



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz  
Katedra Biofizyki Molekularnej  
Uniwersytetu Łódzkiego

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Kowalskiej pt.  
„Właściwości molekularne i enzymatyczne syntazy monofosforanu tiaminy z  
drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz jej potencjalna rola biologiczna w  
warunkach stresu”**

Jakkolwiek mogłoby się wydawać, że funkcje biologiczne i metabolizm związków pełniących istotną rolę w metabolizmie stanowią już standardową wiedzę podręcznikową, taki pogląd nie do końca jest prawdziwy. Jednym ze związków, wiedza o których ciągle wymaga znaczących uzupełnień, jest tiamina i jej pochodne. Rola biologiczna tego związku, który dla człowieka jest witaminą (B<sub>1</sub>), a szczególnie jego metabolitów, nie jest do końca jasna. Szlak biosyntezy tiaminy w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* również nie jest do końca poznany. W tym interesującym nurcie badań osadzona jest rozprawa doktorska mgr Ewy Kowalskiej.

Świetnie napisana rozprawa doktorska ma klasyczny układ. We *Wstępie* Doktorantka przedstawia rys historyczny badań, budowę, występowanie i funkcje biologiczne witaminy B<sub>1</sub>, szlak jej biosyntezy oraz transport i magazynowanie tiaminy i jej estrów fosforanowych w organizmach prokariotycznych roślinach i drożdżach, regulację biosyntezy tiaminy oraz zagadnienia stresu komórkowego u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (odpowiedź na warunki stresu środowiskowego, wspólna odpowiedź stresowa, specyficzna odpowiedź stresowa) oraz wpływ stresu na biosyntezę tiaminy u organizmów prokariotycznych, w roślinach i drożdżach. *Wstęp* jest bardzo dobrym wprowadzeniem w zagadnienia będące przedmiotem części doświadczalnej rozprawy.

Za cele pracy doktorskiej mgr Ewa Kowalska postawiła sobie zbadanie właściwości kluczowego enzymu w szlaku biosyntezy tiaminy w drożdżach *S. cerevisiae* - syntazy monofosforanu tiaminy (białka THI6) oraz roli metabolizmu tiaminy w odpowiedzi komórek drożdży na różne czynniki stresowe. Szeroko zakrojone badania obejmowały otrzymanie rekombinowanego białka enzymatycznego, wyznaczenie jego podstawowych parametrów molekularnych, charakterystykę kinetyczną jego działania, opracowanie modeli strukturalnych obu domen białka za pomocą narzędzi bioinformatycznych i weryfikację uzyskanych

modeli centrów aktywnych poprzez zastosowanie ukierunkowanej mutagenezy. Druga część badań obejmowała określenie biosyntezy i bioaktywacji tiaminy w komórkach drożdży w warunkach stresu oksydacyjnego, osmotycznego i solnego oraz szoku cieplnego, a także porównanie metabolizmu tiaminy w szczepach z upośledzoną biosyntezą tiaminy i z brakiem genów regulatorowych odpowiedzialnych za komórkowe reakcje obronne.

*Materiał i Metody* opisane są w sposób bardzo staranny i należycie szczegółowo, a bogaty warsztat metodyczny obejmujący metody biochemiczne, biofizyczne, bioinformatyczne i techniki biologii molekularnej zasługuje na wysokie uznanie. Doktorantka otrzymywała białko enzymatyczne poprzez ekspresję w szczepie *E. coli* ER2566 z użyciem systemu ekspresyjnego IMPACT<sup>TM</sup>-CN. Oznaczenie aktywności enzymatycznych białka oparte było na rozdiale chromatograficznym (HPLC) i detekcji absorpcyjometrycznej produktów reakcji oraz fluorymetrycznej detekcji tiaminy po jej utlenieniu do tiochromu. Strukturę trzeciorzędową obu domen białka Doktorantka modelowała korzystając z danych dostępnych w bazie PDB i serwera SWISS-MODEL, wizualizując strukturę w programie DeepView. Dla identyfikacji reszt istotnych dla katalizy stosowała programy T-coffee i PyMOL. W analizie bioinformatycznej wykorzystywała też programy Conserved Domain Database and Search Service, ExpASy i serwer TargetP. Ukierunkowaną mutagenezę prowadziła z wykorzystaniem QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit.

W drożdżach poddanych działaniu czynników stresogennych Doktorantka oznaczała m. in. aktywności syntazy monofosforanu tiaminy, pirofosfokinazy tiaminy i transketolazy jako enzymu zależnego od difosforanu tiaminy.

Uzyskanie ekspresji białka THI6 nie było proste ze względu na jego skłonność do tworzenia ciał inkluzyjnych; z tego względu hodowla prowadzona była w temperaturze 16°C. Dla ułatwienia oczyszczania białka dołączono do jego N-końca etykietę inteinową zawierającą domenę wiążącą chitynę.

Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza sekwencji białka wykazała obecność domeny o przewidywanej aktywności syntazy monofosforanu tiaminy (TMP) w N-końcowej części cząsteczki i domeny o przewidywanej aktywności kinazy 5-(2-hydroksyetylo)-4-metylotiazolu (HET) w C-końcowej części cząsteczki. Aktywności te zostały stwierdzone doświadczalnie w preparatach rekombinowanego białka. Elektroforeza w warunkach denaturujących wskazała na masę cząsteczkową białka równą około 60 kDa, zbliżoną do teoretycznie wyliczonej masy cząsteczkowej 58,058 kDa. Masa cząsteczkowa natywnego białka wyznaczona techniką sączenia molekularnego wyniosła ok. 375 kDa, co sugeruje, że białko jest heksamerem.

Doświadczalnie wyznaczony punkt izoelektryczny białka (6,3) zbliżony był do teoretycznie wyznaczonej wartości 5,67.

Doktorantka wykazała, że ATP jest preferowanym donorem grup fosforanowych. Przeprowadziła analizę kinetyczną obu dwusubstratowych reakcji wyznaczając wartości szybkości maksymalnych i stałych Michaelisa. Wykazała inhibicję substratowej reakcji syntazy TMP przez difosforan 4-amino-5-hydroksymetylo-2-metylopirymidyny i wyznaczyła stałą inhibicji. Stwierdziła hamowanie reakcji syntezy TMP przez UTP, ATP, ADP i difosforan. Interesujące było wykazanie akompetecyjnego charakteru hamowania aktywności enzymatycznej przez ATP i difosforan (mniej oczywisty dla wyższych stężeń inhibitorów, sądząc na podstawie Rys. 24 i 25). Nie zaobserwowała inhibicji przez substrat dla reakcji kinazy HET.

Analiza kinetyczna prowadzona była w oparciu o linearyzację Lineweavera-Burka i Hanesa-Woolfa równania Michaelisa-Menten. Być może warto byłoby spróbować także linearyzacji Eadie-Hofstee, mniej podatną na błąd doświadczalny pomiaru aktywności przy niskim stężeniu substratu niż linearyzacja Michaelisa-Menten.

Podobieństwo sekwencji białka drożdżowego do białek bakteryjnych o znanej strukturze pozwoliło Doktorantce na stworzenie trójwymiarowych modeli obu domen katalitycznych za pomocą modelowania homologicznego. Dla sprawdzenia jakości uzyskanych modeli obu domen katalitycznych Autorka rozprawy wykonała 8 mutacji punktowych w domenie syntazowej białka i 6 mutacji punktowych w domenie kinazowej. Poprzez pomiary dichroizmu kołowego stwierdziła, że wprowadzone mutacje nie spowodowały istotnych zmian konformacyjnych białka. Dwa spośród mutantów w domenie syntazowej (K47E i S210A) wykazały podwyższoną aktywność w stosunku do formy wyjściowej białka i zniesienie zjawiska inhibicji przez substrat. Jedna z mutacji w domenie kinazowej (C465D) powodowała ponad 2-krotny wzrost aktywności kinazowej muteiny.

Badania dotyczące wpływu stresu na aktywność białek zaangażowanych w metabolizm tiaminy dostarczyły interesujących informacji na temat biologicznej roli tego związku. Doktorantka stwierdziła silną represję biosyntezy tego związku w warunkach jego obecności w pożywce. Wykazała, że aktywność syntazy TMP niewiele zmieniała się od wczesnoeksponencjalnej do stacjonarnej fazy wzrostu, podczas gdy aktywności pirofosfokinazy tiaminy i transketolazy były najwyższe w fazie wczesnoeksponencjalnej ulegając następnie obniżeniu.

