

prof. dr hab. Andrzej Guranowski

prof. zw. w Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu

Katedra Biochemii i Biotechnologii

Biocentrum, ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań

Tel. 61 8487201; e-mail: [guranow@up.poznan.pl](mailto:guranow@up.poznan.pl)

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Ciarkowskiej

Przesłana mi do zrecenzowania rozprawa jest zatytułowana *Molekularna i biochemiczna charakterystyka acylotransferazy 1-O-indolilo-3-acetylo-β-D-glukoza:myo-inozytol z ryżu (Oryza sativa)*. Praca została wykonana w Zakładzie Biochemii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika wpisując się w wieloletnie badania prowadzone w tej placówce naukowej.

Od strony formalnej praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Jej tekst został w dobrych proporcjach podzielony na Wstęp (35 stron), Materiały i metody (20 stron), Wyniki (30 stron), Dyskusję (15 stron), a spis cytowanej literatury zawiera 122 pozycje. Poza tym, Autorka podaje wykaz stosowanych skrótów, Spis treści, Streszczenie, Abstract, Cel pracy, a na końcu Podsumowanie.

Po Wstępie, który podsumowuje stan wiedzy o metabolizmie auksyn, a zwłaszcza o zaangażowanych weń enzymów, Autorka ujawnia i uzasadnia cel podjętych badań. Cel ten pokrywa się z tytułem rozprawy. Źródłem badanego enzymu był ryż – druga po kukurydzy roślina, z której tę transferazę wyizolowano. Autorka skupiła się na dwóch wyraźnie zaznaczonych obszarach badań i zrealizowała je stosując swoiste dla tych obszarów metody. Do pierwszego obszaru zaliczam wyizolowanie rekombinowanych form enzymu. Zastosowano przy tym szereg szczegółowo opisanych technik inżynierii genetycznej. Tymi technikami badano też wpływ czynników abiotycznych i biotycznych na ekspresję genu aktywność tytułowej transferazy. W drugim obszarze znajdują wyizolowanie enzymu z siewek ryżu i charakteryzowanie kinetyczne aktywności enzymatycznej wszystkich – natywnej i zrekombinowanych – form transferazy.

Cała praca jest starannie zredagowana, napisana poprawną polszczyzną i dzięki temu czyta się ją ze zrozumieniem meritum wyводу. Jednak łatwiej byłoby śledzić zawartości poszczególnych części rozprawy i jednoznacznie się do nich odwoływać gdyby i tytuły głównych części opatrzone zostały numerem. Teraz bowiem, przykładowo, we Wstępie i Materiałach i metodach mamy sekcje o takich samych numerach; np. 2.1. czy 2.2. Szkoda, że ani razu nie pojawia się numer badanego enzymu czy w ogóle omawianych enzymów. A numer nadany przez Komisję Enzymatyczną tytułowej transferazie to chyba EC 2.3.1.72.

Niżej wskazuję na inne miejsca, które wymagałyby drobnych zmian:

Na stronie 12, w drugim akapicie sugerowałbym zamienić słowo „odpowiedzi” na „procesy”.

Adekwatniej byłoby Ryc. 2 zatytułować: „Przemiany regulujące stężenie wolnego IAA”.

Pełna nazwa *Arabidopsis* pojawia się dopiero na str. 16, a już na str. 15 podano ją w skrócie. Natomiast brak pełnych nazw rodzajowych na str. 15 dla *P. syringa*, *M. truncatula* i *B. rapa*.

Na str. 24 widać „literówkę” w nazwisku Jakubowska, a także na tej stronie wolalbym określenie „kwasowe” niż użyte „kwaśne” aminokwasy.

Na str. 30 niepotrzebnie powtarzane są pełne nazwy rodzajowe.

W pierwszej połowie sekcji „Cel pracy” Autorka powtarza to o czym napisała wcześniej we Wstępie. A pierwsze niezgrabne zdanie w tej sekcji na str. 47 zmieniałbym na „Zamierzone cele zrealizowano poprzez:”

W Materiałach brakuje mi sprecyzowania czy do badań użyto całą siewkę ryżu czy jakąś jej część?

Na str. 57 czasem trafnie a w niektórych miejscach nie użyto łącznika (-) i myślnika (–).

