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

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Wolak pt.
„Udział witaminy B_1 w odpowiedzi na warunki stresu abiotycznego modelowych organizmów drożdżowych z rodzaju *Saccharomyces* oraz *Candida*"

Tiamina (witamina B_1), jest związkiem ciągle interesującym, nie tylko dlatego, że jej pochodna (difosforan tiaminy, TDP) jest kofaktorem wielu kluczowych enzymów i że niedobory tiaminy prowadzą do groźnych schorzeń, ale także ze względu na koncepcje, że gra ona rolę w odpowiedzi roślin na stres abiotyczny, pełni rolę alarmonu w komórkach układu nerwowego i wpływa na równowagę oksydacyjno-redukcyjną komórek. Rozprawa doktorska mgr Natalii Wolak poświęcona jest roli tiaminy i TDP w odpowiedzi na stres abiotyczny w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i drożdżaków z rodzaju *Candida*.

Świetnie napisana rozprawa doktorska ma typowy układ. We *Wstępie* Doktorantka przedstawia funkcje tiaminy i jej wybranych pochodnych, metabolizm tiaminy w komórkach *S. cerevisiae* i *Candida*, podstawowe typy stresu abiotycznego (stres oksydacyjny, stres termiczny i stres osmotyczny), wspólną odpowiedź na stres środowiskowy w komórkach drożdży, podstawowe szlaki regulacji odpowiedzi stresowej u drożdży *S. cerevisiae*, odpowiedź na stres drożdżaków *Candida* i udział tiaminy w odpowiedzi na stres (w tym postulowaną rolę antyoksydacyjną tiaminy).*Wstęp* jest bardzo dobrym wprowadzeniem w zagadnienia będące przedmiotem części doświadczalnej rozprawy.

Głównym celem pracy doktorskiej mgr Natalii Wolak było „wykazanie możliwości ochronnego działania tiaminy w wybranych warunkach stresu abiotycznego oraz ocena jego zależności od funkcji kofaktorowej TDP". Z formalnego punktu widzenia ten cel i cele szczegółowe są określone zbyt postulatywne (mogłoby się przecież okazać, że ochronnego działania nie ma), jednak istniały pełne merytorycznie przesłanki dla oczekiwania takich efektów w oparciu o poprzednie wyniki uzyskane w badaniach zespołu. Interesującymi celami szczegółowymi były: charakterystyka działania systemu transportu tiaminy w warunkach stresu i wytypowanie potencjalnych czynników regulatorowych. Dodatkowym celem pracy było zbadanie roli tiaminy w reakcji na stres drożdżaków *Candida*; te badania

mogą mieć znaczenie nie tylko poznawcze ze względu na patogenność gatunków z rodzaju *Candida* i problemy ze zwalczaniem tych patogenów.

Materiał i Metody opisane są starannie, należycie szczegółowo i przystępnie. Uznanie budzi zarówno nowoczesność bogatego warsztatu metodycznego obejmującego metody biologii molekularnej i bioinformatyki, ale także połączenie ich z klasycznymi biochemicznymi metodami oznaczania zawartości metabolitów i aktywności enzymów, wymagającymi dużego nakładu pracy i precyzji analitycznej. Zasadniczym podejściem dla oceny wpływu czynników stresu i ochronnej roli tiaminy były oczywiście krzywe wzrostu drożdży poddanych działaniu czynników stresogennych w obecności i nieobecności egzogennej tiaminy. Analiza ta została jednak rozbudowana o zastosowanie mutantów z delecją odpowiednich białek, oznaczenia poziomu tiaminy i TDP w komórkach, oznaczenia poziomu ekspresji białek, aktywności enzymów i poziomu reaktywnych form tlenu za pomocą sond fluorogennych. Drobna uwaga dotycząca wyboru metody ekstrakcji dla oznaczania tiaminy i jej metabolitów (s. 54-55): czy nie warto byłoby uzupełnić tego porównania o określenie odzysku egzogennych wzorców?

