

WNIOSEK

o finansowanie projektu badawczego

własnego	habilitacyjnego	promotorskiego	1)
----------	-----------------	----------------	----

A) DANE WNIOSKODAWCY

1. Kierownik projektu (imię, nazwisko, tytuł lub stopień naukowy, adres do korespondencji, tel., e-mail). Dr hab. Andrzej Paszkowski, prof. nadzw. SGGW; Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego; Wydział Rolnictwa i Biologii; Katedra Biochemii; ul. Nowoursynowska 159; 02-776 Warszawa; Tel. 022 593 25 68; Fax 022 593 25 62; E-mail: andrzej_paszkowski@sggw.pl	Wypełnia Ministerstwo Nauki i Informatyzacji
	Nr rejestracyjny wniosku: Data wpłynięcia wniosku:
2. Nazwa i adres jednostki naukowej, tel., faks, e-mail, www Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego; ul. Nowoursynowska 166; 02-787 Warszawa; Wydział Rolnictwa i Biologii; Katedra Biochemii; ul. Nowoursynowska 159; 02-776 Warszawa; Tel. 022 593 25 60; Fax 022 593 25 62; E-mail: rol_kbio@delta.sggw.waw.pl ; URL: http://agrobiol.sggw.waw.pl/katedry/kbio/	
3. Kierownik jednostki Prorektor ds. Nauki prof. dr hab. Katarzyna Niemirowicz-Szczytt	
4. NIP, REGON NIP: 525-000-74-25 REGON: P-000001784	
5. Nazwa banku, nr rachunku Bank BPH S.A. O/Warszawa; ul. Nowoursynowska 166; 41 1060 0076 0000 4043 7000 0022	

B) INFORMACJE OGÓLNE

Tytuł projektu	Biosynteza izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej u pszenicy zwyczajnej (<i>Triticum aestivum</i> L.)		
Dyscyplina naukowa (zgodnie z wykazem dziedzin i dyscyplin)	Biologia molekularna i komórkowa (N301)		
Planowany okres realizacji projektu (w miesiącach)	24 miesiące	Liczba wykonawców projektu	2 osoby
Słowa kluczowe: Aminotransferaza asparaginianowa; EST; izoenzymy; lokalizacja chromosomalna genów; linie delecyjne; spektrometria mas; <i>Triticum aestivum</i> ; właściwości biochemiczne			
Planowane nakłady w zł:	Ogółem	Pierwszy rok realizacji projektu	
	50 000 zł	33 600 zł	

Streszczenie projektu

Biosynteza izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)

Aminotransferaza asparaginianowa (AAT, EC 2.6.1.1) odgrywa kluczową rolę w regulacji przepływu węgla i azotu u wszystkich organizmów oraz bierze udział w transporcie równoważników redukcyjnych przez błony organelli komórkowych u eukariota. Próby uzyskania transgenicznych roślin tytoniu i ryżu odznaczających się zwiększonym poziomem aktywności AAT zostały już podjęte (Sentoku i współ. 2000; Nomura i współ. 2005). Wyniki proponowanego projektu badawczego mają w założeniu ułatwić działania w podobnym kierunku u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.; $2n = 6x = 42$) a ponadto będą stanowiły naturalne uzupełnienie rozpoczętego w 2003 roku międzynarodowego przedsięwzięcia dotyczącego sekwencjonowania genomu tej rośliny.

W związku z tym, cele planowanych badań to: ustalenie sekwencji nukleotydowych na poziomie cDNA genów kodujących izoenzymy AAT u heksaploidalnej pszenicy, dokładne umiejscowienie genów AAT w obrębie poszczególnych chromosomów, określenie poziomu ich ekspresji, a także zbadanie niektórych właściwości biochemicznych kodowanych przez nie białek enzymatycznych. Zostanie opracowana procedura oczyszczania izoenzymów AAT z liści pszenicy. Wysoko oczyszczone preparaty enzymatyczne będą użyte do wyznaczenia takich parametrów kinetycznych jak K_m i k_{cat} oraz oznaczenia mas cząsteczkowych w warunkach natywnych i denaturujących. Dane te pomogą wyjaśnić funkcje metaboliczne alloenzymów (izoenzymy kodowane przez geny alleliczne) AAT pochodzących z trzech różnych pasm (3 ugrupowania alloenzymów różniące się ruchliwością elektroforetyczną) a jednocześnie posłużą do potwierdzenia przydatności metody densytometrycznej analizy zymogramów do pomiaru poziomu biosyntezy tych białek enzymatycznych (Maciąga i Paszkowski, 2004). Wybarwione i wycięte z żelu prążki białkowe AAT otrzymane po elektroforezie w warunkach denaturujących zostaną poddane sekwencjonowaniu przy pomocy metody spektrometrii mas. Ustalone sekwencje aminokwasowe izoenzymów zostaną przypisane do zrekonstruowanych, na podstawie EST-ów z baz danych, sekwencji cDNA. Na mapach delecyjnych pszenicy za pomocą metody Southerna i analizy porównawczej zymogramów zostanie dokonana lokalizacja chromosomalna genów kodujących izoenzymy AAT. Planowane jest również wykorzystanie do tego celu genomowych map porównawczych dla pszenicy i innych blisko spokrewnionych gatunków. Pomiar poziomu ekspresji genów kodujących izoenzymy AAT z liści pszenicy za pomocą reakcji RT-PCR z analizą w czasie rzeczywistym pozwoli na zweryfikowanie wcześniej wysuniętej hipotezy (Maciąga i Paszkowski, 2004) o zróżnicowanym poziomie syntezy mRNA właściwego dla alloenzymów pochodzących z trzech pasm: mitochondrialnego, chloroplastowego i cytoplazmatycznego.

C) INFORMACJE O WYKONAWCACH

- 1) **Imię i nazwisko:** Andrzej Paszkowski
- 2) **Adres zamieszkania:...** **Adres do korespondencji:** Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego; Wydział Rolnictwa i Biologii; Katedra Biochemii; ul. Nowoursynowska 159; 02-776 Warszawa; Tel. 022 593 25 68; Faks 022 593 25 62; E-mail: andrzej_paszkowski@sggw.pl
- 3) **Miejsca zatrudnienia i zajmowane stanowiska:** Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego; Wydział Rolnictwa i Biologii; Katedra Biochemii; profesor nadzwyczajny SGGW
- 4) **Charakter udziału w realizacji projektu (kierownik lub wykonawca):** Kierownik projektu
- 5) **Przebieg pracy naukowej: nazwa szkoły wyższej, instytutu lub innej jednostki organizacyjnej, specjalność, data uzyskania tytułu zawodowego, stopnia naukowego lub tytułu naukowego:**
Magistra:...
Doktora:...
Doktora habilitowanego:...
- 6) **Informacje o pracach wykonanych w okresie ostatnich 4 lat²⁾ przed zgłoszeniem wniosku.**

1. Bartyzel I, Pelczar K, Paszkowski A (2003). Functioning of the γ -aminobutyrate pathway in wheat seedlings affected by osmotic stress. *Biologia Plantarum* 47: 221-225.
2. Truskiewicz W, Paszkowski A (2004). Serine:glyoxylate aminotransferases from maize and wheat leaves: purification and properties. *Photosynthesis Research* 82: 35-47.
3. Maciąga M, Paszkowski A (2004). Genetic control of aspartate aminotransferase isoenzymes in *Aegilops* and *Triticum* species. *J Appl Genet* 45: 411-417.
4. Truskiewicz W, Paszkowski A (2005). Some structural properties of plant serine:glyoxylate aminotransferase. *Acta Biochim Polon* 52: 527-534.
5. Wiśniewski P, Szklarczyk J, Maciąga M, Paszkowski A (2006). L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase isoenzymes from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Acta Physiol Plantarum* 28 (6), w druku.

Komunikaty

6. Truskiewicz W, Paszkowski A (2003). Serine:glyoxylate aminotransferase from wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.) leaves: purification and kinetic properties. Abstracts of the 39th meeting of the Polish Biochemical Society, Gdańsk, *Acta Biochim Polon* 50 suppl 1: 333.
7. Truskiewicz W, Paszkowski A (2003). Some phenomena related to three-dimensional structures of plant serine:glyoxylate aminotransferase. Abstracts of the 39th meeting of the Polish Biochemical Society, Gdańsk, *Acta Biochim Polon* 50 suppl 1: 333.
8. Wiśniewski P, Zielińska E, Paszkowski A (2004). Alanine aminotransferase from leaves of *Arabidopsis thaliana* L. – a monomer catalyzing L-alanine: α -ketoglutarate transamination reaction. Abstracts of the meeting of FEBS, Warszawa, *Eur J Biochem* 271 suppl. 1: 80.

9. Maciąga M, Paszkowski A (2006). Charakterystyka izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej z siewek pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.). Komunikat zakwalifikowany do wystąpienia ustnego podczas XLI Zjazdu PTBioch w Białymstoku.
- 7) **Wykonane w okresie ostatnich 4 lat²⁾ przed zgłoszeniem wniosku i aktualnie realizowane projekty badawcze i celowe finansowane ze środków finansowych na naukę – numery projektów, miejsce realizacji oraz charakter udziału przy realizacji projektu.**
...
- 8) **Doświadczenia naukowe zdobyte w kraju i za granicą (kraj, instytucja, rodzaj pobytu, okres pobytu, jednostka delegująca)**
...

Oświadczenie

Przyjmuję warunki udziału w konkursie projektów badawczych, określone w przepisach w sprawie kryteriów i trybu przyznawania i rozliczania środków finansowych na naukę oraz wyrażam zgodę na zamieszczenie moich danych osobowych zawartych we wniosku w zbiorze danych Ministerstwa Nauki i Informatyzacji oraz na przetwarzanie tych danych zgodnie z przepisami ustawy z dnia 29 sierpnia 1997 r. o ochronie danych osobowych (Dz. U. Nr 133, poz. 883 z późn. zm.)

Miejscowość i data

- 1) **Imię i nazwisko:** Marcin Maciąga
- 2) **Adres zamieszkania:...** **Adres do korespondencji:** Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego; Wydział Rolnictwa i Biologii; Katedra Biochemii; ul. Nowoursynowska 159; 02-776 Warszawa; Tel. 022 593 25 73; E-mail: d-artagnan@wp.pl; URL: <http://d-artagnan.webpark.pl>; PESEL:...
- 3) **Miejsca zatrudnienia i zajmowane stanowiska:** Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego; Wydział Rolnictwa i Biologii; Katedra Biochemii; doktorant
- 4) **Charakter udziału w realizacji projektu (kierownik lub wykonawca):** Wykonawca projektu
- 5) **Przebieg pracy naukowej: nazwa szkoły wyższej, instytutu lub innej jednostki organizacyjnej, specjalność, data uzyskania tytułu zawodowego, stopnia naukowego lub tytułu naukowego:**
Magistra: SGGW; Międzywydziałowe Studium Biotechnologii; mgr inż. Biotechnologii; 1.10.2002
- 6) **Informacje o pracach wykonanych w okresie ostatnich 4 lat²⁾ przed zgłoszeniem wniosku**
 1. Maciąga M, Paszkowski A (2004). Genetic control of aspartate aminotransferase isoenzymes in *Aegilops* and *Triticum* species. *J Appl Genet* 45: 411-417.
 2. Wiśniewski P, Szklarczyk J, Maciąga M, Paszkowski A (2006). L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase isoenzymes from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Acta Physiol Plantarum* 28 (6), w druku.

Komunikaty

3. Maciąga M, Paszkowski A (2006). Charakterystyka izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej z siewek pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.). Komunikat zakwalifikowany do wystąpienia ustnego podczas XLI Zjazdu PTBioch w Białymstoku.
- 8) **Doświadczenia naukowe zdobyte w kraju i za granicą (kraj, instytucja, rodzaj pobytu, okres pobytu, jednostka delegująca)**
- Instytut Biochemii i Biofizyki; Zakład Biochemii roślin; praktyki studenckie; 1 miesiąc; 2000;
 - Uniwersytet Warszawski; Wydział Fizyki; studia dzienne; 2 semestry – 10 miesięcy; 2002/2003;
 - Instytut Biochemii i Biofizyki; Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas; kurs jednodniowy; 2005.
 - SGGW; Katedra Biochemii; 30 godzinny (24 godz. ćwiczeń i 6 godz. wykładów) kurs dla doktorantów Wydziału Rolnictwa i Biologii pt. „Wybrane zagadnienia z biologii molekularnej i inżynierii genetycznej”; 2006.

Oświadczenie

Przyjmuję warunki udziału w konkursie projektów badawczych, określone w przepisach w sprawie kryteriów i trybu przyznawania i rozliczania środków finansowych na naukę oraz wyrażam zgodę na zamieszczenie moich danych osobowych zawartych we wniosku w zbiorze danych Ministerstwa Nauki i Informatyzacji oraz na przetwarzanie tych danych zgodnie z przepisami ustawy z dnia 29 sierpnia 1997 r. o ochronie danych osobowych (Dz. U. Nr 133, poz. 883 z późn. zm.)

Miejscowość i data

D) OPIS PROJEKTU BADAWCZEGO, METODYKA BADAŃ ORAZ CHARAKTERYSTYKA OCZEKIWANYCH WYNIKÓW

1. Cel naukowy projektu (jaki problem naukowy wnioskodawca podejmuje się rozwiązać, co jest jego istotą, dokładna charakterystyka efektu końcowego).

Celem naukowym niniejszego projektu promotorskiego jest ustalenie sekwencji nukleotydowych na poziomie cDNA genów kodujących izoenzymy aminotransferazy asparaginianowej (EC 2.6.1.1) u heksaploidalnej pszenicy (*Triticum aestivum*), lokalizacji chromosomalnej tych genów, określenie poziomu ich ekspresji oraz zbadanie niektórych właściwości biochemicznych kodowanych przez nie białek enzymatycznych. W intencji autorów uzyskane wyniki poszerzą dotychczasową wiedzę na temat przebiegu biosyntezy enzymów u roślin poliploidalnych.

2. Znaczenie projektu (co uzasadnia podjęcie tego problemu w kraju, jakie przesłanki skłaniają wnioskodawcę do podjęcia proponowanego tematu, dlaczego projekt zdaniem autora powinien być finansowany, znaczenie wyników projektu dla rozwoju danej dziedziny i dyscypliny naukowej oraz rozwoju cywilizacyjnego, czy w przypadku pozytywnych wyników będą one mogły znaleźć praktyczne zastosowanie).

W 2004 roku uprawy roślin modyfikowanych genetycznie zajmowały na Ziemi 81 mln hektarów (<http://www.isaaa.org/>), czyli powierzchnię 2.6 raza większą od powierzchni Polski. Większość roślin mających znaczenie gospodarcze dla człowieka zostało już zmodyfikowanych genetycznie, m.in. wyhodowano transgeniczny ryż o zwiększonej produkcji beta-karotenu prekursora witaminy A (Paine i współ. 2005; http://en.wikipedia.org/wiki/Golden_Rice/) oraz pszenicę o wyższej zawartości glutenu – białka poprawiającego właściwości wypiekowe mąki (Shimoni i współ. 1997). Polskim akcentem jest modyfikowana sałata produkująca szczepionkę przeciw zapaleniu wątroby typu B otrzymana przez naukowców z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pracujących pod kierunkiem prof. A. Legockiego (Kapusta i współ. 1999). Nie ulega wątpliwości, że rośliny modyfikowane, które dziś przynoszą wiele korzyści w przyszłości mogą okazać się niezastąpione. Uważamy, że wyniki proponowanych badań dotyczących przebiegu biosyntezy izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej (AAT, EC 2.6.1.1) u heksaploidalnej pszenicy (*Triticum aestivum*) ułatwią dalszą pracę w kierunku otrzymania roślin transgenicznych. Stanowi to dobre uzasadnienie dla ich finansowania tym bardziej, że pierwsze próby manipulacji genetycznych z udziałem genów AAT, enzymu odgrywającego kluczową rolę metaboliczną u wszystkich organizmów (Liepman i Olsen 2004) zostały już podjęte. I tak, Sentoku i współ. (2000) wprowadzili geny kodujące izoenzymy AAT pochodzące z prosa (*Panicum miliaceum*) do komórek tytoniu (*Nicotiana tabacum*), natomiast Nomura i współ. (2005) badali ekspresję tych genów w transgenicznym ryżu (*Oryza sativa*).

W 2000 roku zakończył się projekt sekwencjonowania genomu rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) o rozmiarach 125 Mbp (<http://www.arabidopsis.org/>). Roślina ta jest mało

ważnym chwastem w przeciwieństwie do ryżu, kukurydzy i pszenicy, które razem zaspokajają ponad 60% globalnego zapotrzebowania na żywność (Gill i współ. 2004). Stąd też w 2002 roku zsekwencjonowano genom ryżu siewnego (*Oryza sativa*) – 440 Mpz (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/>), a podobne projekty zainicjowano dla kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*) – 2 500 Mpz (<http://www.maizegenome.org/>) i pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*) – 17 000 Mpz (Gill i współ. 2004; <http://wheatgenome.org/>). W przekonaniu autorów wyniki uzyskane w ramach niniejszego projektu będą pomocne w identyfikacji genów AAT, poznaniu sposobów ich regulacji oraz wzbogacą charakterystykę kodowanych przez nie białek. Wszystko to stanowi naturalne uzupełnienie przedsięwzięć badawczych dotyczących sekwencjonowania genomów.

3. Istniejący stan wiedzy w zakresie tematu badań (jaki oryginalny wkład wniesie rozwiązanie postawionego problemu do dorobku danej dyscypliny naukowej w kraju i na świecie, czy w kraju i na świecie jest to problem nowy czy kontynuowany i w jakim zakresie weryfikuje utarte poglądy i dotychczasowy stan wiedzy).

Według stanu z dnia 7 lipca 2006 roku w komputerowej bazie danych GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>) było zdeponowanych 37 527 238 etykiet sekwencji ulegających ekspresji (ang. expressed sequence tag, EST) dla około 1 000 organizmów. Jak wynika z zamieszczonych tam informacji dla ponad 450 organizmów zdeponowano co najmniej 1 000 EST-ów, dla około 200 co najmniej 10 000 a dla 49-ciu powyżej 100 000 EST-ów. Wśród organizmów roślinnych najwięcej EST-ów można znaleźć dla ryżu – 1 186 580, pszenicy – 854 988, kukurydzy – 789 489 i rzodkiewnika – 622 972. W niedalekiej przeszłości, tj. w maju 2000 roku w tej samej bazie dla ryżu nie było ani jednego EST-u, natomiast dla pszenicy znajdowało się zaledwie 9 (Lazo i współ. 2004). Wszystkie EST-y są identyfikowane na podstawie porównywania z sekwencjami poznanych i opisanych genów. Zachodzące na siebie sekwencje EST-ów umożliwiają rekonstrukcję genów na poziomie cDNA. Należy oczekiwać, że w najbliższym czasie sekwencje pierwszych kilku chromosomów badanej przez nas pszenicy zostaną opublikowane (<http://www.wheatgenome.org/>). A zatem możliwe będzie porównanie sekwencji DNA genomowego z sekwencjami EST-ów niekiedy zawierającymi fragmenty intronów, które nie uległy jeszcze wycięciu. Daje to wgląd w proces transkrypcji i dojrzewania mRNA. Rekonstrukcja genów oznacza jednocześnie ustalenie sekwencji aminokwasowej produktu kodowanego przez ten gen. Oczyszczenie enzymu, poddanie go sekwencjonowaniu coraz częściej stosowaną w tym celu metodą spektrometrii mas a następnie sprawdzenie na podstawie poznanej sekwencji aminokwasowej, czy rekonstrukcja genu przy pomocy EST-ów przebiegła prawidłowo, to podejście zwiększające wiarygodność wyników.

Jako pierwsi oczyszczania aminotransferazy asparaginianowej (ang. aspartate aminotransferase, AAT) z liści pszenicy podjęli się Verjee i Evered (1969), którzy po zastosowaniu wysalania $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, rozdzielali na żelu z fosforanu wapnia, chromatografii powinowactwa, chromatografii na kolumnie DEAE-

celulozy oraz re-chromatografii na tej kolumnie otrzymali 60-krotnie oczyszczony preparat enzymu. Nieco lepszy rezultat osiągnęli Orlacchio i współ. (1975), albowiem po zastosowaniu wysalania siarczanem amonu, chromatografii na kolumnach z DEAE-celulozy oraz z Sephadex`u G-200 udało im się oczyścić AAT 160-krotnie a uzyskany preparat wykazywał na zymogramie dwa aktywne prążki. Prawdopodobnie były to pasma (różniące się ruchliwością elektroforetyczną ugrupowania alloenzymów, czyli izoenzymów kodowanych przez geny alleliczne) AAT-2 oraz AAT-3, które u pszenicy wykazują najwyższą aktywność (Maciąga i Paszkowski 2004). W niedawno opublikowanej pracy dotyczącej otrzymywania z ziarna pszenicy AAT w postaci krystalicznej (Kochkina 2004) zastosowano kilka metod rozdziału uwzględniających różne właściwości białek: chromatografię jonowymienną na kolumnie z DEAE-celulozy, wytrącanie siarczanem protaminy, wysalanie siarczanem amonu oraz chromatografię na hydroksyapatycie. Uzyskany współczynnik oczyszczenia przekroczył zaledwie 50, a ponadto nie wykryto więcej niż jednej formy AAT. Na uwagę zasługują jeszcze 2 prace na temat oczyszczania AAT z prosa. Numazawa i współ. (1989) po zastosowaniu wysalania siarczanem amonu, chromatografiach na kolumnach z DEAE-celulozy, Sephacrylu S-300 oraz hydroksyapatytu otrzymali z liści prosa (*Panicum maximum*) preparat AAT oczyszczony 100-krotnie zawierający dwie formy tego enzymu. Z kolei Taniguchi i współ. (1995) po zastosowaniu wysalania siarczanem amonowym otrzymali z liści prosa (*Panicum miliaceum*) frakcję, którą następnie rozdzielili na kolumnie z DE-celulozy na 3 różniące się ruchliwością elektroforetyczną pasma i odpowiadające 3 pasmom u pszenicy. W trakcie dalszego oczyszczania przy pomocy chromatografii na kolumnach z Sephacrylu S-200, hydroksyapatytu, fenylo Sepharose`y oraz Mono P lub Mono Q w pierwszym preparacie o najwyższej ruchliwości elektroforetycznej i trzecim o najniższej wyodrębnili po 3 alloenzymy odznaczające się współczynnikami oczyszczania mieszczącymi się w granicach od 30 do 70. Analogicznej pracy dotyczącej pszenicy nikt jeszcze nie wykonał a w liściach tej rośliny stwierdzono występowanie 9 alloenzymów po 3 w każdym z trzech pasm (Karcicio i Izbirak 2003, Maciąga i Paszkowski 2004). Sądzymy zatem, że należałoby takie działanie podjąć. Kluczowym etapem zapewniającym wysoki stopień czystości preparatów poszczególnych alloenzymów mogłaby być jonowymienna HPLC nie stosowana dotąd przy oczyszczaniu izoenzymów AAT. Wskazują na to wyniki naszych wstępnych badań.

Masy cząsteczkowe AAT z roślin zbożowych wyznaczone w warunkach natywnych różniły się między sobą. Verjee i Evered (1969) wyznaczyli masę enzymu z pszenicy na 75 kDa metodą sączenia molekularnego na kolumnie z żelu Sephadex G-100, natomiast Numazawa i współ. (1989) stosując kolumnę z żelu Sephadex G-200 otrzymali wartość 100 kDa dla enzymu z prosa olbrzymiego (*Panicum maximum*). Z kolei Taniguchi i Sugiyama (1990) po zastosowaniu kolumny Superose 12 uzyskali wartość 80 kDa dla enzymu z prosa afrykańskiego (*Eleusine coracana*). Masę cząsteczkową w warunkach denaturujących dla enzymów z prosa afrykańskiego oraz zwyczajnego wyznaczyli metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym z SDS odpowiednio Taniguchi i Sugiyama (1990) oraz Taniguchi i współ. (1995). W obu przypadkach wyniosła ona 40 kDa. Stosując tę samą metodę Numazawa i współ. (1989)

otrzymali wartość 42 kDa dla AAT z prosa olbrzymiego. Wyznaczone masy cząsteczkowe w warunkach natywnych i denaturujących wskazują, że enzym jest dimerem. Pozostaje pytanie, dlaczego masy otrzymane w wyniku sączenia molekularnego są tak zróżnicowane. Możliwe, że ma na to wpływ odmienny kształt natywnych cząsteczek AAT z różnych źródeł. Dużą pomocą w ustaleniu przyczyn obserwowanych rozbieżności mogłoby okazać się porównanie wyników oznaczenia masy cząsteczkowej izoenzymów AAT z pszenicy metodą spektrometrii mas z masami tych białek wyliczonymi na podstawie poznanych sekwencji aminokwasowych.

Taniguchi i Sugiyama (1990) oznaczyli wartości stałej K_m wobec czterech substratów: asparaginianu, glutaminianu, α -ketoglutaranu i szczawiooctanu dla dwóch pasm AAT-1 i AAT-3 (bez rozdzielania alloenzymów) z liści prosa afrykańskiego (*Eleusine coracana*). Poszczególne pasma tylko w niewielkim stopniu różniły się wartościami tej stałej. Wyraźniejsze różnice w stałej K_m zaobserwowano między izoenzymami z 3 pasm (po 3 alloenzymy cytoplazmatyczne i chloroplastowe oraz 1 mitochondrialny) z liści prosa zwyczajnego (*Panicum miliaceum*) (Taniguchi i współ. 1995). Mitochondrialny izoenzym charakteryzował się niższymi wartościami K_m wobec substratów aminokwasowych w porównaniu z sześcioma pozostałymi (ibid.). Z kolei 3 formy chloroplastowe AAT wykazywały znacznie wyższe powinowactwo do oksokwasów niż ich homologi pochodzące z innych przedziałów komórkowych (ibid.). Stwierdzenie różnic w wartościach parametru k_{cat}/K_m (określa wydajność katalityczną enzymu w warunkach fizjologicznych) pomiędzy badanymi izoenzymami AAT z liści pszenicy stworzy okazję do wnioskowania na temat ich roli metabolicznej. Fakt otrzymania podobnych wartości stałej k_{cat} (określa wydajność katalityczną enzymu w warunkach pełnego nasycenia substratu) dla alloenzymów z jednego pasma pozytywnie zweryfikuje metodę densytometrycznej analizy zymogramów AAT w zastosowaniu do oceny poziomu biosyntezy tych białek enzymatycznych. Wreszcie zestawienie otrzymanych wartości współczynnika k_{cat}/K_m dla alloenzymów z 3 różnych przedziałów komórkowych (mitochondria, chloroplasty i cytoplazma) z poznanymi sekwencjami aminokwasowymi szczególnie w regionach konserwatywnych pozwoli na zidentyfikowanie możliwych różnic w budowie centrów aktywnych i określenie wpływu tych różnic na wydajność katalityczną.

Hart (1983) ustalił za pomocą analizy porównawczej zymogramów linii aneuploidalnych z liści pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*; $2n = 6x = 42$, AABBDD), że geny odpowiedzialne za biosyntezę izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej (AAT) znajdują się w trzech homeologicznych loci: na długich ramionach (ang. long, L) 3-ciej pary – 3AL, 3BL i 3DL; na długich ramionach 6-tej pary – 6AL, 6BL, 6DL oraz na krótkich (ang. short, S) ramionach 6-tej pary chromosomów – 6AS, 6BS, 6DS. Ponadto, wysunął on przypuszczenie o istnieniu dwóch kolejnych loci dla genów AAT (Hart 1983). W naszym laboratorium na zymogramie AAT z homogenatu z liści pszenicy zaobserwowaliśmy 3 pasma enzymatyczne (Maciąga i Paszkowski 2005) podobnie jak Taniguchi i współ. (1995) badający blisko spokrewnione z pszenicą proso (*Panicum miliaceum*).

W pewnym sensie sytuacja przypomina tę zstana u *Arabidopsis*. Na zymogramie AAT z homogenatu liści *Arabidopsis* obserwuje się tylko 3 izoenzymy (Schultz i Coruzzi 1995), a zidentyfikowano 5 różnych genów AAT (Wilkie i współ. 1996; Liepman i Olsen 2004). Sądzymy, że jeśli w genomie pszenicy rzeczywiście istnieje lokus 4 i 5, to najprawdopodobniej geny tam znajdujące się charakteryzuje niski poziom ekspresji i za pomocą zymogramów nie ma praktycznej możliwości ustalenia ich lokalizacji chromosomalnej. Jedynie zastosowanie metody hybrydyzacji Southerna z wykorzystaniem linii aneuploidalnych i delecyjnych pszenicy daje nadzieję na uzyskanie jednoznacznej odpowiedzi na pytanie dotyczące ogólnej liczby genów kierujących biosyntezą AAT i ich lokalizacji.

Qi i współ. (2004) ustalili w ten sposób lokalizację 7 104 EST-ów w tym 2 odpowiadających AAT (http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map_locus.cgi). Pierwszy EST o numerze BF473016 to fragment sekwencji o wysokim stopniu identyczności z sekwencją genu kodującego izoenzymy z pasma AAT-3 u prosa. Zmapowano go na 3BS (0.57-1.00), 3DS (0.24-1.00) i 3AL (0.42-0.78), gdzie liczby w nawiasach oznaczają część ramienia chromosomu w której występuje dany fragment zmapowanej sekwencji nukleotydowej. Drugi EST o numerze BE517715 można określić jako homolog genów tworzących pasmo AAT-2 u prosa i został on umiejscowiony na 6BS-Sat (http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map_locus.cgi). Należy podkreślić, że dane na temat lokalizacji chromosomalnej genów AAT zawierają pewne wymagające wyjaśnienia sprzeczności. Zdaniem Harta (1983) geny kodujące pasmo AAT-3 znajdują się na 3AL, 3BL i 3DL, natomiast metodą mapowania EST-ów zlokalizowano je na 3AL (0.42-0.78), 3BS (0.57-1.00) i 3DS (0.24-1.00) (http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map_locus.cgi). Z kolei zmapowanie EST-u o numerze BE517715 na 6BS-Sat (http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map_locus.cgi) nie potwierdza wyników Harta (1983), który podaje, że geny kodujące pasmo AAT-2 znajdują się na 6AL, 6BL i 6DL. Dodatkowych informacji na temat lokalizacji chromosomalnej genów AAT u pszenicy mogą dostarczyć genomowe mapy porównawcze pomiędzy tą rośliną a innymi blisko spokrewnionymi gatunkami. Dla przykładu, gen kodujący izoenzym cytoplazmatyczny znajduje się na chromosomie 1 u ryżu (Song i współ. 1996), natomiast u pszenicy występuje on na chromosomie 3 (Maciuga i Paszkowski 2004). Tę pozorną sprzeczność wyjaśnia fakt, że obydwa chromosomy są homologiczne względem siebie, tzn. poszczególne segmenty chromosomu u jednego z nich mają swoje odpowiedniki u drugiego (Munkvold i współ. 2004). A zatem, znając lokalizację chromosomalną genów AAT u ryżu (Song i współ. 1996) oraz *Arabidopsis* (Liepman i Olsen 2004) można wnioskować o ich lokalizacji u pszenicy.

Bardzo często aktualny poziom danego białka w komórce nie koreluje z poziomem odpowiadającego mu mRNA głównie ze względu na różną szybkość wymiany tych wysokocząsteczkowych związków. Tym niemniej do całościowej charakterystyki genów aminotransferazy asparaginianowej kodujących poszczególne białka izoenzymatyczne należy określenie poziomu właściwego im mRNA. Do tego celu doskonale nadaje się wprowadzona w ostatnich latach

metoda łańcuchowej reakcji polimeryzacji z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (ang. real-time RT-PCR). Pozwala ona dokładnie poznać liczbę kopii mRNA w badanych tkankach, radykalnie skraca czas oznaczenia i upraszcza je. W 2004 roku na podstawie analiz porównawczych zymogramów AAT wysunęliśmy hipotezę o niejednakowym poziomie biosyntezy pasm enzymatycznych pochodzących z trzech różnych przedziałów komórkowych: mitochondriów, chloroplastów i cytoplazmy (Maciąga i Paszkowski 2004). Pomiar mRNA metodą RT-PCR z analizą w czasie rzeczywistym pozwoli na jej zweryfikowanie.

4. Metodyka badań (co stanowi podstawę naukowego warsztatu wnioskodawcy i jak zamierza rozwiązać postawiony problem, na czym będzie polegać analiza i opracowanie wyników badań, jakie urządzenia [aparatura] zostaną wykorzystane w badaniach, czy wnioskodawca ma do nich bezpośredni dostęp i umiejętności obsługi).

Oczyszczanie izoenzymów AAT. Ze wstępnych doświadczeń przeprowadzonych w naszym laboratorium wynika, że izoenzymy AAT z liści siewek pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*) najlepiej jest oczyszczać w dwóch fazach. W pierwszej, po zastosowaniu wysalania $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i chromatografii na kolumnie z żelu Sephadex G-150, na kolumnie z DEAE-celulozy w liniowym gradiencie soli zostaną oddzielone od siebie 3 pasma enzymatyczne, a następnie osobno doczyszczane na specjalnie zsyntetyzowanej w tym celu kolumnie L-Ornityna-Sepharose 4B. Drugą fazę zastosowanej procedury oczyszczania stanowią będą jonowymienne chromatografie pasm AAT-1, AAT-2 i AAT-3 na kolumnie Protein-Pak Q 8HR podłączonej do zestawu HPLC. Okazuje się, że w odpowiednio wąskim zakresie liniowego gradientu soli udaje się oddzielić od siebie alloenzymy z danego pasma, które następnie można doczyścić za pomocą re-chromatografii na tej samej kolumnie w jeszcze węższym gradiencie soli. Dotychczas opracowana przez nas metoda oczyszczania 3 alloenzymów z pasma AAT-2 pozwala uzyskać z około 1 500 U w 500 g materiału roślinnego, co najmniej 20 U każdego z nich o współczynniku oczyszczenia wynoszącym powyżej 250. Aktualnie jesteśmy po etapie ustalania optymalnych zakresów dla gradientów stosowanych podczas oczyszczania alloenzymów z pasm AAT-1 i AAT-3.

Właściwości biochemiczne izoenzymów AAT oraz ich sekwencjonowanie przy użyciu spektrometrii mas. W trakcie poszczególnych etapów oczyszczania AAT aktywność enzymu będzie oznaczana ciągłą metodą spektrofotometryczną wg Bergmayera i Bernta (1974) a stężenie białka metodą Bradford (1976). Masa cząsteczkowa AAT w warunkach natywnych zostanie wyznaczona metodą sączenia molekularnego na kolumnie z żelu Sephadex G-150 przy zastosowaniu preparatu otrzymanego po etapie wysalania $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Oczyszczone izoenzymy zostaną poddane badaniom kinetycznym, tj. będą wyznaczone wartości stałej K_m wobec substratów: L-asparagianu i 2-oksoglutaranu oraz L-glutaminianu i szczawiooctanu a także wartości stałej k_{cat} dla reakcji w kierunku wprost i w kierunku odwrotnym. Dla 6

izoenzymów (po 2 z każdego z 3 pasm enzymatycznych), które są utworzone z dwóch identycznych podjednostek zostanie przeprowadzona elektroforeza w żelu poliakryloamidowym z SDS (Laemli 1970) w połączeniu z barwieniem srebrem prążków białkowych metodą Bluma i współ. (1987). Umożliwi to wyznaczenie masy cząsteczkowej w warunkach denaturujących. Ponadto, prążki zostaną wycięte i przesłane do Środowiskowego Laboratorium Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki w Warszawie (<http://mascot.proteom.pl>) w celu sekwencjonowania oraz oznaczenia dokładnej masy cząsteczkowej. Ustalone fragmenty sekwencji aminokwasowych izoenzymów AAT posłużą do identyfikacji odpowiadających im całych genów zrekonstruowanych na podstawie EST-ów zdeponowanych w komputerowych bazach danych GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>) i TIGR (<http://www.tigr.org/>). Następnie, zidentyfikowane geny zostaną porównane ze wszystkimi dostępnymi w bazach danych sekwencjami genów AAT.

Weryfikacja sekwencji kodujących izoenzymy AAT w oparciu o metodę RT-PCR. Za pomocą metody PCR na matrycy cDNA zostanie przeprowadzona amplifikacja fragmentów sekwencji nukleotydowych 3 genów AAT, po każdym z innego locus. Do zaprojektowania starterów posłuży program komputerowy Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Następnie będą one syntetyzowane w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów w Instytucie Biochemii i Biofizyki w Warszawie (<http://oligo.ibb.waw.pl>). Wielkość oraz stężenie zamplifikowanych fragmentów DNA zostanie sprawdzona elektroforetycznie w żelu agarozowym. Po oddzieleniu od składników mieszaniny reakcyjnej zostaną wysłane do sekwencjonowania (<http://oligo.ibb.waw.pl>) a wyniki skonfrontowane z sekwencjami zrekonstruowanymi na podstawie EST-ów.

Lokalizacja chromosomalna genów AAT za pomocą analizy porównawczej zymogramów. Lokalizacja chromosomalna genów AAT będzie przeprowadzona z użyciem linii aneuploidalnych i delecyjnych pszenicy pozbawionych chromosomów lub ich różnych fragmentów (Endo i Gill 1996). Materiał roślinny będzie pochodził od prof. T. Endo z Uniwersytetu w Kyoto w Japonii (<http://shigen.lab.nig.ac.jp/wheat/komugi/top/top.jsp>), skąd dotychczas uzyskaliśmy około 50 różnych linii. Wstępnie szacuje się, że do tych doświadczeń zostanie wykorzystanych 21 nullisomików, 9 ditelosomików i około 80 linii delecyjnych. Zymogramy zostaną wykonane przy użyciu sprawdzonej przez nas (Maciąga i Paszkowski 2004) metody Stejskala (1994).

Lokalizacja chromosomalna genów AAT za pomocą metody Southerna. Przy mapowaniu genów metodą Southerna (Qi i współ. 2004) liczba linii aneuploidalnych i delecyjnych pszenicy będzie zawężona do około 9 ditelosomików i 12 linii delecyjnych. Jako sondy do hybrydyzacji użyte zostaną fragmenty wszystkich genów AAT zamplifikowane metodą PCR na matrycy DNA genomowego. Sondy

będą znakowane metodą nieradioaktywną (<http://www.roche-applied-science.com>) sprawdzoną i stosowaną w Katedrze Biochemii Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW.

RT-PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym. Metoda RT-PCR z analizą w czasie rzeczywistym posłuży do ilościowego pomiaru kopii mRNA dla 3 wcześniej zamplifikowanych fragmentów genów AAT z liści pszenicy. Pomiary z uprzednio dobranymi i sprawdzonymi starterami zostaną przeprowadzone w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu SGGW na aparacie Light Cycler (Roche) zgodnie z wcześniej tam wypracowaną procedurą. Dostęp do aparatu został zapewniony. Jako kontrola poziomu ekspresji genów u pszenicy posłuży gen metabolizmu podstawowego kodujący podjednostkę 18 S rRNA.

Na wyposażeniu Katedry Biochemii Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW znajdują się 2 zestawy do chromatografii HPLC firmy Waters, zestaw do chromatografii niskociśnieniowej BioLogic firmy Bio-Rad, 2 spektrofotometry, ultrawirówka firmy Sorvall, 1 wirówka szybko obrotowa firmy Sigma oraz 3 firmy MPW na licencji firmy Sigma. Ponadto w ramach Katedry Biochemii funkcjonuje laboratorium biologii molekularnej wyposażone w aparaty do elektroforezy w żelu agarozowym, kamerę z laminarnym przepływem, piec hybrydacyjny, termo-blok, termocykler oraz zestaw z kamerą do analizy i dokumentacji żeli.

Główny wykonawca mgr inż. Marcin Maciąga jest absolwentem Międzywydziałowego Studium Biotechnologii SGGW o specjalności produkcja roślinna. Program studiów obejmował m.in.: zajęcia z biochemii (60 godz. ćwiczeń i 45 godz. wykładów), enzymologii (60/30), biologii molekularnej (60/30) i inżynierii genetycznej (120/45). Planowane w ramach niniejszego projektu badania są kontynuacją doświadczeń przeprowadzonych przez głównego wykonawcę w Katedrze Biochemii SGGW. Ich wyniki były podstawą do napisania pracy magisterskiej pt. „Analiza zymogramów aminotransferazy asparaginianowej u traw z rodzajów *Triticum* i *Aegilops*”, a następnie zostały opublikowane w Journal of Applied Genetics (Maciąga i Paszkowski 2004) – w czasopiśmie znajdującym się od 2005 roku na liście filadelfijskiej. W czasie ostatnich 2.5 lat poza pracą w ramach niniejszego projektu mgr M. Maciąga zdobywał doświadczenie badawcze uczestnicząc w innym temacie realizowanym w Katedrze Biochemii dotyczącym izoenzymów aminotransferazy L-alanina:2-oksoglutaran z liści *Arabidopsis thaliana*. Uzyskane wyniki pozwoliły na napisanie publikacji zaakceptowanej do druku w Acta Physiologiae Plantarum w 2006 roku (czasopismo z listy filadelfijskiej) z M. Maciąga jako współautorem

- 5. Wymierny, udokumentowany efekt podjętego problemu (zakładany sposób przekazu i upowszechniania wyników – publikacje naukowe oraz referaty na konferencjach w**

kraju i zagranicą, monografie naukowe, rozprawy doktorskie i habilitacyjne, nowe metody i urządzenia badawcze).

Wstępnie przewiduje się, że uzyskane w ramach niniejszego projektu wyniki posłużą do napisania 3 artykułów naukowych:

- Oczyszczanie izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej z liści pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.): Porównanie ich właściwości biochemicznych oraz identyfikacja odpowiadających im genów zrekonstruowanych na podstawie etykiet sekwencji ulegających ekspresji (EST).
- Lokalizacja chromosomalna genów kodujących izoenzymy aminotransferazy asparaginianowej za pomocą metody analizy porównawczej zymogramów oraz mapowania EST-ów metodą Southerna z wykorzystaniem linii delecyjnych pszenicy (*Triticum aestivum* L.).
- Badanie poziomu ekspresji genów kodujących izoenzymy aminotransferazy asparaginianowej u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) za pomocą łańcuchowej reakcji polimeryzacji z analizą w czasie rzeczywistym.

W czasie drugiego roku badań przewidziany jest udział w Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Praca będzie przedmiotem dysertacji doktorskiej głównego wykonawcy, mgr inż. Marcina Maciąga, pt. „Biosynteza izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”. Ponadto planuje się opracowanie terminologii izoenzymów, która mogłaby być opublikowana w czasopiśmie polskojęzycznym o charakterze popularno-naukowym, np. w Postęпах Biochemii.

Wykaz najważniejszej literatury dotyczącej problematyki wniosku.

Bergmayer HU, Bernt E (1974). Glutamate-oxaloacetate transaminase. W: Bergmayer HU, ed. Methods of enzymatic analysis: Vol. 2. Verlag Chemie Weinheim Academic Press: 727-732.

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8: 93-99.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.

Endo TR, Gill BS (1996). The deletion stocks of common wheat. J Hered 87: 295-307.

Gill BS i 14 współ. (2004). A workshop report on wheat genome sequencing: international genome research on wheat consortium. Genetics 168: 1087-1096.

Gregerson RG, Miller SS, Petrowski M, Gantt JS, Vance CP (1994). Genomic structure, expression and evolution of the alfalfa aspartate aminotranferase genes. Plant Mol Biol 25: 387-399.

Hart GE (1983). Hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). W: Tanksley SD i Orton TJ. Isozymes in plant genetics and breeding. Tom 2: 35-54.

- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki AB (1999). A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J* 13: 1796-1799.
- Karcicio M, Izbirak A (2003). Isozyme variations in some *Aegilops* L. and *Triticum* L. species collected from Central Anatolia. *Turk J Bot* 27 (6): 433-440.
- Kochkina VM (2004). Isolation, purification, and crystallization of aspartate aminotransferase from wheat grain. *Biochemistry (Moscow)* 69 (8): 897-900.
- Laemli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lazo GR i 40 współ. (2004). Development of an expressed sequence tag (EST) resource for wheat (*Triticum aestivum* L.): EST generation, unigene analysis, probe selection and bioinformatics for a 16,000-locus bin-delineated map. *Genetics*, 168 (2): 585-93.
- Liepmann AH, Olsen LJ (2004). Genomic analysis of aminotransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23 (1): 73-89.
- Maciaga M, Paszkowski A (2004). Genetic control of aspartate aminotransferase isoenzymes in *Aegilops* and *Triticum* species. *J Appl Genet* 45 (4): 411-417.
- Munkvold JD i 37 współ. (2004). Group 3 chromosome bin maps of wheat and their relationship to rice chromosome 1. *Genetics* 168: 639-650.
- Nomura M, Higuchi T, Katayama K, Taniguchi M, Miyao-Tokutomi M, Matsuoka M, Tajima S (2005). The promoter for C₄-type mitochondrial aspartate aminotransferase does not direct bundle sheath-specific expression in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol* 46 (5): 743-753.
- Numazawa T, Yamada S, Hase T, Sugiyama T (1989). Aspartate aminotransferase from *Panicum maximum* Jacq. var. trichoglume eyes, a C₄ plant: purification, molecular properties, and preparation of antibody. *Arch Biochem Biophys* 270 (1): 313-319.
- Orlacchio A, Scaramuzza E, Turano C (1975). Aspartate aminotransferase from wheat germ: purification and kinetic properties. *Ital J Bioch* 24 (2): 119-137.
- Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells R, Kenedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silverstone AL, Drake R (2005). Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature (London) Biotechnol* 23: 482-487.
- Qi LL i 44 współ. (2004). A chromosome bin map of 16,000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat. *Genetics* 168: 701-712.
- Schultz CJ, Coruzzi GM (1995). The aspartate aminotransferase gene family of *Arabidopsis* encodes isoenzymes localized to three distinct subcellular compartments. *Plant J* 7 (1): 61-75.
- Sentoku N, Taniguchi M, Sugiyama T, Ishimaru K, Ohsugi R, Takaiwa F, Toki S (2000). Analysis of the transgenic tobacco plants expressing *Panicum miliaceum* aspartate aminotransferase genes. *Plant Cell Reports* 19: 598-603.
- Shimoni Y, Blechl AE, Anderson OD, Galili G (1997). A recombinant protein of two high molecular weight glutenins alters gluten polymer formation in transgenic wheat. *J Biol Chem* 272 (24): 15488-15495.

- Song J, Yamamoto K, Shomura A, Yano M, Minobe Y, Sasaki T (1996). Characterization and mapping of cDNA encoding aspartate aminotransferase in rice, *Oryza sativa* L. DNA Research 3: 303-310.
- Stejskal J (1994). Aspartate aminotransferase isozymes in plants: comparison of two staining methods in polyacrylamide gels. Biol Plant 36: 359-364.
- Taniguchi M, Mori J, Sugiyama T (1994). Structure of genes that encode isozymes of aspartate aminotransferase in *Panicum miliaceum* L., a C₄ plant. Plant Mol Biol 26: 723-734.
- Taniguchi M, Sugiyama T (1990). Aspartate aminotransferase from *Eleusine coracana*, a C₄ plant: purification, characterization, and preparation of antibody. Arch Biochem Biophys 282 (2): 427-432.
- Verjee Z HM, Evered DF (1969). Purification and some properties of aspartate aminotransferases from wheat germ. Biochim Biophys Acta 185: 103-110.
- Wilkie SE, Lambert R, Warren MJ (1996). Chloroplastic aspartate aminotransferase from *Arabidopsis thaliana*: an examination of the relationship between the structure of the gene and the spatial structure of the protein. Biochem J 319: 969-976.

E) HARMONOGRAM WYKONANIA PROJEKTU BADAWCZEGO – PLAN ZADAŃ

Lp.	Nazwa zadania badawczego	Termin rozpoczęcia*/	Przewidywane koszty (zł)
		----- – zakończenia*/ zadania	
1	2	3	4
1.	Opracowanie metod oczyszczania izoenzymów AAT z liści siewek pszenicy.	1 ÷ 4	7 000
2.	Sekwencjonowanie 6-ciu homodimerycznych alloenzymów metodą spektrometrii mas z zastosowaniem techniki LC/MS/MS. Wyznaczenie niektórych parametrów kinetycznych (K_m , k_{cat}) oczyszczonych izoenzymów AAT. Oznaczenie ich mas cząsteczkowych w warunkach natywnych i denaturujących.	5 ÷ 6	12 500
3.	Weryfikacja sekwencji kodujących izoenzymy AAT w oparciu o metodę RT-PCR.	7 ÷ 10	11 500
4.	Lokalizacja chromosomalna genów AAT za pomocą analizy porównawczej zymogramów.	11 ÷ 12	2 600
5.	Lokalizacja chromosomalna genów AAT za pomocą metody Southerna.	13 ÷ 16	6 900
6.	RT-PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym.	17 ÷ 20	6 500
7.	Opracowanie wyników i obrona pracy doktorskiej.	21 ÷ 24	3 000
RAZEM			50 000

*/ Podać liczbę miesięcy liczonych od faktycznego terminu rozpoczęcia projektu

F) KOSZTORYS PROJEKTU BADAWCZEGO

1. Poszczególne pozycje kosztorysu w cenach bieżących (zł)

Lp.	Treść	Planowane koszty w roku				
		2007	2008			Razem
1	2	3	4	5	6	7
1	Koszty bezpośrednie, w tym:	28 000	13 667			41 667
	1/ Wynagrodzenia z pochodnymi	5 000	5 667			10 667
	2/ Inne koszty realizacji projektu (łącznie z kosztem zakupu lub wytworzenia aparatury naukowo - badawczej)	23 000	8 000			31 000
2	Koszty pośrednie	5 600	2 733			8 333
3	Koszty ogółem finansowane ze środków finansowych na naukę (1+2)	33 600	16 400			50 000
4	Koszty ogółem finansowane z innych źródeł niż środki finansowe na naukę	–	–			–
5	Koszty ogółem (3+4)	33 600	16 400			50 000

2. Kalkulacja poszczególnych pozycji kosztorysu

1) Wynagrodzenia z pochodnymi

Liczba osób przewidzianych do udziału w realizacji projektu – 2 osoby:

Kierownik projektu – 24 osobomiesiące, bez wynagrodzenia;

Główny wykonawca projektu – 24 osobomiesiące, umowa o dzieło.

2) Opis planowanych zakupów lub wytworzenia aparatury naukowo-badawczej.

Zakupy aparatury nie są planowane, ponieważ Katedra Biochemii dysponuje niezbędnym sprzętem do realizacji ww. zadań.

3) Uzasadnienie wysokości planowanych innych kosztów realizacji projektu (wymienić rodzaj kosztów, wysokość oraz ich powiązanie z planem zadań projektu).

Materiały i przedmioty nietrwale. Kwota ogółem: 26 500 zł

Ad. 1. Opracowanie metod oczyszczania izoenzymów AAT z liści siewek pszenicy: ok. 4 000 zł.

Membrany PM-30 do zagęszczania w małym i dużym aparacie typu Amicon (2 000 zł). Złoże do chromatografii niskociśnieniowej, np. DEAE-celuloza, czy Sephadex (1 000 zł). Probówki

do kolektora, ependorfy, tipsy do pipet automatycznych, naczynka laboratoryjne (500 zł). Odczynniki (500 zł): m.in. siarczan amonu, tris, kwas solny, chlorek potasu.

Ad. 2. Wyznaczenie niektórych parametrów kinetycznych (K_m , k_{cat}) oczyszczonych izoenzymów AAT. Oznaczenie ich mas cząsteczkowych w warunkach natywnych i denaturujących: ok. 7 500 zł.

Odczynniki do wyznaczenia stałych K_m : L-asparaginian, 2-oksoglutaran, L-glutaminian i szczawiooctan (500 zł) oraz pomiaru aktywności tego enzymu: NADH (1 000 zł), dehydrogenaza jabłczanowa (1 000 zł) i dehydrogenaza glutaminianowa (500 zł) dla reakcji w odwrotnym kierunku. Odczynniki do przeprowadzenia elektroforezy natywnej i w warunkach denaturujących (1 500 zł): roztwór akryloamidu, TEMED, nadsiarczan amonu, SDS, glicyna. Wzorce mas cząsteczkowych do sączenia molekularnego oraz SDS-PAGE (2 000 zł). Sączki w probówkach ependorfa do zagęszczania prób przy małej objętości (500 zł). Inne odczynniki (500 zł): m.in. odczynnik Bradford – barwienie białka, metoda srebrzenia białek: azotan srebra, aldehyd mrówkowy, tiosiarczan sodowy, węglan sodu.

Ad. 3. Weryfikacja sekwencji kodujących izoenzymy AAT w oparciu o metodę RT-PCR: ok. 6 500 zł.

Odczynniki do izolacji RNA (1 000 zł): fenol, chloroform, chlorek litu. Odczynniki do RT-PCR (3 000 zł): odwrotna transkryptaza, DNA polimeraza, dNTP. Elektroforeza RNA/DNA (1 000 zł): agaroz, formamid, bromek etydy. Wzorce mas cząsteczkowych do elektroforezy kwasów nukleinowych (500 zł). Zestaw do oczyszczania produktów reakcji PCR (1 000 zł).

Ad. 4. Lokalizacja chromosomalna genów AAT za pomocą analizy porównawczej zymogramów: ok. 1 500 zł.

Odczynniki potrzebne do wywoływania aktywności enzymu na żelu: kwas cysteino sulfiny (1 000 zł), MTT (250 zł) oraz m-PMS (250 zł).

Ad. 5. Lokalizacja chromosomalna genów AAT za pomocą metody Southerna: ok. 3 500 zł.

Zestaw odczynników do znakowania digoksygeniną i wywoływania tej aktywności (2 000 zł) oraz filtr nylonowy do transferu (1 500 zł).

Ad. 6. RT-PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym: ok. 3 500 zł.

Zestaw odczynników do RT-PCR z analizą w czasie rzeczywistym (2 000 zł) i kapilary do tego aparatu (1 500 zł).

Usługi obce. Kwota ogółem: 3 500 zł

Ad. 1. Sekwencjonowanie 6-ciu homodimerycznych alloenzymów metodą spektrometrii mas z zastosowaniem techniki LC/MS/MS: ok. 2 000 zł.

Koszt pojedynczej analizy na spektrometrze mas w celu ustalenia sekwencji aminokwasowych polipeptydów badanego białka, to 250 zł. W ramach projektu planuje się wykonanie 6 takich analiz

(6 x 250 zł = 1 500 zł) oraz około 4 w celu ustalenia dokładnych mas cząsteczkowych (4 x 80 zł = 320 zł). Zatem całkowite koszty tej usługi nie powinny przekroczyć 2 000 zł.

Ad. 3. Weryfikacja sekwencji kodujących izoenzymy AAT w oparciu o metodę RT-PCR: ok. 1 500 zł.

Synteza jednej pary starterów (~20 nukleotydów) do reakcji PCR, to koszt około 100 zł. W ramach planowanych doświadczeń konieczna będzie synteza 3 par starterów dla 3 różnych genów AAT, po jednym z każdego przedziału subkomórkowego. Ponieważ te same startery będą wykorzystywane również w metodzie RT-PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym, dlatego też całkowity koszt syntezy starterów szacuje się na około 1 000 zł.

Z kolei koszt sekwencjonowania produktu reakcji PCR (500 – 800 nukleotydów), to 39 zł za reakcję. Zatem dla 3 planowanych sekwencjowań produktów reakcji PCR koszty nie powinny przekroczyć sumy 500 zł.

Inne koszty bezpośrednie. Kwota ogółem: 1 000 zł

Ad. 7. Opracowanie wyników i obrona pracy doktorskiej.

Drobne materiały biurowe (tusze do drukarki, papier, itp.) potrzebne do opracowania wyników (obrona pracy doktorskiej, publikacje). Udział w Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

G) OŚWIADCZENIA I PODPISY

1. Oświadczam, że zapoznałem się z wnioskiem o finansowanie projektu badawczego pt. „Biosynteza izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”
 2. W przypadku przyjęcia projektu badawczego do finansowania jednostka zobowiązuje się do:
 - włączenia projektu do planu zadaniowo-finansowego jednostki;
 - udostępnienia pomieszczeń, aparatury i obsługi administracyjno-finansowej;
 - zatrudnienia pracowników niezbędnych do realizacji projektu na podstawie uzgodnionej z kierownikiem projektu i właściwymi wykonawcami formy zatrudnienia (mianowanie, umowa o pracę, umowa o dzieło, umowa zlecenia);
 - sprawowania nadzoru nad realizacją projektu i prawidłowością wydatkowania środków finansowych.
 3. Oświadczam, że jednostka nie może zapewnić dostępu do urządzeń wymienionych w wykazie aparatury w części F ust. 2 pkt 2.
 4. Oświadczam, że projekt obejmuje badania¹⁾:
 - ~~wymagające doświadczeń na zwierzętach¹⁾~~
 - ~~nad gatunkami chronionymi lub na obszarach objętych ochroną¹⁾~~
 - ~~nad organizmami genetycznie modyfikowanymi lub z zastosowaniem takich organizmów¹⁾~~
- ~~Do wniosku dołączono dokumenty określone w § 31 ust. 5, 6 i 7¹⁾ rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 4 sierpnia 2005 r. w sprawie kryteriów i trybu przyznawania i rozliczania środków finansowych na naukę~~
5. Oświadczam, że zgodnie z moją wiedzą przygotowany wniosek o finansowanie projektu badawczego nie narusza praw osób trzecich.

H) INFORMACJE O OSOBIE ODPOWIEDZIALNEJ ZA SPORZĄDZENIE WNIOSKU

Imię i nazwisko, telefon, fax, e-mail: Dr hab. Andrzej Paszkowski, prof. nadzw. SGGW;

Tel. 022 593 25 68; Fax 022 593 25 62; E-mail: andrzej_paszkowski@sggw.pl

Wniosek sporządzono w dniu 25.07.2006 r.

Pieczęć jednostki	Kierownik jednostki (Rektor/Dyrektor)	Główny księgowy/Kwestor	Kierownik projektu
Data	podpis i pieczęć	podpis i pieczęć	podpis

Warszawa, dn. 25.07.2006 r.

Oświadczenie

Oświadczam, że nie będę uczestniczył w kosztach realizacji projektu badawczego pt. „Biosynteza izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”.

Kierownik projektu

Dr hab. Andrzej Paszkowski, prof. nadzw. SGGW

Warszawa, dn. 25.07.2006 r.

Oświadczenie

Oświadczam, że w skład zespołu wykonawców projektu pt. „Biosynteza izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)” poza doktorantem i promotorem wchodzi tylko personel pomocniczy.

Kierownik projektu

Dr hab. Andrzej Paszkowski, prof. nadzw. SGGW