Wszystkie stosowane czynniki stresujące indukowały w komórkach drożdży stres oksydacyjny, co Doktorantka stwierdziła na podstawie wzrostu aktywności dysmutazy ponadtlenkowej. Można byłoby potwierdzić zachodzenie stresu

oksydacyjnego poprzez pomiar innych parametrów np. stężenia glutationu czy poziomu produkcji reaktywnych pochodnych tlenu lub zróżnicowany pomiar aktywności manganowej i cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej, jednak zmiany całkowitej aktywności dysmutazowej są wystarczająco dobrym dowodem zachodzenia stresu oksydacyjnego. Interesujące wyniki uzyskane przez Doktorantkę dowodzące indukcji zwłaszcza pirofosfokinazy tiaminy i transketolazy w większości sytuacji stresowych wskazują na istotną rolę tiaminy i jej metabolitów w odpowiedzi drożdży na stresse różnego typu. Ciekawe są też obserwacje Autorki rozprawy dotyczące wzrostu aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w szczepach defektywnych w zakresie biosyntezy tiaminy oraz podwyższenia aktywności enzymów szlaku biosyntezy tiaminy i TDP w mutantach regulatorowych *yap1Δ* i *hog1Δ*, w których obniżona była aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, co może sugerować, że wzmożenie metabolizmu tiaminy kompensuje niedobory innych mechanizmów obronnych w komórkach drożdży. Może to być związane ze wspomnianym w *Dyskusji* pracy antyoksydacyjnym działaniem tiaminy, a zwłaszcza produktu jej utlenienia, tiochromu. Szkoda być może, że Doktorantka nie badała metabolizmu tiaminy także w mutantach drożdży pozbawionych dysmutaz ponadtlenkowych. Warto byłoby chyba też analizować poziom tiaminy i jej metabolitów równolegle z poziomem aktywności enzymów metabolizmu tiaminy.

Obszerna (21 stron), bardzo dobrze napisana *Dyskusja* krytycznie analizuje uzyskane wyniki na tle piśmiennictwa przedmiotu. Można zastanawiać się, czy potrzebne jest w wielu miejscach powtarzanie opisu wyników, niemniej jednak bardzo ułatwia to porównanie wyników własnych z danymi piśmiennictwa i sprawia, że także tę część pracy czyta się bardzo dobrze.

Moja ogólna ocena pracy jest bardzo pozytywna. Z obowiązku recenzenta mam kilka marginalnych uwag do treści rozprawy.

Można zastanawiać się, czy konieczne jest podawanie w pracy jednoliterowych skrótów aminokwasów, skoro są ogólnie dostępne i zazwyczaj przytaczane w podręcznikach biochemii (choć trzeba przyznać, że może to ułatwić lekturę pracy czytelnikowi, który niekoniecznie wszystkie te symbole pamięta). Zwrot na początku s.16 nie jest w pełni precyzyjny: Autorka rozprawy pisze o aktywności syntazy monofosforanu tiaminy „zarówno w pożywce pozbawionej tiaminy, jak i w pożywce bogatej w tiaminę”. To skrót myślowy, który może wprowadzać w błąd: chodzi o aktywność enzymu w komórkach drożdży hodowanych w odpowiednich pożywkach. Na s. 32 Doktorantka pisze: „... transporter ten nazwano operonem BPQ”. Wydaje mi się, że to niewłaściwe sformułowanie: operon to zespół genów kodujących transporter, ale nie produkt ich ekspresji. Na s. 65 Autorka określa roztwór kwasu

fosforowego jako „bufor anodowy”, a roztwór NaOH jako „bufor katodowy”. W żargonie laboratoryjnym używa się takich określeń, trudno jednak nie zauważyć, że ani jeden, ani drugi roztwór nie są buforami.

Doktorantka nie podaje nigdzie wydajności produkcji rekombinowanego białka. Oznaczenia (symbole/kolory) nie są w pełni konsekwentne na Rys. 24 i 25 (wykresy C w stosunku do wykresów A i B).

Te marginalne uwagi nie rzutują na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Ewy Kowalskiej, którą uważam za istotne osiągnięcie naukowe Doktorantki i Jego Promotora. Chcę także zwrócić uwagę na bardzo staranną edycję rozprawy. Wyniki uzyskane w pracy zostały opublikowane, jak dotychczas, w postaci dwóch artykułów.

Uważam, że rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Ewy Kowalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sądzę ponadto, że ze względu na nakład pracy, stosowanie bogatego warsztatu badawczego oraz uzyskane oryginalne i nowatorskie wyniki rozprawa ta zasługuje na wyróżnienie.



Łódź, dnia 23 czerwca 2012

Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz