



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

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

Zainteresowanie oddziaływaniem arsenu z komórkami jest w pełni zrozumiałe. Kilkadziesiąt milionów ludzi ekspozowanych jest na działanie kancerogennego arsenu. Problem ten nie dotyczy na szczęście naszego kraju, jednak związki arsenu stosowane są w terapii, w tym w chemioterapii nowotworów. Krytyczne znaczenie dla komórkowych oddziaływań arsenu ma transport arsenu, zwłaszcza jego eksport z komórek; o ile eksport arsenu jest korzystny dla organizmu w przypadku środowiskowego narażenia na arsen, może stanowić podłoże oporności komórek nowotworowych na związki arsenu. Szereg transporterów może uczestniczyć w eksporcie związków arsenu na zewnątrz komórek; u organizmów eukariotycznych najlepiej poznanym z nich jest białko Acr3, po raz pierwszy opisane u drożdży przez Promotora rozprawy, Profesora Roberta Wysockiego (*J. Biol. Chem* 1997). Poznanie struktury i zrozumienie mechanizmu działania transporterów nie jest proste, głównie ze względu na trudności charakterystyki strukturalnej integralnych białek błon. Również budowa i mechanizm transportu  $As^{3+}$  przez białko Acr3 oczekują na wyjaśnienie. Celem rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Markowskiej było poszerzenie wiedzy w zakresie molekularnej charakterystyki transportera Acr3 drożdży *Saccharomyces cerevisiae* poprzez ustalenie topologii białka Acr3 w błonie komórkowej i identyfikację reszt aminokwasowych istotnych dla transportu  $As^{3+}$  w regionach transbłonowych białka.

Świetnie napisana rozprawa doktorska mgr Katarzyny Markowskiej ma klasyczny układ. Rozpoczyna ją zwięzły, kompetentnie napisany *Wstęp*, w którym Autorka pracy przedstawia arsen – jego występowanie w środowisku i właściwości chemiczne, mechanizmy toksycznego działania,

użycie w terapii, drogi wnikania do komórek i usuwania z komórek oraz transportery wtórne - rodzaje błonowych białek zaangażowanych w transport, ujednoczoną koncepcję mechanizmu transportu wtórnego, a także charakterystyczne cechy strukturalne i funkcjonalne transporterów wtórnych.

Materiały i metody, obejmujące techniki biologii molekularnej, biologii komórek drożdży, biochemii i biofizyki białek błon przedstawione są w rozprawie należycie szczegółowo. Użyty warsztat metodyczny był, w moim przekonaniu, optymalny dla realizacji celu pracy, nowoczesny i odpowiadający współczesnym światowym standardom badań w tej dziedzinie. Opis wyników jest jasny, precyzyjny, przejrzysty i przedstawiony w atrakcyjnej formie graficznej.

Uważam wybór tematu badawczego za trafny i uzasadniony biomedycznym znaczeniem transportu arsenu. Moja opinia z pewnością nie jest odosobniona, bowiem badania zostały wykonane w ramach projektu badawczego OPUS, musiała być więc zbieżna z opinią panelu ekspertów Narodowego Centrum Nauki, który zakwalifikował projekt do finansowania. Wysoko oceniam koncepcję pracy, zakładającą uzyskanie informacji sprecyzowanej w celu pracy za pomocą pomysłowej kombinacji metod biologii molekularnej, biochemii białek błon i bioinformatyki. Zastosowanie modelu drożdżowego było bardzo dobrym rozwiązaniem ze względu na łatwość modyfikacji genetycznych, możliwość zastosowania testu wzrostu w obecności  $As^{3+}$  jako prostego, a przy tym jednoznacznego testu aktywności transportowej mutein białka Acr3. Mimo oczywistej wady drożdży jako organizmu modelowego w badaniach białek błonowych, jaką jest obecność ściany komórkowej i wynikająca stąd konieczność preparowania sferoplastów do części oznaczeń, przeprowadzenie badań drożdżowego białka Acr3 było prostsze, dużo tańsze i znacznie szybsze niż wykonanie analogicznych badań na komórkach zwierzęcych.

Zastosowanie konstruktów zawierających białko zielonej fluorescencji umożliwiło określenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka, istotne dla interpretacji obniżonej aktywności transportowej mutein, a także immunodetekcję białka po rozdziale elektroforetycznym i przeniesieniu na błonę nitrocelulozową, za pomocą przeciwciał anty-GFP. Test oparty na spektrofotometrycznym pomiarze absorbancji oranżu akrydyny, barwnika wrażliwego na zmiany pH, w wycinanych pęcherzykach błonowych pozwolił na oznaczenie szybkości antyportu  $As^{3+}/H^+$ . Wstawienie w sekwencję regionów łączących segmenty transbłonowe sekwencji IEGR, zawierającej miejsce wrażliwe na trawienie przez czynnik krzepnięcia krwi Xa i użycie

wynicowanych pęcherzyków błonowych umożliwiło określenie wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowej lokalizacji tych regionów. Równolegle Doktorantka zastosowała metodę wstawienia w segmenty hydrofilowe sekwencji Suc2a, będącej substratem glikozylacji i analizę glikozylacji tak modyfikowanych mutein białka. Uzyskanie 26 mutein zawierających w odpowiednich pozycjach sekwencji zamienione aminokwasy podejrzewane o pełnienie istotnej roli w procesie prawidłowego fałdowania białka i antyportu  $As^{3+}/H^{+}$  umożliwiło identyfikację takich reszt. W oparciu o modele struktury pokrewnych transporterów, Doktorantka zaproponowała model topologii i hipotetyczny mechanizm działania białka Acr3 drożdży. Doktorantka musiała uporać się z trudnościami związanymi m. in. z niejednoznacznymi wynikami eksperymentów pozwalającymi na wnioskowanie o liczbie segmentów przezbłonowych białka i niejednoznacznymi modelami topologii białka wygenerowanymi przez osiem użytych programów komputerowych. Nie mam jednak zastrzeżeń co do wniosków dotyczących topografii wyciągniętych przez Doktorantkę.

Znakomicie napisana 30-stronicowa *Dyskusja* zawiera nie tylko omówienie własnych wyników i ich konfrontację z danymi piśmiennictwa, ale także dogłębną analizę uzyskanych danych własnych i literaturowych prowadzącą do propozycji mechanizmu działania transportera.

Za najważniejsze wyniki uzyskane w pracy uważam wykazanie, że (i) białko Acr3 *S. cerevisiae* zawiera 10 segmentów przezbłonowych, a jego segmenty: N-końcowy i C-końcowy położone są po cytoplazmatycznej stronie błony, (ii) identyfikację reszt aminokwasowych istotnych dla prawidłowego fałdowania, sortowania i funkcji transportowej białka oraz (iii) wykazanie topologicznego podobieństwa białka Acr3 *S. cerevisiae* do bakteryjnych symporterów  $Na^{+}$  i kwasów żółciowych ASBT. Praca mgr Katarzyny Markowskiej może być świetnym przykładem uzyskania istotnych informacji o strukturze białka błonowego bez technik krystalografii/rentgenografii i NMR, choć wyciągnięte przez Nią wnioski będą w przyszłości musiały być zweryfikowane z użyciem tych technik.

Mam niewiele uwag krytycznych czy polemicznych pod adresem rozprawy. Mam pytanie czy (a jeśli tak, to w jaki sposób) Doktorantka określała czystość i szczelność wycinanych pęcherzyków błonowych? Nie było to zbyt istotne przy określaniu aktywności transportującej białka Acr3, ale mogło mieć znaczenie dla analizy topologii białka. Czy możliwe byłoby ilościowe oznaczenie szybkości eksportu  $As^{3+}$  w oparciu o test wykorzystujący oranż akrydyny? Dobrze

czasopismo biochemiczne zapewne zażądałoby podania wyników densytometrycznej analizy danych pokazanych na Ryc. 20. Na s. 27 znajdujemy termin „wolna energia”, będący nieprecyzyjnym tłumaczeniem angielskiego terminu „free energy”. Wykaz skrótów (s. 127) podaje błędne objaśnienie symbolu  $O_2^-$  - nie jest to rodnik nadtlenkowy, lecz ponadtlenkowy (powinien być zresztą napisany jako wolny rodnik,  $O_2^{\bullet}$ ); nie byłoby wtedy problemu z nazwaniem rodnika  $ROO^{\bullet}$  rodnikiem nadtlenowym. Na s. 12 w środku zdania zaczynającego się od słów: „Arsen wiąże duże ilości wolnego glutationu” szwankuje składnia, prawdopodobnie winno być „hamuje funkcje lub „hamuje działanie”. Ogólnie jednak - poza tymi drobnymi usterkami – edycja pracy jest świetna i zasługuje na wysokie uznanie.

W podsumowaniu uważam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Markowskiej 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 Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Katarzyny Markowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Sądzę też, że ze względu na wysoki poziom metodyczny i merytoryczny, wagę uzyskanych wyników, opublikowanie części wyników w renomowanym czasopiśmie (*Molecular Microbiology*) i staranną edycję, rozprawa zasługuje na wyróżnienie.



Łódź, dnia 6 maja 2016

Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz