


Toruń 1. 09. 2009r.



Prof. dr hab. Michał Komoszynski
Kierownik Zakładu Biochemii
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
87-100 Toruń ul. Gagarina 9.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Marcina Maciąga p.t.

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

W powyższej pracy przedstawiono rezultaty badań nad biochemią i genetyką aminotransferazy asparaginianowych pszenicy (AAT). Badania te są kontynuacją wcześniejszych prac doktoranta nad AAT pszenicy. Zakład Biochemii Roślin SGGW jest wiodącą w Polsce pracownią, która od trzech pokoleń analizuje budowę, właściwości fizykochemiczne i funkcję aminotransferaz roślinnych.

W komórkach roślin aminotransferaza asparaginianowa (AAT) jest niezwykle ważnym składnikiem metabolizmu aminokwasów. Enzym ten dostarcza komórkom roślin α -ketoglutaranu substratu niezbędnego do wiązania azotu. Powstający w tej reakcji asparaginian jest metabolitem pośrednim w procesie syntezy asparaginy i prekursorem innych aminokwasów. Jest również prekursorem intermediatów uczestniczących w transporcie związków azotowych, oraz metabolitów w komórkach roślin C_4 . AAT zaliczany do dużej rodziny enzymów, których proces transferu grupy aminowej wymaga obecności w strukturze cząsteczki enzymu fosforanu pirodoksalu.

Oceniana rozprawa ma klasyczny układ treści zawiera 8 rozdziałów (od rozdziału „Wykaz skrótów” do rozdziału „Literatura”). Obejmuje 77 stron maszynopisu, 26 rycin i 4 tabele.

W przeciwieństwie do tytułu w rozdziale „Cel pracy” przedstawiono aż pięć odrębnych celów tych badań.

Po pierwsze - Autor zamierzał określić całkowitą liczbę genów kodujących aminotransferazę asparaginianową (AAT) znajdujących się w genomie pszenicy zwyczajnej;

Po drugie - Lokalizację chromosomalną tych genów;

Po trzecie - Poznać sekwencję nukleotydową cDNA aminotransferaz asparaginianowych;

Po czwarte - Określić poziom ich ekspresji w komórkach;

Po piąte - Zbadać właściwości fizykochemicznych enzymów izolowanych z komórek pszenicy.

Pierwsze cztery z tych celów związane są z tytułem pracy, natomiast ostatni stanowi dodatkowy element opisujący właściwości izoenzymów AAT.

Wstęp pracy jest obszerny. Obejmuje klasyfikację AAT, ekspresję genów tych enzymów oraz lokalizację chromosomalną i subkomórkową, jak również właściwości molekularne i kinetyczne izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej. Cennym elementem tej części pracy jest opis budowy centrum aktywnego. Wydaje się Jednak stwierdzenie, iż tylko zmiany w sekwencji aminokwasowej fragmentów łańcucha leżących blisko centrum katalitycznego są przyczyną odmiennych parametrów kinetycznych enzymu, jest zbyt daleko idące. AAT są aktywne w formie dimeru, więc na wiązanie substratu i proces katalizy mogą również wpływać aminokwasy leżące na powierzchniach styku obu podjednostek. Wskazują na to wyraźne różnice w parametrach kinetycznych w odniesieniu do dimerów $\alpha\alpha$ - AAT-3c i $\alpha\beta$ - AAT-3b.

W rozdziale tym znalazłem pewne nieścisłości. 1/ polska nazwa ang. *superfamily* oznacza nadrodzinę. Klasyfikacja AAT uwzględniająca jej strukturę przestrzenną zalicza ten enzym do 4 Klasy białek (nie zespołu) o strukturze α i β ($\alpha+\beta$). W obrębie tej klasy znajduje się 147 nie 141 nadrodzin. AAT należy do nadrodziny *transaminaz zależnych od fosforanu pirydoksalu*.

W dalszej części tego rozdziału autor w wyczerpujący sposób omawia dotychczasowe badania dotyczące liczby loci i lokalizacji chromosomalnej genów AAT roślinnych. Omawiając lokalizację subkomórkową tych enzymów w jasny sposób przedstawia metody identyfikacji wykorzystujące ruchliwość elektroforetyczną tych białek, oraz różnice w aktywności izoform. Sugeruje jednocześnie, że intensywność pasm barwnych uzyskanych w wyniku oznaczenia aktywności poszczególnych izoenzymów rozdzielonych podczas elektroforezy AAT na żelu poliakrylamidowym wiąże się z *wydajnością katalityczną*, a ta z *poziomem biosyntezy* tych białek. Autor słusznie stwierdza, że koniecznym warunkiem dla prawdziwości powyższego stwierdzenia jest podobna *wydajność katalityczna* każdego z izoenzymów. Proszę Autora o wyjaśnienie co oznacza termin **wydajność katalityczna** i jak była ona oznaczana?

Autor używa również terminów *presekwencja* oraz aminokwasy wykazują tendencję do *tworzenia układu heliakalnego*. Bardzo prosiłbym o wyjaśnienie obu terminów.

Rozdział - Materiał i metody

Autor do badań używał pszenicy odmiany „Jasna” oraz trzy linie aneuploidalne i 4 linie delecyjne pszenicy odmiany „Chinese Spring”. Materiał ten okazał się niezwykle przydatny w badaniach dotyczących chromosomowej lokalizacji genów AAT. Użycie takich roślin do badań wskazuje, że wybór tego materiału był starannie przemyślany, jak również, że autor posiada doskonały przegląd dotychczas prowadzonych badań nad biochemią i genetyką pszenicy.

Metody analityczne stosowane w prezentowanych w tej pracy badaniach obejmują szereg nowoczesnych technik stosowanych w klasycznej biochemii, oraz powszechnie wykorzystywanych w biotechnologii. Z tych ostatnich na szczególną uwagę zasługuje technika PCR RT pozwalająca na analizę ilościową syntezy badanego genu, oraz technika Southern blot. Z opisu przedstawionego w kolejnych podrozdziałach wynika, że autor nie tylko wykonał końcowe analizy, ale również samodzielnie przygotował materiał niezbędny do PCR oraz syntetyzował sondy niezbędne w tej technice. Świadczy to, że doktorant zna nie tylko cel i możliwości stosowana tych metod, ale opanował całą eksperymentalną ich część.

Twierdzę więc, że Autor nie tylko posiada informacje o nowoczesnych metodach analizy materiału biologicznego ale stosuje je w praktyce.

W odniesieniu do tego rozdziału mam również kilka uwag, które jak sądzę, ułatwiają przygotowanie publikacji. 1/ w opisie przygotowywania homogenatu z siewek brakuje ilości buforu stosowanego do homogenizacji określonej masy materiału roślinnego -Rozdz. 4.1. 2/ nie używamy określenia „jako bufor kolumny czy buforze kolumny” lepiej - do kondycjonowania i przemywania kolumny stosowano bufor... 3/ Brak jest opisu metody identyfikacji poszczególnych izoenzymów AAT2 i AAT3 podczas chromatografii na DEAE-celulozie. Stosowana technika rozdziału na kolumnie Q 8HR to chromatografia średniociśnieniowa, a nie HPLC. Niezręczne jest również sformułowanie - „wyczerpująco dializowano” - lepiej dializowano przez noc x- krotnie zmieniając bufor Rozdział 4.2.

Rozdział – Wyniki

Przygotowane przez Autora dla metody Southern specyficzne sondy (znakowane dogoksygeniną) względem DNA genów kodujących izoenzymy AAT wykorzystano do analizy liczby tych genów w genomie pszenicy odmiany Jasna. Eksperyment ten wykazał, że w jądrowym DNA pszenicy znajdują się tylko trzy geny izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej kodujące AAT cytozoolową, chloroplastową i mitochondrialną. Uzyskane w tych analizach wyniki nie budzą wątpliwości.

Autor do lokalizacji chromosomalnej genów kodujących AAT wykorzystał linie delecyjne uzyskane z odmiany Chinese Spring. Delecja określonego fragmentu chromatyny skojarzona z brakiem lub obecnością określonego pasma na zymogramach AAT uzyskanych w wyniku elektroforezy cytoplazmatycznych i chloroplastowych form AAT pozwalała wnioskować o lokalizacji tych genów na chromosomie.

Wybór materiału i użyte techniki wskazują na b. dobre przygotowanie merytoryczne doktoranta. Eksperymenty te pozwalały bowiem, stosując stosunkowo proste techniki badawcze, na określenie części chromosomów, w których znajdują się loci badanych izoenzymów AAT. Rezultaty tych badań pozwoliły uściślić wyniki wcześniejszych badań. Dowiodły one, że geny cytoplazmatyczne AAT znajdują się w rejonie 0,42 - 0,61 długich ramion chromosomu z diploidalnego genomu A i w rejonie 0,38 - 0,41 genomu B oraz rejonu 0,23 - 0,81 genomu D, podczas gdy geny chloroplastowe umiejscowione są na krótkich ramionach 6 chromosomu genomu A.

W dalszej części tego rozdziału Autor badał zależność między ilością genów kodujących podjednostki α i β , a ilością DNA kodującego obie podjednostki i aktywnością poszczególnych izoenzymów AAT cytoplazmatycznych. Materiałem stosowanym w tych badaniach były aneuploidalne linie pszenicy odmiany Chinese Spring. Badania prowadzono stosując analizę densytometryczną ilości produktów wytworzonych przez izoenzymy rozdzielone elektroforetycznie. Intensywność tych pasm analizowano z udziałem programu komputerowego. Uzyskane w ten sposób wyniki porównano z aktywnością genu mierzoną techniką PCR RT.

Rezultaty uzyskane dla różnych aneuploidów na podstawie pomiarów intensywności pasm na zymogramach Autor porównał z teoretycznie wyliczonym rozkładem intensywności zabarwienia pasm reprezentujących poszczególne izoenzymy. Rezultatem tych badań jest stwierdzenie, iż podjednostka α w diploidalnym genomie A jest kodowana z 3 - krotnie większą częstotliwością niż podjednostka β diploidalnych genomów B i D. Warunkiem poprawności tych wniosków jest założenie, iż częstotliwość syntezy podjednostek α i β jest taka sama. Chciałbym zwrócić uwagę na fakt, że na zymogramach oznaczamy aktywność enzymu, a ta nie zawsze zależy od ilości cząsteczek enzymu tylko od jego aktywności

właściwej. Oznacza to, że mała ilość cząsteczek o wysokiej sprawności katalitycznej utworzy intensywniejsze pasmo na zymogramie od dużej liczby cząsteczek o niskiej aktywności właściwej. Czy Autor oznaczał aktywność właściwą poszczególnych izoenzymów po elektroforezie?

Jakkolwiek ta część pracy jest dobrze udokumentowana, to ogromnym ułatwieniem analizy i oceny wyników przez recenzenta byłoby umieszczenie w niej w okolicach prezentowanych zymogramów wyników analizy komputerowej intensywności pasm. Prezentowane zdjęcia zymogramów nie pozwalają na ich precyzyjną ocenę.

Analizę PCR RT wykonano w celu wyjaśnienia jak często są kopiowane geny podjednostki α i β . Rezultaty tej analizy wykazały, iż linie aneuploidalne zawierające dużą ilość podjednostek α syntetyzują większe ilości DNA w jednostce czasu niż te zawierające więcej podjednostek β . Rezultat ten wskazuje, że teza o wyższej ekspresji podjednostki α w porównaniu do β jest uprawniona. W tej części poprawienia wymaga Ryc. 16, bowiem nie zgadza się z informacją ze strony 47/48, która brzmi „By lepiej zobrazować, (że linie aneuploidalne zawierają więcej kopii podjednostki α), linie aneuploidalne umieszczono na Ryc. 16 zgodnie z ilością kopii genów kodujących podjednostkę α ”, natomiast na tej rycinie linię M3A o jednej kopii podjednostki α umieszczono przed linią Dt3DS zawierającą dwie kopie tego genu.

