizacji projektu) ale czy rozważano/uaktualniano zestaw korzystając z innych źródeł np. kolekcji transkryptomów 1000 gatunków roślin (Viridiplantae) (<https://db.cngb.org/onekp/>)? Jak pokazuje ekspresja MpACR3 w komórkach szczepu *acr3Δ* oraz eksperymenty transportu (Ryc. 4.2 i 4.3) MpACR3 pełni funkcję transportera o podwójnej specyficzności wobec As(III) oraz Sb(III). Nie do końca satysfakcjonujący eksperyment transportu antymonu skłania do pomysłu, w tym wypadku, zastosowania dodatkowej kontroli lokalizacji tego transportera w błonie komórkowej (konkretnie dla linii wykorzystanych w tym eksperymencie, którego wynik jest na Ryc. 4.3). Jak rozumiem do transportu stosowano konstrukty/szczepy z białkiem znakowanym GFP, jest więc to możliwe i czy brano pod uwagę taką kontrolę? Nie mam także jasności czytając rozdział 4.1.3 oraz 3.30 co do szczegółów eksperymentu (np. liczba N prób na punkt czasowy) oraz narzędzi statystycznych zastosowanych przy tworzeniu Ryc. 4.3. Znakowane GFP warianty MpACR3 odgrywają ważną rolę na dalszych etapach badań. Śledzenie losów lokalizacji tego białka stało się podstawą odkrycia, że relokacja MpACR3 do błony komórkowej jest specyficzną odpowiedzią na arsen i antymon. Wskazuje to na istnienie nowego mechanizmu umożliwiającego post-translacyjną regulację odpowiedzi na te metaloidy na poziomie sortowania MpACR3. Sortowanie do błony komórkowej zależy od obecności N-końcowego regionu tego białka i warunkuje jego czasową retencję w retikulum endoplazmatycznym. Autorka precyzyjnie definiuje zachowawcze aminokwasy (poz. 28-97) w obrębie tego regionu, których usunięcie nie wpływa na funkcjonalność transportera i jednocześnie powoduje niezależną od arsenu i antymonu lokalizację w błonie komórkowej. Interesujący wątek tej części dysertacji stanowią analizy z wykorzystaniem techniki Western Blot. Ukazują one bowiem specyficzną dla MpACR3 oraz dla ekspozycji na As(III) i Sb(III) obecność dodatkowej formy (ok 100kDa) tego białka. Ciekawi mnie jednak ewentualny komentarz braku tej formy na Ryc. 4.8 B. Autorka zgłębia mechanizm relokacji charakterystyczny dla grupy białek ACR3 o długich N-końcach. W tym celu dodatkowo wykorzystuje obok MpACR3 także pochodzące z *Physcomitrella patens* białko PpACR3 (57,11% identyczności do MpACR3 i posiada N-koniec o długości 147 reszt aminokwasowych). Mimo trudności związanych z niską wydajnością produkcji PpACR3 w komórkach, generalnie te wyniki wzmacniają hipotezę o wspólnym mechanizmie regulacji sortowania eukariotycznych białek ACR3 posiadających długą wersję N-końca. Chciałbym przy tej okazji zapytać czy testowano (immunodetekcja) obecność cięższej formy PpACR3 po ekspozycji na As? Myślę, że wartościową kontrolą w wizualizacji kompartmentów (często przewija się retikulum, endosom) w komórkach drożdży byłoby zastosowanie dla tego typu obrazów/lokalizacji znakowanych markerów chociażby takich jak te proponowane w pracy Zhu et al., 2019 (<https://doi.org/10.1128/mBio.01691-19>). Wątek roli/znaczenia N-końca nie tylko w sortowaniu ale i stabilności białka MpACR3 świetnie oddają eksperymenty z zamianą końców pomiędzy ScAcr3 a MpACR3. Bardzo ciekawa jest identyfikacja oraz charakterystyka di-argininowego motywu LRCRF i jego roli w retencji retikularnej oraz powstawania lub braku dodatkowych form (na Ryc. 4.23 oraz 4.26 przydałyby się markery masy). Uważam ten fragment pracy za istotny, nie tylko ze względu na strategię/nakład pracy ale przede wszystkim uwagę przykładaną do roli reszt Leu45, Arg46 oraz Arg48 w retencji transportera MpACR3 w retikulum, a reszt C47 oraz F49 w relokacji tego białka do błony komórkowej w odpowiedzi na arsen. Jest to nowa wiedza która, i to chyba najlepsze, rodzi także szereg pytań np. o pojawianie się cięższej formy białka w tym scenariuszu. Motyw LRCRF to nie jedyny badany szczegółowo przez Autorkę. Zwraca Ona uwagę także na powtarzające się w N-końcu MpACR3 reszty cysteinylowe (Cys29, Cys47, Cys71, Cys73, Cys96), które wydają się być zaangażowane w relokację MpACR3 w odpowiedzi na As(III) i Sb(III) do błony komórkowej. Ich obecność sprawia, iż N-końcowy fragment tego białka w obecności As(III) ulega zmianom konformacyjnym mającym wpływ na jego stabilność. Kolejny ważny wątek dysertacji to

identyfikacja reszt aminokwasowych niezbędnych dla funkcji transportowej. Tutaj poza potwierdzeniem znaczenia zachowawczych reszt kwasu glutaminowego (Glu 407, 434) oraz reszty cysteinykowej (Cys 236) dla transportu jest jeszcze ciekawy efekt mutacji tych aminokwasów na obecność cięższej formy MpACR3.

Swoistego rodzaju wisienką na torcie w ocenianej dysertacji jest wykorzystanie mutagenyzy celem identyfikacji reszt aminokwasowych zaangażowanych w nadawanie specyficzności transportowej białku ScAcr3 oraz MpACR3. To bardzo kompleksowy ale i kompletny zestaw informacji. Analiza fenotypowa wariantów ScAcr3 (imponujący zestaw 3500 transformantów!) pozwoliła na pogrupowanie ich ze względu na zdolność do komplementacji fenotypu wrażliwości [As(III) i Sb(III)] szczepu *acr3Δ* w trzech kategoriach jako: mutanty funkcjonalne, niefunkcjonalne oraz o zmienionej specyficzności. Tutaj mała dygresja, nie rozumiem zamysłu stojącego za przedstawieniem efektów mutacji w postaci tabeli (4.3) i jednocześnie drop testów (4.41). Informacje o danym aminokwasie się dublują np. I152S, L156A. Czy chodzi tylko o pokazanie zakresu stężeń (- vs. +/-) i wyeksponowanie metodologii (swoją drogą opis legendy do 4.41 i 4.42 mógłby spokojnie trafić do materiałów i metod)? Mam też prośbę o jaśniejsze rozwinięcie przekazu zdania: „W przypadku mutantów uzyskanych na drodze mutagenyzy losowej, wybrane pojedyncze substytucje wprowadzano do genu ScACR3 na nowo, na drodze mutagenyzy ukierunkowanej (rozdz. 3.18), aby oddzielić efekty mutacji niepożądanych od warunkujących potencjalne zmiany w specyficzności.” Najciekawszą grupę wariantów stanowią pozycje, których mutacje (V155A, V173A, Q180L i E353D) wpływają na zdolność ScAcr3 do nadawania oporności na/specyficzności względem As(III) lub Sb(III). Są one interesujące, gdyż nie tylko różnicują (ScAcr3-V155A, Q180L i E353D utrzymując tolerancję na Sb, ale utraciły zdolność do nadawania oporności na As z kolei wariant ScAcr3-V173A utracił zdolność do nadawania oporności na Sb, zachowując tolerancję na As), ale również dlatego, że Autorka bardzo precyzyjnie określa ich znaczenie w stabilności jak i relokacji ScAcr3 w komórce. Są to pozycje silnie zachowawcze a analogiczne zmiany w sekwencji MpACR3 wpływały na fenotyp transformantów (komplementacje) podobnie do mutacji w drożdżowym transporterze ScAcr3. Wyjątek stanowiła zmiana Q265L, która nie wpływała na specyficzność MpACR3, w przeciwieństwie do homologicznej Q180L w ScAcr3.

Dyskusja jest rozdziałem bardzo dobrze uzupełniającym całość dysertacji. Autorka rozwija znaczenie modelowania z wykorzystaniem algorytmów predykcyjnych uwzględniając zalety jak i ograniczenia takiego podejścia. Omawia porównawczo rolę poszczególnych zachowawczych aminokwasów w translokacji metaloidów będącej udziałem badanych białek. Nie unika pytań pojawiających się w kontekście pracy (MpACR3/oporność vs. transport Sb), wysuwa hipotezy (modyfikacje post-translacyjne MpACR3 i ich znaczenie w lokalizacji). Bardzo dobrze przedyskutowany jest wątek znaczenia N-końca z wykorzystaniem obu roślinnych modeli tj. MpACR3 oraz PpACR3 a także białek ACR z *Chloropicon primus* i *Chlamydomonas eustigma*. Ten kontekst dysertacji jest bardzo dobry i moim zdaniem ciągle otwarty. Myśląc o retencji/translokacji/regulacji białek roślinnych vs. ScAcr3 chciałbym zapytać o Pani opinię dotyczącą potencjalnego wykorzystania np. protoplastów czy przejściowej ekspresji w liściach tytoniu jako alternatywy do badań np. lokalizacji.

Praca stanowi zwartą logiczną całość. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy pozwalają sądzić, że jej Autorka jest sprawną badaczką posiadającą ugruntowaną wiedzę. Dlatego też Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Katarzyny Mizio spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie pani mgr Katarzyny Mizio do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Uniwersytet Wrocławski
Wydział Nauk Biologicznych (2)

Wpłynęło do WNB	0 -03- 2023	Załączniki
Wpl. do jedn. org.	Data	Symbol
Znak sprawy		