Dr hab. Magdalena Żuk
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski

Wrocław,8 maja,2017

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Ciarkowskiej
pt: Molekularna i biochemiczna charakterystyka acetylotransferazy 1-*0*-indoilo-3-acetylo-β-D-glukoza:*myo*-inozytol z ryżu (*Oryza sativa*)

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biochemii na Wydziale Biologii Ochrony Środowiska UMK pod kierunkiem dr hab. Anny Jakubowskiej , prof.UMK

Tematyka badawcza

Przedmiotem badań jest o charakterystyka molekularna i biochemiczna, jednego z enzymów szlaku biosyntezy koniugatów estrowych IAA (kwasu indoilo -3- octowego), a mianowicie acetylotransferazy 1-*0*-indoilo-3-acetylo-β-D-glukoza:*myo*-inozytol (syntaza IAInos). Enzym ten katalizuje reakcją przeniesienia reszty IAA z 1-*0*-indoilo-3-acetylo-β-D-glukozy na cząsteczkę *myo*-inozytolu. W ramach badań opisanych w przedstawionej do recenzji pracy sklonowano gen kodujący syntazę IAInos z ryżu i przeprowadzono jego ekspresję w bakteryjnym i drożdżowym systemie ekspresyjnym. Właściwości otrzymanych w ten sposób rekombionowanych białek porównywano z częściowo oczyszczonym preparatem natywnej syntazy IAInos wyizolowanej z 6-dnowych siewek ryżu.

Praca doskonale wpisuje się w tematykę badawczą Zakładu Biochemii UMK, którego pracownicy między innymi zajmują się enzymatyczną syntezą koniugatów amidowych IAA i oceną ich roli we wzroście i rozwoju roślin, szczególnie w kontekście utrzymania homeostazy hormonalnej. W roślinach większość kwasu indolilo-3-octowego (IAA) występuje w formie związanej jako koniugaty estrowe z inozytolem lub cukrami bądź jako połączenia amidowe z aminokwasami lub białkami, natomiast wolna, aktywna forma auksyny stanowi zaledwie kilka procent całkowitej puli IAA. Z tego względu zagadnienia związane z homeostazą hormonalną są jednymi z kluczowych problemów biochemii i biologii molekularnej roślin.

Struktura pracy i strona językowa

Rozprawa liczy 127 stron i jest podzielona na trzy główne części -Wstęp teoretyczny (34 strony),Materiały i Metody (21 stron) i Wyniki (29 stron). Oprócz tego przed główną częścią pracy zamieszczono Spis treści , Streszczenie w języku polskim i angielskim , oraz Spis stosowanych skrótów. Podsumowanie pracy stanowi 15 stronicowa Dyskusja wraz z Podsumowaniem. Materiał dokumentacyjny ujęto w 10 tabelach i na 36 rycinach. Spis literatury obejmuje 122 pozycje, w większości anglojęzyczne, pochodzące z czasopism o wysokim wskaźniku IF ,a także trzy strony internetowe stanowiące linki do stron producentów zestawów odczynnikowych lub opisu stosowanych wektorów ekspresyjnych.

Struktura pracy jest dobrze dopasowana do charakteru pracy i specyfiki omawianych zagadnień. Zorientowanie w układzie pracy, a szczególnie w części dokumentującej uzyskane wyniki byłoby łatwiejsze gdyby doktorantka zdecydowała się na umieszczenie na początku rozprawy Spisu rycin i tabel ,co jest dość powszechną praktyką przy przygotowywaniu tego typu rozpraw. Korzystnym dla przejrzystości pracy zabiegiem byłoby również przedstawienie bardziej dokładnych list odczynników i używanego przez Doktorantkę sprzętu w miejsce dość ogólnej listy firm z jakich pochodziły odczynniki. Informacja dotycząca z jakiej firmy zakupiono konkretne odczynniki i sprzęt laboratoryjny ułatwiło by ewentualne powielenie, lub przeprowadzenie podobnych eksperymentów przez inne osoby, co również zwiększyło by potencjalny dydaktyczny aspekt pracy .

Kolejne uwagi o charakterze edytorskim chciałabym odnieść do cytowania tabel i rycin. Każdy element materiału ilustracyjnego powinien zostać w sposób przejrzysty zacytowany w tekście, a w rozdziale wyniki w wielu miejscach brakuje przejrzystych odwołań do rycin – np. z podaniem numeru ścieżki na żelu, obrazującej dane na jakie się powołuje autorka (np. na stronie 76-77 opisu Wyników). Takie szczegółowe potraktowanie opisu uzyskanych danych ułatwiłoby śledzenie uzyskanych wyników i wyciąganych na ich podstawie hipotez badawczych. Pomocnym mogłoby być graficzne wyróżnienie szczególnie istotnych (np. wybranych do dalszych analiz) warunków eksperymentacyjnych za pomocą obramowania czy zmiany koloru czcionki.

