

Prof. dr hab. Barbara Zagdańska
Katedra Biochemii Wydziału Rolnictwa i Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Warszawa

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Simińskiej zatytułowanej „Fitocystatyny ulegające ekspresji podczas wykształcania i kielkowania ziarniaków pszenżyta ozimego (*x Triticosecale* Wittm.)

Rozprawa doktorska mgr Joanny Simińskiej, napisana pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Bielawskiego, jest obszernym opracowaniem ciekawego, acz słabo poznanego zagadnienia o ogromnym znaczeniu gospodarczym, a mianowicie roli fitocystatyn w gromadzeniu i uruchamianiu białek zapasowych na przykładzie białek ziarniaków pszenżyta. Przedźniwne porastanie ziarna dotyczy wszystkich gatunków zbóż uprawianych w wielu rejonach świata. Szacuje się, że w warunkach klimatycznych Polski około 5–10% wyprodukowanego ziarna zbóż wykazuje widoczne uszkodzenia porostowe powodujące znaczne straty ekonomiczne. Fitocystatyny, roślinne inhibitory proteaz cysteinowych, są obiektem intensywnych badań od ponad 20 lat, kiedy to po raz pierwszy zostały opisane. Z uwagi na obserwowaną ich rolę pełnioną w regulacji metabolizmu białek podczas dojrzewania i kielkowania nasion wpisują się one w zainteresowania grupy badawczej kierowanej przez prof. dr hab. Wiesława Bielawskiego. Pani mgr Joanna Simińska podejmując badania nad fitocystatynami ziarniaków pszenżyta podjęła się kontynuacji nowatorskich badań rozpoczętych przez dr J. Szewińską (2012, 2013). Podobne badania prowadzone są na świecie w niewielu laboratoriach i tylko na ziarniakach jęczmienia (Hiszpania i RFN) oraz pszenicy (Japonia).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma układ typowy dla dysertacji doktorskich. Do pracy dołączone zostały oświadczenia promotora i Autorki pracy, że praca doktorska spełnia warunki stawiane pracom naukowym. Autorka dysertacji zaznaczyła również, że wykonanie pracy było finansowane ze środków NCN (Preludium 2 nr 2011/03/N/NZ9/04115). Objętość rozprawy to 112 strony wydruku komputerowego, w

którym zamieszczono 36 rysunków i 20 tabel oraz obszerny spis cytowanego piśmiennictwa obejmującego 185 pozycji i 3 strony internetowe.

Przegląd literatury poprzedza wykaz stosowanych w pracy skrótów. Pragnę zwrócić uwagę, że DMAC to aldehyd p-dimetyloaminocynamonowy.

Przegląd literatury napisany jest poprawnym językiem i czyta się go z dużą przyjemnością. Rozdział ten rozpoczyna się krótkim opisem rozwoju ziarniaków i charakterystyką białek zapasowych oraz hydrolizą tych białek podczas kiełkowania. Następnie Autorka bardzo krótko scharakteryzowała proteazy i omówiła zasady ich klasyfikacji oraz dokładniej omówiła proteazy cysteinowe z rodziny papainy i inhibitory proteaz cysteinowych. Autorka dużo uwagi poświęciła roli fitocystatyn w regulacji metabolizmu, obronie przed szkodnikami i funkcji ochronnej przed patogenami. Zestawiając w tabeli (Tabela 1, str. 30) fitocystatyny, „których ekspresja uległa zmianom” pod wpływem różnych niekorzystnych czynników środowiska, Autorka jednak nie wskazała jakiego typu są to zmiany – czy jest to zwiększona czy zmniejszona ekspresja. Mimo, że Autorka cytuje prace swoich koleżanek dotyczące charakterystyki i funkcji fitocystatyn pszenżyta TrcC-1, TrcC-4 i TrcC-5 (Szewińska i in. 2012, 2013) oraz TrcC-8 i TrcC-9 (Chojnacka i in. 2015) zabrakło mi podsumowania wyników ich badań, które byłoby dobrą podstawą do sprecyzowania założeń (hipotezy roboczej) przedstawionej pracy.

Materiał roślinny użyty do badań i stosowane metody zostały omówione na 17 stronach i dodatkowo zilustrowane w 17 tabelach. Rozdział poświęcony materiałowi roślinnemu i zastosowanym metodom jest starannie opracowany. Na podkreślenie zasługuje opanowanie przez Autorkę rozprawy wielu różnorodnych technik badawczych, a ich szczegółowy opis świadczy o kompetencjach Autorki.

Wyniki badań zostały przedstawione w czterech podrozdziałach odpowiadających założonemu celowi badań. Zostały one omówione w sposób przejrzysty i zwięzły na 32 stronach i dodatkowo zilustrowane 34 rysunkami. Jest to najstaranniej napisany rozdział, a śledzenie wyników badań w tekście nie nastroczało trudności w ich zrozumieniu. Autorka w genomie pszenżyta ozimego wykazała obecność dwóch genów TrcC-6 oraz TrcC-7 kodujących dwie nowe cystatyny. W wyniku zsekwencjonowania produktów reakcji odwrotnej transkrypcji i PCR na matrycy mRNA wyizolowanego z ziarniaków pszenżyta Autorka poznała pełne sekwencje tych genów i zarejestrowała je w bazie GenBank. Następnie na podstawie sekwencji genów określiła sekwencje aminokwasowe obu fitocystatyn wraz z pełnymi sekwencjami nukleotydowymi kodujących je genów. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna pozwoliła dokładniej scharakteryzować badane

fitocystatyny (określenie masy cząsteczkowej, pI, domniemane peptydy sygnałowe oraz stwierdzenie braku miejsc glikozylacji i identyfikacja miejsc fosforylacji). Autorka następnie porównała sekwencje aminokwasowe TrcC-6 i TrcC-7 z sekwencjami wcześniej zidentyfikowanych fitocystatyn. Przeprowadzona analiza filogenetyczna pozwoliła zaklasyfikować badane fitocystatyny do oddzielnych gałęzi drzewa filogenetycznego co świadczy o ich przynależności do dwóch różnych grup filogenetycznych. Następnym etapem badań była analiza ekspresji genów kodujących badane fitocystatyny. Na podstawie uzyskanych wyników i przeprowadzonej ich analizy do produkcji przeciwciał poliklonalnych wybrano fitocystatynę TrcC-6, której ekspresja zwiększała się podczas wykształcania ziarniaków oraz utrzymywała się na wysokim poziomie w dojrzałych ziarniakach. Autorka wykazała, że uzyskany inhibitor hamował aktywność takich enzymów proteolitycznych jak papaina i ficyna, ale nie hamował aktywności bromelainy oraz hamował aktywność proteinaz cysteinowych w kiełkujących ziarniakach pszenżyta.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki zaliczam:

1. Uzyskanie pełnych sekwencji nukleotydowych ulegających transkrypcji dwóch nowych, wcześniej nieznanymi, inhibitorów proteinaz cysteinowych
2. Stwierdzenie, że TrcC-6 wydaje się brać udział w regulacji gromadzenia białek zapasowych i w kontroli aktywności enzymów proteolitycznych biorących udział w uruchamianiu białek zapasowych
3. Wykazanie, że fitocystatyna TrcC-7 zaangażowana jest w kontrolę aktywności proteinaz cysteinowych podczas gromadzenia białek zapasowych
4. Przebadanie wpływu rekombinowanego inhibitora TrcC-6 na aktywność endogennych proteinaz cysteinowych pszenżyta.

Rozdział „Dyskusja” stanowi dobre uzupełnienie omówionych wyników na tle wszystkich istotnych i znaczących pozycji najnowszego piśmiennictwa światowego. Podczas przeprowadzonych doświadczeń Doktorantka uzyskała bogaty materiał informacyjny, trudny w interpretacji z uwagi na skąpe dane literaturowe. Mimo to, Autorka poprowadziła dyskusję otrzymanych wyników w sposób krytyczny, ale w przekonaniu o wartości uzyskanych wyników otwierających nowe perspektywy badawcze. Zarówno dobór pozycji literatury jak i sposób dyskusowania i konfrontowania osiągnięć Autorki z obecnym stanem wiedzy potwierdzają kompetencje autorki w zakresie biologii molekularnej roślin użytkowanych rolniczo.

Z obowiązku recenzenta powinnam wytknąć drobne uchybienia językowe lub redakcyjne, które umieściłam w manuskrypcie, a które pozostają bez wpływu na ocenę pracy. Podsumowując ocenę stwierdzam, że praca pani mgr Joanny Simińskiej stanowi oryginalne, w pełni nowatorskie dzieło naukowe i zawiera nieznane dotąd informacje dotyczące mechanizmów regulacji aktywności proteinaz cysteinowych w trakcie wykształcania i kiełkowania ziarniaków pszenżyta. Rozprawa doktorska została wykonana i przedstawiona w sposób nie budzący wątpliwości co do oryginalności i wiarygodności prezentowanych wyników badań.

Wniosek końcowy

Dorobek naukowy zawarty w recenzowanej dysertacji jest szczególnie widoczny na tle dokonań innych badaczy, skonfrontowanych w rozdziale Dyskusja. Z treści zawartej w tej części opracowania widać, że w literaturze niewiele jest publikacji naukowych dotyczącej fitocystatyn i ich roli w gromadzeniu i uruchamianiu białek zapasowych. Oceniana rozprawa doktorska jest bogata od strony eksperymentalnej i obszaru problematyki badawczej, poprawnie wykonana, a wyniki są dobrze opracowane i przedyskutowane. Wybrane wyniki były przedmiotem dyskusji w 2013 roku na VI Konferencji Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin w Łodzi (BioTechnologia 2013: 94 (3), 349) oraz zostały częściowo opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o IF = 1.195 (Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 84 (1), 139-142, 2015; DOI:10.5586/asbp.2015.011). Biorąc pod uwagę zarówno wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań jak i ich pionierski charakter przekraczający ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim **wnioskuję o wyróżnienie** rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Simińskiej.

Na podstawie szczegółowej analizy stwierdzam, że treść i forma przedstawionej rozprawy "Fitocystatyny ulegające ekspresji podczas wykształcania i kiełkowania ziarniaków pszenżyta ozimego (*x Triticosecale* Wittm.)" spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim w art. 13 Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym. Na tej podstawie kieruję wniosek do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW o dopuszczenie mgr Joanny Simińskiej do dalszych etapów realizacji przewodu doktorskiego.

Warszawa, 15 maja 2015 r.

prof. dr hab. Barbara Zagdańska