Na str. 63 jest nieadekwatny tytuł sekcji: „Izolacja rekombinowanej syntazy IAInos z drożdży”. Izolację/oczyszczanie opisano przecież niżej w sekcji 2.6., a kwestionowany przez mnie krótki tekst powyżej można zatytułować „Przygotowanie lizatu drożdży”.

Na str. 65, pierwsza linia: zabrakło podania stężenia w jakim stosowano *myo*-inozytol; w linii 5 powinno chyba być *n*-butanol.

Szkoda, że Autorka nie zilustrowała zastosowanej metody oznaczania aktywności transferazy przykładowym chromatogramem.

Czy nie próbowano izolować IAGlc wytworzonej w reakcji katalizowanej przez swoistą syntazę w takich ilościach, aby dodawać ten substrat do mieszaniny, w której przebiegać miała reakcja katalizowanej przez transferazę IAInos?

W różnych miejscach Doktorantka dyskutuje, a właściwie spekuluje na temat wyglikozyłowania cząsteczek transferazy, a czy nie próbowano zanalizować białka w spektrometrze mas celem stwierdzenia ich faktycznego występowania reszt cukrowcowych?

Opisy ścieżek standardów mas, czy to fragmentów DNA (np. Ryc. 15 czy 17) czy wzorców białkowych (np. Ryc. 19-23) powinny być podane obok ścieżek, tak aby nie przesłaniać wyglądu oryginalnych prążków.

Uwagi dotyczące Ryc. 29 A i B: Można było zaznaczyć pozycje wymywanego enzymu na Ryc. 29A. Porównując intensywność prążków na ścieżkach 1, 3 i 9 można mieć wątpliwości czy aby w każdej próbce istotnie jest ta sama ilość białka (1 µg) jak podano w legendzie.

W danych przedstawionych w Ryc. 31 i 32 nie ma analizy statystycznej.

Wykresy w Ryc. 32 zajmują za dużo miejsca (tzw. światła); osie dotyczące pH mogą być dwukrotnie krótsze.

Najkrytyczniej odnoszę się do analizy kinetycznej: Nie da się bowiem obiektywnie wyznaczyć aktywności enzymatycznej oznaczając ją w jednym punkcie czasowym. Niezrozumiałe jest dla mnie wyznaczanie wpływu czasu inkubacji na aktywność syntazy IAInos. W sekcji 2.8. podaje się bowiem stosowany czas inkubacji 2 h a w 2.9. o stosowaniu różnych czasów. Przecież szybkość to zmiana w czasie, a w przypadku szybkości reakcji enzymatycznej to zmiana stężenia produktu (lub substratu) w

czasie; standardowo minucie. Odnośne wykresy przedstawiane w Ryc. 31 są niezrozumiałe; podane są w nich aktywności z „mianem mol min<sup>-1</sup>” w różnych czasach; znów oznaczanych w minutach. Jeśli chodziło o to, aby doczekać się w tej samej mieszaninie reakcyjnej odpowiedniego stężenia IAGlc, to czy nie skuteczniejsza byłaby preinkubacja bez *myo*-inozytolu, po której dopiero podawano by ten substrat i porcję tensferazy IAInos?

Przy wskazanej wadzie metodologicznej przedstawione wyniki parametrów kinetycznych stają się mało wiarygodne.

W wielu miejscach Dyskusji tekst jest za długi. Nim Autorka przystąpiła do faktycznego dyskusowania własnych wyników powtórzyła na całej stronie to o czym napisała we Wstępie.

Wielokrotnie powtarzane są informacje o (nie)glikolizowaniu białek; po Wstępie, np. na str. 106 i 107.

Bardziej (powtarzaną) „przeładowką” niż dyskusją własnych danych są też fragmenty o różnych acylotransferazach (np. str. 108) czy o wpływie stresów na aktywność IAInos (str. 111).

Ważąc na szali ocen dominującą w rozprawie doktorskiej część zrealizowaną kompetentnie technikami inżynierii genetycznej i dużo mniejszą i metodologicznie wadliwie zrealizowaną część charakteryzującą otrzymane enzymy od strony kinetyki enzymatycznej, zdecydowałam się na zawnioskowanie do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UMK w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Anny Ciarkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań – 21 marca 2017

  
Andrzej Guranowski