Pozostają jeszcze drobne uwagi edytorskie, takie jak brak nawiasu przy podawaniu skrótu SCPL po nazwie karboksypeptydaz serynowych – str 9.

Praca napisana jest poprawnym, przystępnym językiem, nie zawiera błędów stylistycznych . Doktorantka nie ustrzegła się jednak drobnych błędów literowych , których ilość jest jednak znikoma wziąwszy pod uwagę wielkość przedstawionej pracy.

Ocena treści

Tytuł pracy jest adekwatny do przedstawionych w rozprawie treści. We wstępie rozprawy zawarto przegląd najważniejszych zagadnień dotyczących problematyki badawczej . Znalazły się tu takie tematy jak opis występujących w naturze (roślinach) form kwasu indoilo -3-octowego – wolny IAA / koniugaty IAA; rodzaje i rola poszczególnych koniugatów IAA w roślinach; opis acetylotransferaz z rodziny SCPL wraz z ich mechanizmem katalitycznym.

Tekst Wstępu wzbogacono o materiał ilustracyjny w postaci 11 rycin i 1 tabeli . Ilustracje urozmaicają i ułatwiają odbiór treści prezentowanej tematyki. Aczkolwiek rycina 2 (str.13), przedstawiająca mechanizm regulacji stężenia wolnego IAA, jest mało informacyjna i nie wynika z niej w sposób prosty ,które procesy powodują wzrost, a które spadek wolnego IAA. Oczywiście w połączeniu z opisem zagadnienia w treści Wstępu jest to właściwie wyjaśnione , niemniej rycina ta wymaga korekty.

Autorka nie uniknęła również niezbyt szczęśliwych sformułowań w rodzaju : „Reszta IAA z 1-*O*- IAGlc jest następnie przenoszona na cząsteczkę *myo*-inozytolu według równania reakcji :" (str. 16) bardziej prawidłowe byłoby sformułowanie -według reakcji, lub ja powyżej – zgodnie z reakcją. Nie podobają mi się również niektóre terminy, w rodzaju: aminokwasy kwaśne, zamiast kwasowe; aminokwasy proteinogenne zamiast proteogenne (str 24); PCR kolonijny (str 55) – są one stosowane w żargonie laboratoryjnym, nie powinny się jednak znaleźć w pracy doktorskiej.

Cel pracy sformułowano w formie opisowej jako cel główny i zadania realizowane w ramach tego celu. Autorka umiejętnie umieszcza własne cele badawcze na tle wcześniej uzyskanych danych , pokazując w jaki sposób zamierza poszerzyć dotychczasową wiedzę w zakresie badanych zagadnień. Cele sformułowano prawidłowo i konsekwentnie w toku pracy doktorskiej je realizowano.

Absolutnie zbędnym wydaje mi się pierwszy akapit rozdziału Cel pracy będący powtórzeniem treści przedstawianych we Wstępie i nie wnoszący nic istotnego do celu pracy.

Uwagi dotyczące rozdziału Materiały i metody.

Materiałem do izolacji acetylotransferazy 1-*0*-indoilo-3-acetylo-β-D-glukoza:*myo*-inozytol z ryżu były 6- dniowe siewki. Brak jednak wyjaśnienia w treści pracy (w rozdziale Materiały i metody , czy w Wynikach) dlaczego wybrano rośliny na tym etapie rozwojowym – czy jest to w jakiś sposób dobrane na postawie wcześniejszych badań czy danych literaturowych,np.: najsilniejsza ekspresja genu , czy też może wynika z łatwiejszej izolacji z

takiego materiału ? Bardzo proszę aby Autorka odniosła się do tego pytania podczas obrony rozprawy doktorskiej.

Autorka podczas tworzenia konstrukcji w wektorach ekspresyjnych zarówno bakteryjnych jak i grzybowych wykorzystywała sekwencję kodującą genu IAInos pozyskaną w wyniku reakcji PCR na matrycy cDNA ryżu – nieprawidłowym jest zatem używanie w tym przypadku terminu sekwencja genu (np. str.48). Sekwencja genu obejmuje bowiem obok sekwencji kodujących (obecnych w cDNA) sekwencje regulatorowe – promotorowe, terminator , sekwencje intronowe.

Czy gen acetylotransferazy 1-*0*-indoilo-3-acetylo-β-D-glukoza:*myo*-inozytol z ryżu posiada introny?

Brak informacji w rozdziale Materiały i metody na czym polegają mutacje w szczepie E. coli NovaBlue i jakiego szlaku metabolicznego dotyczą.

Czy w procedurze otrzymywania komórek kompetentnych E.coli NovaBlue stosowano jakąkolwiek metodę weryfikacji tempa wzrostu (a co za tym idzie ilości) komórek bakteryjnych - np. pomiar OD przy długości fali 600nm?

