



dr hab. Małgorzata Garnczarska, prof. UAM
Zakład Fizjologii Roślin
Wydział Biologii
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
61-614 Poznań, ul. Umultowska 89

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

Praca doktorska mgr Joanny Simińskiej została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Bielawskiego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Joanny Simińskiej stanowi kontynuację badań nad rolą proteinaz cysteinowych, aspartylowych oraz karboksypeptydaz w procesie kiełkowania ziarniaków pszenżyta i pszenicy, prowadzonych od wielu lat w Katedrze Biochemii SGGW.

Olbrzymia wiedza, którą dysponujemy obecnie, pozwala nam na coraz bardziej precyzyjny opis procesów zachodzących podczas rozwoju i kiełkowania ziarniaków zbóż, jednak ciągle dalecy jesteśmy od zrozumienia wszystkich regulujących te procesy mechanizmów. Przedłożona do recenzji praca wpisuje się w nurt tych niezwykle ważnych dla biologii ziarniaków zagadnień.

Kiełkowaniu ziarniaków zbóż towarzyszy hydroliza białek zapasowych z udziałem proteinaz cysteinowych. Enzymy te zaangażowane są także w proteolizę związaną z dojrzewaniem i gromadzeniem białek zapasowych w ciałach białkowych. Obecność enzymów proteolitycznych obserwowana jest na wszystkich etapach wykształcania i kiełkowania ziarniaków, także w ziarniakach będących w stanie spoczynku. Aktywność proteinaz cysteinowych musi być precyzyjnie kontrolowana, aby zabezpieczyć komórki przed niepożądaną proteolizą. Wśród mechanizmów regulujących ilość i aktywność tych białek możemy wyróżnić: regulację ekspresji na poziomie transkrypcji i translacji, wydzielenie do miejsca przeznaczenia, przekształcenie nieaktywnych proenzymów w formy aktywne, degradację dojrzałych enzymów oraz hamowanie aktywności proteolitycznej poprzez syntezę specyficznych inhibitorów białkowych.

Zagadnienia będące przedmiotem zainteresowania mgr Joanny Simińskiej dotyczą identyfikacji białek roślinnych będących inhibitorami proteinaz cysteinowych.

Podjęta przez Autorkę tematyka badań ma nie tylko wartość poznawczą, ale również potencjalnie aplikacyjną. Porastanie zbóż to zjawisko, w którym nasiona zamiast osiągnąć stan spoczynkowy przedwcześnie kiełkują w kłosie. Przynosi ono znaczne straty gospodarcze



spowodowane obniżeniem ilości plonów i pogorszeniem wartości ziarna. Poznanie molekularnych i biochemicznych podstaw porastania zbóż może w przyszłości przyczynić się do opracowania kryteriów selekcji odmian o zwiększonej odporności na przedźniwne porastanie.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Simińskiej jest opracowaniem napisanym w języku polskim, zawartym na 112 stronach maszynopisu, zilustrowanym 36 rysunkami i 20 tabelami, a cytowana literatura obejmuje 185 pozycji. Praca zawiera streszczenie wyników w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych skrótów. Pod względem formalnym praca napisana jest poprawnie, zgodnie z przyjętymi standardami dla biologicznych prac eksperymentalnych. Doktorantka przygotowała rozprawę starannie. Cała rozprawa napisana jest poprawnym językiem, stosunkowo rzadko zdarzają się wtręty żargonu laboratoryjnego.

Liczący 22 strony Wstęp został opracowany z uwzględnieniem zarówno prac klasycznych, opublikowanych kilkanaście lat temu, jak i piśmiennictwa najnowszego, włączając pracę opublikowaną w 2015r. Wstęp jest dobrze napisany i dotyczy głównie teoretycznych podstaw podejmowanych badań. Na uwagę zasługuje fakt, że nie zawiera zbędnych informacji, które nie są bezpośrednio związane z poruszonymi w rozprawie zagadnieniami. Pierwsza część wstępu zawiera podstawowe informacje na temat rozwoju i kiełkowania ziarniaków. W kolejnym punkcie Wstępu Autorka przedstawia ogólną charakterystykę proteaz. Następnie omawiane są inhibitory proteaz cysteinowych, ze szczególnym uwzględnieniem fitocytostatyn oraz ich roli w regulacji metabolizmu i reakcji roślin na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe. Doktorantka dobrze orientuje się w poruszanej w jej pracy tematyce, co jest potwierdzone w następnych rozdziałach zawierających bardziej szczegółowe porównanie uzyskanych wyników z rezultatami innych badań opisanych w literaturze. Wstęp został napisany tak umiejętnie, że po jego lekturze celowość planowanych badań staje się oczywista. Pogłębienie wiedzy dotyczącej inhibitorów proteinaz cysteinowych, które mogą być zaangażowane w regulację metabolizmu białek w ziarniakach pszenżyta, zarówno w czasie gromadzenia materiałów zapasowych jak i podczas kiełkowania było naczelnym celem pracy i dzięki kompleksowym, logicznie dobranym doświadczeniom, Doktorantce udało się do tego celu znacząco przybliżyć.

Rozdział Materiał i metody zawiera opis materiału roślinnego, układu doświadczalnego oraz metod stosowanych w pracy. Materiał doświadczalny stanowiły dwie odmiany pszenżyta ozimego Hortenso i Leontino różniące się odpornością na przedźniwne porastanie. Analizy przeprowadzono na rozwijających się i kiełkujących ziarniakach. Zrealizowanie zaplanowanych badań wymagało wykorzystania szerokiego wachlarza metod i technik badawczych (izolacja DNA i RNA, półilościowy RT-PCR, produkcja i oczyszczanie białka rekombinowanego, metody immunochemiczne, wykorzystanie narzędzi bioinformatycznych). Takie wszechstronne i nowoczesne podejście do badanego problemu, wymagające dużej sprawności doświadczalnej, bardzo dobrze świadczy o umiejętnościach Doktorantki i jej przygotowaniu do samodzielnej pracy badawczej. Przedstawione opisy metodyki doświadczeń wydają mi się wystarczająco precyzyjne, aby na ich podstawie powtórzyć wszystkie przedstawione w rozprawie doświadczenia. Zastrzeżenia może budzić jedynie brak



danych dotyczących wydajności produkcji białka rekombinowanego. Ponadto w rozprawie brak informacji o analizie statystycznej zdecydowanej większości wyników. Doktorantka przedstawia na rycinach próbę reprezentatywną, ale nie podaje informacji, ile powtórzeń doświadczeń wykonała. Analiza densytometryczna rozdziałów elektroforetycznych produktów amplifikacji oraz białek wykrytych metodą Western blot pozwoliłyby na oznaczenia ilościowe poziomu transkryptów i białek w badanych próbach.

Najbardziej wartościową częścią pracy są zawarte w niej wyniki. Tekst ilustrowany przejrzystymi rycinami konsekwentnie prowadzi czytelnika przez wszystkie etapy cyklu doświadczalnego.

Doktorantka zidentyfikowała w ziarniakach pszenżyta ozimego obecność transkryptów dwóch genów kodujących inhibitory proteinaz cysteinowych wcześniej nie opisywanych w literaturze. Dla obu genów uzyskano pełne sekwencje nukleotydowe ulegające transkrypcji, które zarejestrowano w bazie GenBank. Na podstawie sekwencji genów *Trc-6* i *TrC-7* określono sekwencje aminokwasowe TrC-6 i TrC-7. Analiza bioinformatyczna wykazała, że oba białka posiadają trzy motywy aminokwasowe charakterystyczne dla nadrodziny cytostatyn. Wykazano, że sekwencje aminokwasowe TrC-6 i TrC-7 są w około 30% identyczne z sekwencjami innych fitocystatyn pszenżyta. Analiza filogenetyczna wykazała, że oba inhibitory leżą na innych gałęziach drzewa filogenetycznego; *Trc-6* została zakwalifikowana do grupy B, natomiast *TrC-7* do grupy C, podgrupy C1.

Doktorantka wykazała obecność mRNA *TrC-6* i *TrC-7* w ziarniakach zarówno w czasie ich wykształcania, jak również podczas kiełkowania i to stanowiło punkt wyjścia do przeprowadzenia szczegółowej analizy ekspresji wspomnianych genów na poziomie mRNA i białka w trakcie obu procesów. Do analiz poziomu białka wykorzystano przeciwciała specyficzne dla TrC-6 i TrC-7, których wykonanie zlecono firmie zewnętrznej.

Analiza dynamiki ekspresji TrC-6 dostarczyła interesujących wyników wskazujących na udział tego enzymu w regulacji procesów gromadzenia białek zapasowych i kiełkowania. Doktorantka wykazała wysoki poziom mRNA oraz obecność białka TrC-6 pod koniec wykształcania i w dojrzałych ziarniakach, zwłaszcza w odmianie Hortenso bardziej odpornej na porastanie. Wzrost ekspresji tej fitocystatyny w trakcie dojrzewania ziarniaków może wskazywać na stopniowe hamowanie aktywności proteinaz cysteinowych w tym procesie, przyczyniając się w ten sposób do ograniczenia przedwczesnego kiełkowania. Wzrost ekspresji w czasie kiełkowania jedynie w części zarodkowej sugeruje udział TrC-6 w ograniczaniu aktywności proteinaz cysteinowych syntetyzowanych w tarczce zarodkowej, które następnie wydzielane są do bielma, gdzie hydrolizują białka zapasowe.

Wzór ekspresji TrC-7 wskazuje na rolę tego inhibitora w kontroli aktywności proteinaz cysteinowych w czasie wykształcania i wypełniania ziarniaków, a także na późniejszym etapie kiełkowania. Pojawienie się białka TrC-7 dopiero po 24 godz. pęcznienia w odmianie Leontino i po 36 godz. w odmianie Hortenso, wskazuje na udział tego inhibitora w kontroli aktywności enzymów proteolitycznych syntetyzowanych w tarczce zarodkowej podczas wzrostu siewki.



Jednym z kluczowych wyników tej rozprawy było uzyskanie w bakteryjnym systemie ekspresyjnym białka rekombinowanego TrC-6 zawierającego znacznik histydynowy i oczyszczenie tego białka przy użyciu niskociśnieniowej chromatografii powinowactwa. Doktorantka wykazała, że białko to hamuje *in vitro* aktywność proteinaz cysteinowych tj. papainy i ficyny, ale nie wywiera wpływu na aktywność bromelainy. Przeprowadzone analizy wykazały także, że białko rekombinowane TrC-6 hamuje aktywność proteinaz cysteinowych obecnych w kiełkujących ziarniakach pszenżyta. Wskazuje to na możliwość udziału TrC-6 w kontroli aktywności enzymów proteolitycznych zaangażowanych w mobilizację białek zapasowych pszenżyta.

Szczegółowy komentarz uzyskanych wyników znajduje się w rozdziale Dyskusja. Tak jak zakres przeprowadzonych doświadczeń wskazuje na biegłość metodyczną i badawczą Doktorantki, tak rozdziały Wstęp i Dyskusja świadczą o jej wiedzy teoretycznej, dobrej znajomości literatury fachowej i umiejętności kojarzenia faktów. Przedstawiona w dyskusji wyważona analiza wyników dostarcza interesującej interpretacji zaobserwowanych zależności. Kompleksowe ujęcie tematu, przeprowadzenie różnorodnych analiz umożliwiło wykazanie, że zidentyfikowane białka TrC-6 i TrC-7 są fitocystatynami. Analizy poziomu mRNA kodującego obie fitocystatyny i oznaczenia poziomu białka TrC-6 i TrC-7 wskazują na ich istotną rolę podczas wykształcania i kiełkowania ziarniaków pszenżyta. Doświadczenia *in vitro* z użyciem rekombinowanego białka TrC-6 potwierdziły zdolność TrC-6 do hamowania aktywności proteinaz cysteinowych. Fakt ten może wskazywać na potencjalną rolę, jaką TrC-6 może odgrywać w ograniczaniu porostania zbóż.

Chciałabym prosić Doktorantkę o zaproponowanie w trakcie obrony rozprawy eksperymentów, które udowodniłyby udział białka TrC-6 w ochronie ziarniaków przed przedwczesnym kiełkowaniem.

Oceniana rozprawa kończy się podsumowaniem, w którym mgr Joanna Simińska wymienia najważniejsze uzyskane w trakcie realizacji doktoratu wyniki, a także stara się na ich podstawie wysnuć końcowe wnioski.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że wyznaczone szczegółowe cele badawcze zostały osiągnięte. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością warsztatu badawczego. Doktorantka uzyskała szereg interesujących, nowych dla nauki wyników. Wszystkie wyniki zostały rzeczowo przedyskutowane w oparciu o dobrą znajomość danych literaturowych, a przedstawiona interpretacja uzyskanych wyników nie budzi moich zastrzeżeń. Z powyższych powodów uważam, iż przedstawiona praca całkowicie spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję o dopuszczenie Pani mgr Joanny Simińskiej do następnych etapów przewodu doktorskiego.

/dr hab. Małgorzata Garnczarska, prof. UAM/