Podając wartości gęstości optycznej Doktorantka należy podać informację, w jakim aparacie była ona mierzona, bowiem jak wiadomo, w przypadku rozpraszania światła wartość gęstości optycznej (turbidancji) zależy od geometrii układu, która może różnić się między aparatami. Z satysfakcją stwierdzam, że Doktorantka taką informację podaje (s. 47). Nasuwa mi się jednak inna refleksja metodyczna. Czy mierzona była gęstość optyczna nierozcieńczonych zawiesin komórek? Podejrzewam, że tak (sam zawsze tak robiłem i chyba znakomita większość badaczy stosuje to najprostsze i najwygodniejsze podejście, tak zresztą mierzony jest automatycznie wzrost komórek w aparacie typu Bioscreen). Wiadomo jednak, że krzywa zależności turbidancji od stężenia komórek ulega wypłaszczeniu w miarę zwiększania stężenia komórek, stąd pomiar w zakresie wyższych stężeń jest mniej czuły na różnice stężeń komórek. Czy nie warto byłoby porównać wyniki pomiarów turbidancji zawiesin rozcieńczonych? To uwaga ogólnej natury, nie pod adresem Doktorantki ale bardziej własnym nawet.

Ogrom włożonej pracy zaowocował bogactwem wyników i dobrą strategią było przedstawienie w rozprawie nie tylko suchego opisu wyników, lecz wyników „i ich wstępnej interpretacji", bez której odbiór tego opisu byłby znacznie trudniejszy. Przedstawione w rozprawie wyniki wnoszą nowe informacje dotyczące roli tiaminy w odpowiedzi komórek *S.*

cerevisiae i komórek *Candida* na stres. Niektóre z nich są dość nieoczekiwane. Brak tiaminy w medium powodował stosunkowo małe ograniczenie tempa wzrostu *S. cerevisiae*, różnica ta zwiększała się zwłaszcza w warunkach stresu oksydacyjnego. Brak tiaminy w pożywce nie powodował znacznego wzrostu ekspresji genów kodujących enzymy biosyntezy tiaminy w warunkach stresowych w nieobecności tiaminy w medium (a nawet spadek ekspresji niektórych genów). Bardzo pouczające jest porównanie ekspresji genów i aktywności głównych TDP-zależnych enzymów w komórkach *S. cerevisiae* poddanych działaniu stresu oksydacyjnego, kiedy obniżeniu poziomu ekspresji genu transketolazy towarzyszyło znaczne podwyższenie aktywności tego enzymu (Rys. 15; ten wynik mógłby trafić do podręcznika jako przestroga przed pochopnym wnioskowaniem o skutkach fizjologicznych zmian poziomu ekspresji genów).

O protekcyjnej roli tiaminy w komórkach *S. cerevisiae* poddanych działaniu stresu oksydacyjnego jednoznacznie świadczy niższy poziom reaktywnych form tlenu w obecności tiaminy. Zagadką są jednak przyczyny tego stanu rzeczy. Poziomy transkrypcji genów *SOD2*,i *CTT1* i *CTA1* były obniżone w tych samych warunkach (w stosunku do warunków nieobecności tiaminy w medium), poziomy ekspresji genów SOD1 i TRX2 (genów kodujących białka antyoksydacyjne) nie były podwyższone w warunkach niższej generacji reaktywnych form tlenu. Można tłumaczyć ten fakt regulacją aktywności tych białek na innych poziomach niż poziom transkrypcyjny lub postulować decydującą rolę innych niż rozpatrywane białek antyoksydacyjnych (np. peroksyredoksyn). Autorka rozprawy efekt skłonna jest przypisywać obserwowany efekt bezpośredniemu antyoksydacyjnemu działaniu tiaminy (Dyskusja, s. 112), której wewnątrzkomórkowe stężenie było o dwa rzędy wielkości wyższe w obecności niż w nieobecności tiaminy w medium (Ryc. 26) i można je szacować na 0,5-1 mM. To stężenie znacznie niższe w porównaniu ze stężeniem głównego niskocząsteczkowego wewnątrzkomórkowego antyoksydanta, glutationu, ale wcale niemałe i trudno nie zgodzić się z tą sugestią. Zagadnienie to z pewnością warte jest dalszych dociekań. Interesujący jest też nasuwający się z porównań stężeń obu związków wniosek, że to tiamina, a nie TDP jest w głównej mierze odpowiedzialna za efekt ochronny w sytuacjach stresowych.

Doktorantka podjęła w pracy m. in. próbę identyfikacji czynników regulujących protekcyjne działanie tiaminy stosując szczepy z delecją głównych podejrzanych białek (Hog1 i Yap1), przeszukanie sekwencji regulatorowych wybranych genów w bazie YEASTRACT oraz badanie kinetyki wzrostu mutantów delecyjnych, pozbawionych odpowiednich czynników transkrypcyjnych i poziomu markerów stresu w tych komórkach.

