

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR NATALII WOLAK

„Udział witaminy B₁ w odpowiedzi na warunki stresu abiotycznego modelowych organizmów drożdżowych z rodzajów *Saccharomyces* oraz *Candida*”

Praca wykonana w Zakładzie Biochemii Analitycznej pod kierunkiem dr hab. Marii Rapały-Kozik.

Tiamina (witamina B₁) jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania wszystkich organizmów żywych, lecz tylko rośliny i drobnoustroje są zdolne do jej biosyntezy, podczas gdy pozostałe organizmy muszą otrzymywać ją wraz z pokarmem. Zapewnienie odpowiedniego poziomu tiaminy jest szczególnie ważne, gdyż jej długotrwałe niedobory mogą prowadzić do groźnych schorzeń, dotyczących głównie układu nerwowego oraz układu krążenia, a przy braku leczenia nawet do śmierci. Najlepiej poznaną funkcją tiaminy jest rola jej pochodnej, difosforanu tiaminy (TDP) w podstawowym metabolizmie komórkowym, w którym pełni ona rolę kofaktora dla wielu kluczowych enzymów, uczestniczących między innymi w cyklu Krebsa oraz szlaku pentozofosforanowym. Obecnie pojawiły się dowody, że tiamina bierze również udział w odpowiedzi na warunki stresu abiotycznego w roślinach oraz pełni funkcje cząsteczki sygnałowej, tzw. „alarmonu” w odniesieniu do ludzkich komórek układu nerwowego. Co więcej, pojawiły się także doniesienia, że tiamina może wykazywać bezpośrednie właściwości antyoksydacyjne i tym samym wpływać na stan wewnątrzkomórkowej równowagi redoks.

Głównym celem niniejszej pracy było zatem wykazanie ochronnego działania tiaminy w warunkach stresu abiotycznego na przykładzie jednokomórkowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Podjęto także próbę scharakteryzowania systemu transportu tiaminy w tych warunkach z zastosowaniem odpowiednich szczepów delecyjnych, jak również wytypowano czynniki mogące wpływać na regulację obserwowanej odpowiedzi tiaminy. Ponieważ zastosowany model drożdżowy reprezentuje grupę mikroorganizmów o stosunkowo niskiej odporności na warunki stresu, przeprowadzono też analizy działania tiaminy z użyciem znacznie bardziej odpornych na stres drożdżaków z rodzaju *Candida*.

Wstępna charakterystyka wykazała różnice w tempie wzrostu hodowli prowadzonych w warunkach różnej dostępności tiaminy, pogłębiające się wyraźnie w wyniku działania stresu oksydacyjnego. Analiza enzymów zależnych od TDP jako kofaktora wykazała, że w stresie, w warunkach niedoboru tiaminy, ekspresja genów kodujących poszczególne enzymy jest zwiększona w porównaniu do warunków pełnej dostępności tiaminy w medium hodowlanym. Uzyskane wyniki potwierdziły zatem udział enzymów zależnych od TDP, a tym samym rolę TDP, w odpowiedzi na stan stresu komórkowego. Aby stwierdzić, czy tiamina może pełnić rolę ochronną także niezależnie od swojej funkcji kofaktorowej, przeprowadzono analizę jej wpływu na potencjał antyoksydacyjny komórek drożdży. W tej części badań wykazano, iż niedobór tiaminy koreluje ze zwiększonym zapotrzebowaniem na wybrane enzymy antyoksydacyjne, zwłaszcza w cytozolu i mitochondriach, a tym samym wpływa na stan równowagi redoks w komórce. Co więcej, w tych warunkach

odnotowano także wyraźnie zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) oraz podwyższony poziom oksydacji białek. Obecność tiaminy natomiast nie tylko obniżała poziom ROS, ale także obniżała poziom aktywacji komórkowej puli enzymów antyoksydacyjnych. W celu wykazania czy obserwowana protekcyjna funkcja tiaminy jest niezależna od funkcji kofaktorowej, oznaczono poziom stresu komórkowego w warunkach, w których ilość TDP jest wystarczająca do zabezpieczenia funkcji enzymów TDP-zależnych, lecz ilość tiaminy w formie niezwiązanej jest wciąż znikoma. Zarówno badanie wzrostu komórek jak i poziomu produkcji wolnych rodników potwierdziły brak wpływu TDP na obserwowane zmiany.

Kolejna część badań obejmowała charakterystykę systemu transportu tiaminy w warunkach stresu. Mimo, że nie zaobserwowano jego zwiększonej podatności na działanie badanych czynników stresowych, to jednak analiza mutantów transportu w kontekście produkcji wolnych rodników oraz poziomu markerów stresu dostarczyła kolejnych dowodów na to, że to tiamina a nie TDP ma dominujące działanie w wypełnianiu jej funkcji ochronnych. Z kolei zastosowanie odpowiednich mutantów regulatorowych potwierdziło zaangażowanie w obserwowaną odpowiedź obu głównych ścieżek sygnałowych komórek *S. cerevisiae*, zależnych odpowiednio od białek Hog1 i Yap1. Dodatkowo, przeszukanie sekwencji promotorowych genów związanych z metabolizmem tiaminy oraz odpowiednie analizy poziomu markerów stresu, pozwoliły wytypować czynniki transkrypcyjne: Stb5, Skn7 oraz Sko1, jako potencjalne regulatory tej odpowiedzi.

Dla porównania, przeprowadzono także analizę wpływu tiaminy na odpowiedź stresową u drożdżaków z rodzaju *Candida*, które egzystując w roli komensali w kontakcie z komórkami gospodarza miały szanse wypracować ulepszony komórkowy potencjał antyoksydacyjny. Wszystkie gatunki wykazywały znaczne ograniczenie wzrostu w warunkach braku dostępności tiaminy, co sugeruje ich mniejszą zdolność do biosyntezy tiaminy niż *S. cerevisiae*. Dodatkowo, porównanie wpływu obecności tiaminy na drożdżaki z rodzaju *Candida* nie potwierdziło obserwowanego u *Saccharomyces* obniżenia ekspresji wybranych markerów stresu, chociaż w warunkach tych również dochodziło do zmniejszenia poziomu wolnych rodników. W przeciwieństwie do *S. cerevisiae* zaobserwowano ponadto zwiększoną ekspresję genu transketolazy u wszystkich gatunków *Candida* oraz zwiększoną akumulację tiaminy w warunkach stresu oksydacyjnego u *C. glabrata* oraz *C. tropicalis*.

Niewątpliwie najważniejszym osiągnięciem niniejszej pracy jest potwierdzenie protekcyjnych właściwości tiaminy również w odniesieniu do drożdży i wykazanie ich przynajmniej częściowej niezależności od funkcji kofaktorowej. Ponadto, dzięki charakterystyce systemu transportu oraz roli potencjalnych czynników regulatorowych w obserwowanej odpowiedzi udało się stworzyć pełny obraz funkcjonowania tiaminy w stresie dla modelowych drożdży *S. cerevisiae*. Analiza z udziałem drożdżaków z rodzaju *Candida* pozwoliła dodatkowo wykazać zróżnicowany charakter tej odpowiedzi.