Bardzo istotną i cenną częścią tej pracy jest opracowana metoda oczyszczania izoenzymów AAT pasm chloroplastowych i mitochondrialnych. Pozwoliła ona na uzyskanie analizowanych izoenzymów w takim stopniu czystości, który pozwolił na analizę podstawowych parametrów kinetycznych wszystkich badanych izoenzymów AAT pszenicy. Jest to pierwsza praca, która w tak kompleksowy sposób wyznaczyła fizyko-chemiczne parametry roślinnych AAT.

Separacja poszczególnych izoenzymów pozwoliła również na analizę ich sekwencji aminokwasowej z udziałem spektrometru masowego. Uzyskane wyniki potwierdziły obecność izoenzymów chloroplastowych i mitochondrialnych w **częściowo !!!** oczyszczonych preparatach otrzymanych z odmiany pszenicy „Jasna”.

W tej części pracy moje zastrzeżenie budzi sposób obliczania k_{cat} . Autor użył do obliczeń masy molekularnej aktywnego izoenzymu jednej podjednostki, a aktywną katalitycznie formą tych enzymów jest dimer.

Rozdział - Dyskusja

Dyskusja jest obszerna, obejmuje 10 stron. Autor omawia w tej części większość istotnych dla pracy wyników w odniesieniu do rezultatów badań uzyskanych przez innych autorów. Moim zdaniem część tej dyskusji jest powtórzeniem ocen zawartych w rozdziale „Wyniki”. Jednym z bardziej interesujących fragmentów tej części pracy jest próba wyjaśnienia różnic w wartościach kinetycznych k_{cat} (liczba obrotów) i kryterium k_{cat}/K_M enzymów cytoplazmatycznych i chloroplastowych AAT pszenicy (chciałbym zwrócić uwagę autorowi, że stałą Michaelisa oznaczamy jako K_M a nie k_m). Autor posługując się literaturą i wynikami uzyskanymi po sekwencjonowaniu fragmentów izoenzymów chloroplastowych i mitochondrialnych sugeruje, że 20-krotnie wyższa liczba obrotów izoenzymów chloroplastowych (k_{cat}) oraz wartość k_{cat}/K_M w odniesieniu do cytoplazmatycznych wynika z u obecności w centrum aktywnym enzymów chloroplastowych lizyny 383 zamiast lizyny 258. Jednak moim zdaniem właściwą odpowiedź na to pytanie uzyskać można tylko w następstwie rozwiązania struktury przestrzennej obu izoenzymów.

Rozdział - Wnioski

Większość przedstawionych w tym rozdziale wniosków to nie wnioski a obserwacje. Ten rozdział to raczej podsumowanie uzyskanych wyników, a nie ważne i istotne wnioski wypływające z rezultatów tej pracy.

Rozdział - Literatura

- obejmuje 71 pozycji w dużej mierze z ostatnich 20 lat. Większość z tych prac dotyczy aminotransferaz asparaginianowych.

Podsumowując

Recenzowana praca „Biosynteza izoenzymów amin aminotransferazy asparaginianowej u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)” przygotowana przez pana mgr Maciąga zawiera szereg nowych informacji dotyczących biochemii aminotransferaz asparaginianowych, a stosowane w tych badaniach metody są nowoczesne i adekwatne do zaprojektowanych doświadczeń. Mogę również stwierdzić, że Autor zrealizował wszystkie założone w tej pracy cele badawcze.

Biorąc powyższe po uwagę stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach i tytule naukowym, w związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie o dopuszczenie pana mgr Marcina Maciąga do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Toruń 1. 09. 2009 r.

Mieczysław Kowalski