To interesujące podejście pozwoliło na wytypowanie trzech potencjalnych czynników regulacyjnych: Stb5, Skn7 i Sko1.

O ile badania roli tiaminy i jej metabolitów w oporności na stres drożdży *S. cerevisiae* były twórczą kontynuacją badań prowadzonych już uprzednio w zespole Promotora, a tyle badanie protekcyjnego działania tiaminy w odpowiedzi wybranych gatunków *Candida* na działanie stresu oksydacyjnego było wkroczeniem na nowe, równie interesujące pole badań. Uzyskane wyniki wskazują na istotne różnice w działaniu tiaminy w komórkach *Saccharomyces* i *Candida*, co znów może być przestrogą przed pokusą prostych uogólnień. M. in., Doktorantka obserwowała mniejszy wpływ tiaminy obecnej w medium w stężeniu 1,4 μM na przeżywalność komórek w warunkach stresu oksydacyjnego (efekt pojawiał się, gdy tiamina była obecna w stężeniu dużo wyższym, 200 μM) i brak tak znaczącego obniżenia ekspresji badanych genów kodujących enzymy antyoksydacyjne jak w komórkach *S. cerevisiae*. Interesująca, w świetle rozważań nad sygnalizacyjną rolą reaktywnych form tlenu, jest obserwacja podwyższenia (a nie obniżenia) poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach *C. glabrata* poddanych działaniu stresu oksydacyjnego w obecności tiaminy (w porównaniu do warunków beztiaminowych), co koreluje z wysoką opornością tego gatunku na stres oksydacyjny.

Obszerna (19 stronicowa), bardzo dobrze napisana *Dyskusja* znakomicie uzupełnia wstępną interpretację wyników, krytycznie analizuje wyniki na tle danych piśmiennictwa i dowodzi dojrzałości naukowej Doktorantki.

Moj ogólna ocena pracy jest bardzo pozytywna. Z obowiązku recenzenta mam kilka drobnych uwag pod adresem rozprawy.

Można zastanawiać się, czy temat pracy nie jest sformułowany zbyt antropocentrycznie: tiamina jest witaminą dla nas, ale nie dla drożdży – jednak takie sformułowanie jest w pełni zrozumiałe i podkreśla, że badania służą wyjaśnieniu mechanizmu działania związku interesującego z tego względu, że jest witaminą dla człowieka. Purysta językowy zwróciłby uwagę, że „wiązanie (się) do" jest anglicyzmem, poprawnym zwrotem w języku polskim ma być „wiązanie (się) z". Zamiast „peroksynitryty" należałoby użyć termin „nadtlenoazotyn" (s. 59). Niezupełnie precyzyjna jest informacja (s. 59), że dihydrorodamina 123 jest markerem integralności mitochondriów; markerem takim może być produkt jej utlenienia (rodamina 123), co zresztą jest wzmiankowane później. Nieprecyzyjne jest używanie terminu „poziom wolnych rodników tlenowych" przy omawianiu wyników

pomiarów fluorescencji rodaminy 123, bowiem nie tylko wolnorodnikowe reaktywne formy tlenu przyczyniają się do utleniania jej prekursora. Nie do końca mogę zgodzić się z sugestią, że represja genów kodujących transportery niacyny i folianów w obecności tiaminy w medium hodowlanym *C. albicans* sugeruje, że te białka mogą być także transporterami tiaminy. Może tak być istotnie ale równie dobrze meandry regulacji transkrypcyjnej mogą wskazać fałszywy trop. Musze jednak przyznać, że swoją sugestię Doktorantka formułuje z należytą ostrożnością.

Te marginalne uwagi nie rzutują na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Natalii Wolak, która zawiera mnóstwo nowych danych, uzyskanych w oparciu o logicznie zaplanowane, właściwie przeprowadzone i dobrze opisane badania. Uważam, że rozprawa stanowi istotne osiągnięcie naukowe Doktorantki i Jej Promotora. Chcę także zwrócić uwagę na bardzo staranną edycję rozprawy i jej świetną szatę graficzną.

Doktorantka jest współautorką sześciu prac obecnych w bazie Pubmed, z których dwie oparte są na wynikach uzyskanych w ramach przygotowywania rozprawy doktorskiej.

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 późniejszymi zmianami. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Natalii Wolak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sądzę ponadto, że ze względu na nakład pracy, bogactwo oryginalnych wyników i staranność przygotowania rozprawa ta zasługuje na wyróżnienie.

G. Bartosz

Łódź, dnia 10 maja 2015

Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz