

Warszawa 12.09.2009r

**Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Biosynteza izoenzymów transferazy asparaginianowej u pszenicy zwyczajnej *Triticum aestivum* L” wykonanej przez mgr Marcina Maciąga pod kierunkiem dr hab. prof. SGGW Andrzeja Paszkowskiego.**

### **1. Uwagi ogólne**

Przemiany azotowe zwane także gospodarką azotem są jedną z kluczowych cech organizmów żywych mającą także znaczące implikacje praktyczne. Z kolei indywidualna charakterystyka tych przemian u poszczególnych gatunków jest zależna od zapisu w informacji genetycznej o składnikach uczestniczących w przemianach azotowych. Jednym z takich składników białkowych jest enzym o nazwie transferaza asparaginianowa ( AAT), który katalizuje odwracalną reakcję przeniesienia grupy aminowej z L-asparaginianu na 2-oxoglutaran. Tenże enzym i kodujące go sekwencje DNA u pszenicy są przedmiotem badań przeprowadzonych w ramach rozprawy mgr Marcina Maciąga.

Autor postawił sobie za cel, że określi liczbę wszystkich genów kodujących transeferazę asparaginianową u pszenicy zwyczajnej oraz określi ich sekwencje na poziomie cDNA, a także ustali ekspresję na poziomie mRNA i scharakteryzuje właściwości biochemiczne poszczególnych izoenzymów. Problematyka powyższa jest bardzo aktualna w sferze poznawczej i wpisuje się w priorytety Krajowego Programu Badań Naukowych i Prac Rozwojowych. Z tych powodów temat pracy należy uznać za jak najbardziej uzasadniony.

### **2. Dane formalne o rozprawie**

Rozprawa liczy 78 stron ponumerowanych, a jej treść została podzielona na 8 rozdziałów. Układ pracy jest typowy dla prac eksperymentalnych z tego zakresu. W treść jest wkomponowanych 26 rysunków (składają się na to fotografie żeli, schematy i porównania sekwencji DNA i aminokwasów) oraz 4 tabele. W rozprawie są 2 rysunki o numerze 25 (strona 56 i 60), ale odmiennej zawartości, a strona 44 została błędnie zamieszczona po stronie 39. Literatura zawiera 72 pozycje.

### **3. Ocena rozprawy**

Pszenica zwyczajna jest gatunkiem alloheksaploidalnym, co skutkuje między innymi złożonością genetyczną, dużym genomem i efektami związanymi ze stanem zwanym homeologicznym. Rodzi to spore utrudnienia w badaniach molekularnych nad genomem pszenicy, ale jednocześnie umożliwiło stworzenie (jak w żadnym innym gatunku) zestawów linii aneuploidalnych pozbawionych pojedynczych chromosomów lub ich fragmentów i otworzyło możliwości dość precyzyjnych badań nad lokalizacją i efektami działania poszczególnych chromosomów i genów. Mgr Maciąga doskonale wykorzystał ten fakt do odpowiedzi na jedno z podstawowych pytań jakie zawarł w celu rozprawy. Doświadczenia prowadzone w ramach eksperymentalnej części rozprawy są bardzo dobrze przemyślane i zaplanowane stosownie do aktualnego stanu wiedzy. Materiał biologiczny dobrano w taki sposób, aby możliwa była weryfikacja różnych hipotez dotyczących lokalizacji genów aminotransferazy asparaginianowej. Z kolei o wyborze metod molekularno-biologicznych i biochemicznych decydowała ich przydatność do identyfikacji genomowej oraz zbadanie ekspresji i właściwości biochemicznych poszczególnych izoenzymów. Uwzględniono także stan własnego warsztatu badawczego i możliwości kooperacji. Chciałbym podkreślić, że realizacja części eksperymentalnej wymagała od Autora (poza opanowaniem warsztatu molekularno-biochemicznego) biegłości w korzystaniu z różnorodnych baz danych i znajomości elementów programowania molekularnego. Dobrą wizytówką dla tych umiejętności jest takie zaprogramowanie starterów dla sekwencji kodujących w reakcji PCR, że możliwe było uzyskanie produktu odpowiadającego jednemu egzonowi.

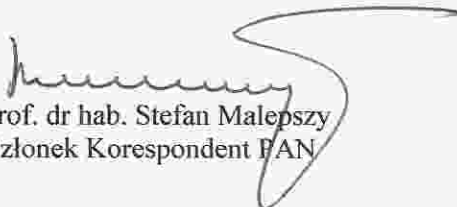
Rozprawa jest napisana zwięźle i przystępnie, a wyniki są zinterpretowane poprawnie z zachowaniem należytej ostrożności. Literatura jest dobrana trafnie, z zachowaniem umiaru co do ilości pozycji. W kilku kwestiach Autor uzyskał dane weryfikujące dotychczasowe poglądy. Na przykład co do lokalizacji chromosomowej genów kodujących AAT doszedł do konkluzji wyjaśniających niezgodności panujące w literaturze. I tak w odniesieniu do genów chloroplastowej AAT potwierdził pogląd o ich lokalizacji w krótkim a nie długim ramieniu chromosomu szóstego, a w przypadku genów mitochondrialnej AAT wyraził nową sugestię o występowaniu nie jednej, lecz dwóch rodzajów podjednostek i podważył pogląd o lokalizacji odpowiadających im genów na krótkim ramieniu chromosomu szóstego. Z kolei w odniesieniu do ekspresji genów Autor doszedł do wniosku o różnicy w poziomie ekspresji genów podjednostki  $\alpha$  cytoplazmatycznej AAT znajdujących się w genomie A w stosunku do genów znajdujących się w genomach B i C oraz wskazał na bezpośrednią korelację ilości mRNA ze zmianami w ilości syntetyzowanego enzymu. W stosunku do właściwości biochemicznych Autor wyznaczył także, po raz pierwszy u pszenicy, parametr kinetyczny cząsteczki zwany liczbą obrotów dla alloenzymów chloroplastowych i cytoplazmatycznych i wykazał, że dla tych pierwszych wielkości te są zbliżone do dotychczas opisanych, natomiast dla alloenzymów cytoplazmatycznych znacznie odbiegają od danych literaturowych.

W dyskusji dokonano także porównań niektórych charakterystyk uzyskanych przez Autora dla pszenicy z pokrewnymi gatunkami zbożowymi, co dostarcza ciekawych danych porównawczych i wzbogaca rozprawę. Zestawienia te wykonano dla takich kluczowych danych jak: sekwencje aminokwasowe rejonów cząsteczki związanych z centrum aktywnym alloenzymów aminotransferazy asparaginianowej, właściwości kinetyczne izoenzymów frakcji chloroplastowej i cytoplazmatycznej aminotransferazy asparaginianowej oraz porównanie lokalizacji chromosomalnych genów kodujących wszystkie 3 typy transferazy asparaginianowej - cytoplazmatyczną chloroplastową i mitochondrialną u pszenicy uzyskanych przez różnych autorów różnymi metodami.

Nie mam zasadniczych uwag do rozprawy, a te które wyrażam mają charakter wyłącznie porządkujący i formalny. Są one następujące : 1. Używanie jednej formy liczebnika w przypadkach gdy należy użyć imiesłowu np. trzech ( na przykład w streszczeniu uczyniono to sześciokrotnie), 2. Występuje niezgodność w liczbie roślin analizowanych pomiędzy polską i angielską wersją streszczenia (odpowiednio 4 i 5), 3. Wnioski lepiej nazwać podsumowaniem, ponieważ są utrzymane w formie opisowo - konkluzyjnej, a nie wyłącznie konkluzyjnej, 4. Skrót słowa „współpracownicy” powinien kończyć się na literze przed samogłoską (najczęściej kończy się go po pierwszym „p” lub „r”.

#### 4. Konkluzja

Rozprawa mgr Marcina Maciąga wpisuje się w zakres aktualnej problematyki dotyczącej określenia miejsc genów kodujących 3 typy transferazy asparaginianowej w genomach pszenicy oraz niektórych szczegółów związanych z ekspresją tych genów. Uzyskane dane w niektórych przypadkach weryfikują a w innych pogłębiają naszą wiedzę o działaniu tych genów lub dostarczają informacji nowych o właściwościach biochemicznych tego enzymu. Autor rozprawy pokazał, że umie postawić aktualny problem badawczy, zaplanować sposób jego wykonania stosownie do możliwości metodycznych, pomyślnie ów program zrealizować oraz poprawnie zinterpretować wyniki. W ten sposób dowiódł, że jest dobrze przygotowany do samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Warto podkreślić, że część wyników opublikowano w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu z listy filadelfijskiej, co jest dowodem dbałości o szybkie przekazywanie wyników do społeczności naukowej. Z tych powodów uważam, że rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom na stopień doktora nauk rolniczych i stawiam wniosek o dopuszczenie Autora rozprawy do dalszych etapów postępowania.

  
Prof. dr hab. Stefan Malepszy  
Członek Korespondent PAN