



Prof. dr hab. Teresa Żołądek
Zakład Genetyki
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5a, Warszawa

Warszawa, 2016-04-20

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Markowskiej pt. „Charakterystyka transportera arsenowego Acr3 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”.

Przedstawiona do oceny praca została wykonana w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Komórki Instytutu Biologii Eksperymentalnej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Roberta Wysockiego. Zespół ten od kilku lat, z dużym sukcesem, bada różne aspekty transportu arsenu i odpowiedzi komórki drożdży na stres arsenowy.

Arsen jest toksycznym dla komórki metaloidem, jednakże powszechnie występuje w środowisku. Komórki eukariotyczne wykształciły szereg mechanizmów obronnych, w tym regulujących pobieranie oraz usuwanie związków arsenu, ograniczających toksyczność w przypadku długotrwałej ekspozycji. Z drugiej strony, związki arsenu są używane jako leki w niektórych jednostkach chorobowych i nabywanie przez komórki oporności na te związki stanowi medyczny problem. W przedstawionej do recenzji pracy doktorantka podjęła się ambitnego zadania dogłębnego poznania mechanizmu działania antyportera arsenu Arc3, uczestniczącego w aktywnym usuwaniu arsenu na zewnątrz komórek w sprzężeniu z transportem protonów do wnętrza, w organizmie modelowym, jakim są drożdże. Temat ten jest więc ważny w aspekcie rolniczym i medycznym.

Doktorantka rozpoczęła swą pracę od zbadania topologii białka Acr3 w błonie komórkowej drożdży *S. cerevisiae*. Badanie metodami bioinformatycznymi wskazało na obecność 9-ciu lub 10-ciu regionów transbłonowych, co wiązało się z odmiennym położeniem końca C. Wobec tego oznaczono położenie pętli hydrofobowych między segmentami transbłonowymi metodą wstawienia kasety Suc2A warunkującej glikozylację i analizy glikozylacji tak zmodyfikowanego białka. W tej metodzie glikozylowane są tylko pętłe zewnątrzkomórkowe. Wyniki pozwoliły jednoznacznie ustalić położenie ośmiu pętli ale położenie ostatniej pętli dalej nie było jasne. Wobec tego zastosowano alternatywną metodę, wprowadzenia miejsc cicia proteolitycznego przez czynnik krzepnięcia Xa, co pozwoliło ostatecznie ustalić topologię białka Acr3. Arc3 posiada dziesięć domen transbłonowych, a końce N i C skierowane są do cytoplazmy.

W drugiej części pracy doktorantka zidentyfikowała aminokwasy niezbędne do funkcjonowania antyportera metodą mutagenazy ukierunkowanej i analizy funkcjonalnej mutantów. Do mutagenazy wytypowano 26 ewolucyjnie konserwowanych aminokwasów występujących we wszystkich domenach transbłonowych. Mutanty poddano szczegółowej analizie fenotypowej i biochemicznej (wzrost w obecności arsenu, ekspresja genu *ARC3*, poziom białka Arc3-GFP w ekstrakcie całkowitym, poziom białka Arc3-GFP w błonie komórkowej, lokalizacja komórkowa białka Arc3-GFP, usuwanie arsenu z komórek mutantów). Pozwoliło to na klasyfikację mutantów i identyfikację aminokwasów ważnych dla prawidłowego fałdowania i transportu Arc3 do błony komórkowej oraz takich, które nie powodują zmian poziomu białka, czy jego lokalizacji, ale mogą być ważne dla jego funkcjonowania w procesie antyportu (aa S349, F266, F352, E353, E380). Dalszej analizie poddano reszty kwasu glutaminowego (E353 i E380) i pokazano, że są one kluczowe dla aktywności transportowej.

Praca zawiera wyczerpujący *Wstęp* teoretyczny, który jest oparty o najnowszą literaturę. Pierwsza część *Wstępu* wprowadza czytelnika w zagadnienia występowania, właściwości, transportu arsenu u bakterii, grzybów, roślin i ssaków, oraz zastosowania arsenu. W drugiej części doktorantka omawia rodzaje, strukturę i mechanizmy działania transporterów wtórnych. *Wstęp* ten jest ściśle związany z tematem i celami pracy, ponadto stanowi doskonałą pracę przeglądową, która po uzupełnieniu o własne wyniki, mogłaby być opublikowana np. w *Postęпах Biochemii*. Doktorantka zastosowała w swej pracy wiele bardzo różnorodnych metod genetyki oraz biologii molekularnej i komórkowej drożdży a rozdział opisujący *Materiały i metody* jest bardzo dobrze i wyczerpująco napisany.

Dyskusja jest niezwykle obszerna (29 stron) i nie jest podzielona na rozdziały, ale bardzo kompetentna, rzeczowa i wyczerpująca. Autorka dyskutuje swoje wyniki badań struktury Arc3 na tle badań struktury innych transporterów wtórnych. Wyniki te w połączeniu z ostatnio opublikowaną strukturą krystaliczną transportera kwasów żółciowych *Yersinia frederiksenii*, który ma taką samą topologię jak Arc3, pozwoliły na opracowanie hipotetycznego modelu białka Arc3 metodą modelowania homologicznego. Model ten zakłada istnienie domeny panelowej i rdzeniowej z dwoma nieciągłymi krzyżującymi się alfa-helisami. Na bazie informacji dostępnej dla transporterów kwasów żółciowych model zakłada mechanizm transportu, w którym zachodzi obrót domeny rdzeniowej względem nieruchomej domeny panelowej, który ma miejsce po związaniu protonu i substratu. Autorka dyskutuje role poszczególnych aminokwasów w tym mechanizmie, w tym istotnej cysteiny 151 (TM4) i innych cystein, w wiązaniu arsenu i antymonu oraz pięciu zidentyfikowanych przez nią aminokwasów ważnych dla funkcjonowania białka. Seryna 349 (TM9) położona obok cysteiny 151 może być ważna dla wiązania substratu, reszty kwasu glutaminowego 353 i 380 mogą być poddawane procesowi protonacji i deprotonacji w procesie

transportu protonów, natomiast fenyloalaniny 266 i 352 mogą być ważne dla formowania stanu zamkniętego transportera.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest napisana bardzo kompetentnie i bardzo dobrą polszczyzną. Zagadnienia teoretyczne oraz doświadczenia są omawiane logicznie, pozwalając na zrozumienie postawionych problemów, sposobu ich rozwiązania i kolejnych wniosków. Jeżeli chodzi o stronę redakcyjną, praca jest perfekcyjna, nie znalazłam żadnych istotnych błędów, dopatrzyłam się tylko dwóch literówek i kilku zwrotów żargonowych.

Podsumowując, autorka wykonała szereg dobrze zaplanowanych i wykonanych eksperymentów, z których wyprowadzone zostały prawidłowe i logiczne wnioski. Tok doświadczeń w całej pracy doprowadził do otrzymania nowych bardzo interesujących wyników, dotyczących mechanizmu transportu arsenu i protonów przez antyporter Arc3. Należy podkreślić, że przedstawione wyniki wchodzą w skład jednej opublikowanej pracy eksperymentalnej, której K. Markowska jest pierwszym autorem. Jest ona też współautorem innej pracy doświadczalnej tematycznie związanej z pracą dokorską, co dobrze świadczy o jej produktywności i aktywności naukowej.

Oceniam przedstawioną rozprawę dokorską mgr Katarzyny Markowskiej bardzo wysoko. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z tym przedkładam Radzie Naukowej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Markowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wniosek o wyróżnienie pracy.

Łotopolek