



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOCHEMII ANALITYCZNEJ
KIEROWNIK
PROF. DR HAB. ADAM DUBIN

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewy Kowalskiej

**Tytuł rozprawy: Własności molekularne i enzymatyczne syntezy monofosforanu tiaminy z drożdży
Saccharomyces cerevisiae oraz jej potencjalna rola biologiczna w warunkach stresu**

Ogólna charakterystyka pracy

Oceniany doktorat to obszerne 160 stronicowe opracowanie napisane po polsku i posiadające tradycyjny układ tekstu, zilustrowane 49 rysunkami, 13 tabelami i udokumentowane 219 pozycjami cytowanej literatury, z których większość opublikowano po roku 2000.

47 stronicowe wprowadzenie wyczerpująco omawia z jednej strony szlak oraz regulację biosyntezy tiaminy w organizmach prokariotycznych i roślinach oraz drożdżach z omówieniem zarówno biosyntezy komponenty tiazolowej jak i pirymidynowej, kondensację komponent i zaangażowane w ten proces enzymy a z drugiej wpływ stresu komórkowego na jej biosyntezę. W moim odczuciu tą część pracy czyta się bardzo dobrze ponieważ jest nie tylko szczegółowo przemyślana ale i przystępnie napisana poprawnym językiem. Opracowanie to zawiera niezbędne informacje konieczne do wprowadzenia w omawiany temat.

Rozprawa jest skonstruowana według tradycyjnego w eksperymentalnych pracach podziału. Część „Materiały i Metody” jest opracowana szczegółowo i wyczerpująco. W pracy autorka wykorzystuje szeroki zakres metod od przygotowania białka rekombinowanego - syntazy monofosforanu tiaminy (TH16) z *Sachcaromyces cerevisiae* przez jego oczyszczanie, oznaczanie podwójnej aktywności enzymatycznej (syntazy monofosforanu tiaminy i kinazy tiazolu) i parametrów kinetycznych (K_m i V_{max}), badanie własności fizyko-chemicznych (masy cząsteczkowej, punktu izoelektrycznego),

modelowanie molekularnego struktury III-rzędowej obu domen białka TH16 oraz identyfikację reszt istotnych dla katalizy i wreszcie przeprowadzenie ukierunkowanej mutagenyzy punktowej dla weryfikacji przewidzianych teoretycznie reszt wchodzących w skład centrum aktywnego. Druga część opisu metod dotyczy opracowania warunków stresu i jego enzymatyczne monitorowanie poprzez pomiar aktywności dysmutazy nadtlencowej oraz enzymów zaangażowanych w biosyntezę i aktywację tiaminy i jej estrów fosforanowych (syntazy monofosforanu, pirofosfokinazy i transketolazy).

Należy zaznaczyć, że niezbędny do produkcji enzymu rekombinowanego gotowy plazmid został przygotowany i udostępniony przez prof. dr hab. Mariusza Olczaka dzięki współpracy doktorantki z Wydziałem Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Uzyskane wyniki opisane na 42 stronach są bardzo dobrze udokumentowane przejrzystymi rysunkami i tabelami. Cała robiąca dobre wrażenie rozprawa doktorska jest zakończona obszerną podzieloną na dwie główne części wnikliwą dyskusją.

Cel pracy, stan wiedzy oraz uzyskane wyniki

Obiektem badawczym był kluczowy enzym szlaku biosyntezy tiaminy – synteza monofosforany tiaminy (TMP) z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* odpowiedzialny za kondensację dwu aromatycznych związków: difosforanu 4-amino-5-hydroksymetyl-2-metylpirydyny i fosforanu 5-(2-hydroksyetyl)-4-metyltiazolu do estru fosforanowego tiaminy (TMP). Zasadniczym celem pracy były badania własności strukturalnych i enzymatycznych rekombinowanego enzymu TH16, badania wpływu czynników stresu na jego aktywność oraz na aktywność innych enzymów szlaku biosyntezy tiaminy.

Cel badań jest dobrze dobrany w związku z faktem, że u drożdży struktura krystaliczna wytypowanego enzymu nie została jeszcze określona a mechanizm biosyntezy tiaminy w odpowiedzi na stres komórkowy nie został też jeszcze całkowicie poznany.

Tiamina – rozpuszczalna w wodzie witamina B1 jest *de novo* syntetyzowana przez bakterie, grzyby i rośliny natomiast zwierzęta są zależne od związku dostarczonego z pożywieniem. Witamina zbudowana jest z komponenty tiazolowej oraz pirymidynowej połączonych mostkiem metylenowym. Jedynie pochodna difosforanowa (TDP) jest aktywna biologicznie jako kofaktor licznych kompleksów enzymatycznych głównych komórkowych szlaków metabolicznych. Jej prekursorem jest monofosforanowa pochodna (TMP), która jest najpierw defosforylowana do wolnej tiaminy a

następnie transformowana do TDP przez pirofosfokinazę. Szlak biosyntezy tiaminy zdecydowanie najlepiej poznano u bakterii. Poznano kluczowy enzym biosyntezy tiaminy *B. subtilis* i uzyskano szczegółowe informacje o jego strukturze i resztach zaangażowanych we wiązanie substratu. U drożdży poznano strukturę krystaliczną pirofosfokinazy tiaminy, przekształcającej tiaminę w TDP natomiast do tej pory nie udało się uzyskać struktury krystalograficznej białka TH16 o podwójnej aktywności syntazy monofosforanu tiaminy i kinazy tiazolu. W przypadku drożdży estry fosforanowe tiaminy nie są w stanie pokonać bariery błony komórkowej bez defosforylacji a procesy regulujące poziom biosyntezy tiaminy wciąż są słabo poznane.

Należy w tym miejscu jednak wspomnieć, że wykonanie tak szeroko zaplanowanych w rozprawie badań było możliwe dzięki wcześniejszym pracom zespołu dr hab. Marii Rąpały-Kozik dotyczących biosyntezy tiaminy w materiale roślinnym (*Zea mays*) i opisanych w pracy opublikowanej w 2007 roku w *Biochemical Journal* (408:149-159).

Wyniki rozprawy oraz dyskusja są rozmyślnie podzielone na dwie części obejmujące odpowiednio: własności strukturalne i enzymatyczne syntazy monofosforanu tiaminy/kinazy tiazolu oraz rolę tiaminy w odpowiedzi na stres komórkowy w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*.

Stosując bakteryjny system ekspresyjny z wykorzystaniem plazmidu pTYB11 wyprodukowano rekombinowane białko fuzyjne TH16 z domeną wiążącą chitynę połączona na zasadzie inteiny. System ten był wcześniej zastosowany z powodzeniem przez dr hab. Rąpałę-Kozik i współpracowników do produkcji roślinnego białka szlaku biosyntezy tiaminy. Zgodnie z przewidywaniami uzyskanymi z porównania sekwencji uzyskane białko rekombinowane TH16 wykazywało podwójną aktywność katalityczną – syntazy TMP zlokalizowaną w domenie N-końcowej oraz kinazy HET zlokalizowaną w domenie C-końcowej. Oznaczono parametry kinetyczne (V_{max} i K_m) dla obu reakcji enzymatycznych oraz parametry fizykochemiczne (M_{cz} i PI) sugerując budowę heksameryczną a nie jak dotychczas przyjmowano oktameryczną białka. Reakcja enzymatyczna w zależności od stężenia prekursora tiaminy HET-P (5-(2-hydroksyetylo)-4-metylotiazol wykazywała klasyczny model kinetyki opisany równaniem Michaelisa-Menten, natomiast w przypadku zależności od stężenia HMP-PP (di fosforan 4-amino-5-hydroksymetylo-2-metylopirydyny) wykazała ciekawe zjawisko inhibicji substratowej. Za pomocą narzędzi bioinformatycznych stworzono na zasadzie modelowania homologicznego na bazie bakteryjnych białek ThiE i ThiK z *Bacillus subtilis* modele struktur III-rzędowych oraz centrów aktywnych syntazowej i kinazowej domeny białka TH16. Dokonano weryfikacji przewidywań bioinformatycznych poprzez ukierunkowaną mutagenezę (8 wytypowanych reszt aminokwasowych w przypadku syntazy i trzech w przypadku kinazy). W

przypadku domeny syntazowej udało się w znacznej mierze zweryfikować przewidywania oraz testy aktywności uzyskanych mutein. W przypadku kinazy HET nie udało się uzyskać potwierdzenia kluczowych reszt centrum aktywnego co jak sugeruje autorka jest najprawdopodobniej wynikiem zaobserwowanego niedopasowania modelu przygotowanego w oparciu o białko bakteryjne.

Uzyskane w tej części rozprawy wyniki są dobrze i przekonująco zilustrowane, opracowane i przedyskutowane i w dużym stopniu uzupełniły i zweryfikowały informacje na temat drożdżowej syntazy TMP. Sugeruję próbę ich oddzielnego opublikowania.

Ogólne odczucie

Praca jest napisana przejrzysto, bardzo dobrym językiem i właściwie, nie mam zasadniczych uwag krytycznych co do strony merytorycznej jak i redakcyjnej. Bardzo niewiele jest w rozprawie niezgrabności językowych czy też niepoprawnych sformułowań a tych nieliczne są tak mało istotne, że nie warto ich wypunktowywać. Widać, że praca została nie tylko wzorowo zaplanowana, ale przede wszystkim dobrze przemyślana i wielokrotnie sprawdzona redakcyjnie co zasługuje na szczególne wyróżnienie. Korzystając z okazji chciałbym jednak wykorzystać przysługujące recenzentowi prawo i poprosić o przedyskutowanie w trakcie obrony zagadnienia: Dlaczego biosynteza aktywnej formy witaminy B1 przebiega najpierw przez etap syntezy pochodnej fosforanowej tiaminy by następnie ją kolejno defosforylować i transferować do pochodnej difosforanowej? Czy są jakieś przesłanki dla tego typu rozrzutności ?

Podsumowanie oceny

Rozprawę doktorską Pani mgr Ewy Kowalskiej oceniam wysoko tak pod względem merytorycznym jak i redakcyjnym. Podziwiam wielość stosowanych technik, dokładność opisów wykonanych eksperymentów, skrupulatność oraz konsekwentność w realizacji postawionych zadań i wreszcie formę oraz rzetelność przedstawienia wyników i rzeczową krytyczną dyskusję. Nie omawiam w recenzji wyników drugiej części rozprawy dotyczących wpływu oksydacyjnego i osmotycznego na poziom ekspresji i aktywności enzymów zaangażowanych w biosyntezę difosforanu tiaminy ponieważ wiem, że w trakcie przygotowywania i procedowania rozprawy ukazały się już one drukiem w recenzowanym czasopiśmie *FEMS Yeast Res* (12(2012)534-546). Niedawno ukazało się doniesienie o protekcyjnej roli witaminy B1 w odpowiedzi na stres abiotyczny u roślin. Wyniki uzyskane w ramach rozprawy potwierdziły hipotezę, że też w drożdżach, które mogą syntetyzować podobnie do roślin i bakterii tiaminę *de novo*, istnieje regulacja metabolizmu tiaminy w niepomyślnych warunkach środowiskowych.

Stwierdzam, że przedłożona praca spełnia wszystkie warunki przewidziane ustawą i tradycją dla prac doktorskich i wnioskuję do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii o dopuszczenie Pani mgr Ewy Kowalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W moim odczuciu przedstawiona rozprawa doktorska jako zdecydowanie ponad przeciętna i jako taka zasługuje na wyróżnienie. Dlatego z pełnym przekonaniem zwracam się z takim wnioskiem.