W opisie procedury oczyszczania rekombinowanej syntazy IAInos z ciał inkluzyjnych , a dokładnie przemywania ciał inkluzyjnych, użyto nieprecyzyjnego sformułowania -„ Objętość zawiesiny ciał inkluzyjnych odpowiadająca 20mg białka wirowano …"- w jaki sposób określano tą ilość?

Proszę o informację dotyczące kryterium podziału frakcji po chromatografii powinowactwa na kolumnie IDA-Sepharose „na cztery preparaty"- czy był to tylko podział na 4 próby o podobnej objętości?

Dlaczego do optymalizacji procesu denaturacji in vitro rekombinowanej syntazy IAInos użyto buforu 10 a nie 7, albo obu? – nie znalazłam wyjaśnienia w tekście.

Przyjęte przez Doktorantkę cele i założenia obejmowały szeroki zakres badań. Mgr Anna Ciarkowska przeprowadziła w swojej pracy naukowej liczne i zróżnicowane analizy , zarówno z zakresu biologii molekularnej jak i biochemii , opanowała wiele technik badawczych i obsługę różnych urządzeń, w tym :chromatografu , termocyklera PCR. Przeprowadziła udane procedury klonowania , ekspresji i oczyszczania białka. Świadczy to dobrej znajomości i umiejętności wykorzystanie zróżnicowanych technik laboratoryjnych. Liczba wykonanych analiz jest znacząca.

Równie ważne jak zaplanowanie i wykonanie badań jest umiejętne przedstawienie uzyskanych rezultatów. Autorka rozprawy zaprezentowała wyniki w sposób syntetyczny, zestawiając je w 4 tabelach i na 22 rycinach. Niestety i tu wkradły się pewne nieścisłości.

Oznaczenia mas poszczególnych prążków na elektroforetogramie przedstawiającym wyniki PCR wykonanego na koloniach bakteryjnych (str 71- rozdział 2 Wyników) jest nieczytelny – sprawę poprawiłoby dodatkowe oznaczenie masy właściwych prążków po prawej stronie schematu.

Informacja dotycząca konieczności usunięcia genu apirazy z wektora Pet-28a(+) jest nieistotna z punktu widzenia pracy i powinna być pominięta.

Proszę o wyjaśnienie dlaczego w wyniku elektroforezy w warunkach denaturujących białek uzyskanych podczas oczyszczania rekombinowanej syntazy IAInos z drożdży pojawiają się trzy prążki ? (str.86 Wyniki)

Dyskusja świadczy o dojrzałości naukowej mgr Anny Ciarkowskiej. Dokładnie omówiono w niej wyniki badań w odniesieniu do rezultatów już opublikowanych. Doktorantka nie tylko zgłębiła literaturę ale tez umiejętnie przeprowadziła analizę własnych wyników na jej tle.

Pozostaje jednak jeszcze parę zagadnień do wyjaśnienia np. chciałaby m poznać opinię Doktoranki na temat -Z czego wynika obniżona wrażliwość na inhibicję przez PMSF natywnej formy syntazy IAIno w porównaniu do form rekombinowanych? Czy badano jej wrażliwość na inne inhibitory karboksypeptydaz serynowych (np. DTT)?

Czy posiada Pani dostęp do danych dotyczących poziomu wolnego IAA i jego koniugatów w warunkach stresu abiotycznego – ciekawym może być zestawienie tych danych z wynikami zmian w aktywności analizowanego białka.

Podsumowanie

Praca mgr Anny Ciarkowskiej obejmowała szeroki zakres zagadnień badawczych i napisana została z dużą biegłością oraz znajomością omawianej tematyki badawczej. Na wszystkich etapach realizacji badań i przygotowania treści rozprawy Doktorantka wykazała się dużymi umiejętnościami i dojrzałością naukową.

Wiele moich uwag krytycznych dotyczyło struktury pracy i opisu metod. Pojawienie się tego typu błędów wynikało zapewne z obszerności opracowania i konieczności zmierzenia się z duża ilością danych oraz skupieniu się Doktorantki na kwestiach merytorycznych. Pracę oceniam pozytywnie ze względu na wysoką wartość naukową wyników.

Podsumowując przedstawiona do oceny dysertacja „Molekularna i biochemiczna charakterystyka acetylotransferazy 1-*0*-indoilo-3-acetylo-β-D-glukoza:*myo*-inozytol z ryżu (*Oryza sativa*)" autorstwa Pani Anny Ciarkowskiej spełnia wymagania stawiane rozprawom

doktorskim w ustawie z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr65,poz.595 ze zmianami). Wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika o dopuszczenie mgr. Anny Ciarkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Magdalena Żuk

Magdalena Żuk