



Opole, 6.06.2019

Dr hab. Małgorzata Pawełczak, prof. UO
Zakład Chemii Fizycznej i Modelowania Molekularnego
Wydział Chemii
Uniwersytet Opolski w Opolu

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. JOANNY KANI
pt. „AMINOPEPTYDAZY Z RZEPAKU – CHARAKTERYSTYKA I WPŁYW
WYBRANYCH CZYNNIKÓW NA ICH AKTYWNOŚĆ”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej. Promotorem tej pracy jest dr hab. inż. Danuta Gillner, Prof. Pol. Śl. Tematyka badawcza pracy dotyczy charakteryzowania aminopeptydaz, które występują w rzepaku ozimym. Pełna charakterystyka aminopeptydaz z tego źródła jest ważna z punktu widzenia poznawczego i praktycznego.

INFORMACJE OGÓLNE

Dysertacja doktorska mgr inż. Joanny Kani liczy łącznie 182 strony tekstu, 82 rysunki oraz 28 tabel i została przygotowana starannie pod względem edytorskim. Układ pracy jest typowy dla prac eksperymentalnych w naukach ścisłych. Po stronie tytułowej, podziękowaniach i spisie treści znajduje się wykaz skrótów stosowanych w pracy i nazw zwyczajowych. Spis treści obejmuje 6 zasadniczych części: WPROWADZENIE, CEL PRACY, CZĘŚĆ TEORETYCZNĄ, CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNĄ, WYNIKI, PODSUMOWANIE I WNIOSKI, na końcu znajduje się dorobek naukowy (doktorantki) i literatura. Części: TEORETYCZNA, EKSPERYMENTALNA i WYNIKI mają rozbudowaną strukturę starannie uporządkowanych podrozdziałów. Praca napisana jest zrozumiałym językiem. Tabele i rysunki zostały przygotowane jasno i czytelnie, brak natomiast na końcu pracy ich spisu. Może gdyby był, wtedy Doktorantka zauważyłaby błędy w numeracji rysunków (np. rys.74/ str. 149, rys. 74/ str. 150 i rys. 69/str.155).



Przytoczona literatura została prawidłowo dobrana do tematyki rozprawy i obejmuje 259 pozycji, z czego około 45% stanowią prace z lat 2008-2018. W tej części pracy Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów edytorskich:

- niejednolicie podane tytuły czasopism (raz napisany jest pełny tytuł, innym razem skrót tytułu) np. 85 i 90;
- niektóre artykuły umieszczone są w spisie literatury dwa razy np. 9 i 67;
- brak wypisanych wszystkich nazwisk autorów artykułu np. 64 i 161;
- brak numerów stron artykułu np. 176.

Doktorantka nie ustrzegła się również drobnych błędów językowych, powtórzeń i niezręcznych sformułowań (np. na str. 152 zdanie „W przypadku korzeni szczególny wzrost aktywności obserwuje się dla aminokwasów z N-kończową leucyną i fenyloalaniną zarówno w siewkach 33- jak i 47-dniowych”), ale z uwagi na to, że nie mają one wpływu na wartość merytoryczną pracy, nie będę ich wyliczała.

Elementem końcowym pracy jest podsumowanie działalności naukowej Doktorantki. Składają na nią: 5 publikacji naukowych, w tym dwie z listy A o sumarycznym współczynniku wpływu (IF) równym 7,97 ($IF_{5-Year} = 8,198$); 11 komunikatów na konferencjach krajowych i zagranicznych, w tym 5 wystąpień ustnych; stypendia i nagrody oraz udział w projekcie realizowanym we współpracy z firmą NUTRICIA Zakłady Produkcyjne Sp. z o.o.

OCENA MERYTORYCZNA PRACY

Po „Wprowadzeniu”, w którym Doktorantka krótko zaznajomiła czytelnika z problematyką poruszaną w pracy, został przedstawiony zwięźle sformułowany cel pracy i zakres badań. Celem pracy była charakterystyka aminopeptydaz rzepaku ozimego na różnych etapach wzrostu i określenie zmian ich aktywności pod wpływem różnych czynników stresowych. Podany w punktach zakres badań określił kolejne zadania badawcze postawione sobie przez Doktorantkę. W tej części pracy Autorka poinformowała, że część badań dotycząca rzepaku uprawianego w szklarni oraz w warunkach polowych była realizowana we współpracy z Instytutem Ochrony Roślin, z zespołem dr hab. Marioli Głazek, prof. nadzw. IOR.

Wydaje mi się, cel pracy mógłby zostać umieszczony po wstępie teoretycznym – ułatwiłoby to analizę pracy.



„Część teoretyczna” pracy stanowi właściwe wprowadzenie do tematyki badań opisanych w dysertacji. W dwóch podrozdziałach (na 28 stronach) Doktorantka dokonała przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat aminopeptydaz, ich klasyfikacji, znaczenia i funkcji w organizmach roślinnych. Omówiła również rolę aminopeptydaz w reakcjach roślin na czynniki stresowe abiotyczne i biotyczne. W kolejnym podrozdziale (7 stron) Autorka omówiła znaczenie rzepaku, jako głównej rośliny oleistej uprawianej w Polsce oraz stosowane w uprawie rzepaku środki ochrony roślin. Opracowanie „Części teoretycznej” dysertacji potwierdza, że Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością podstaw teoretycznych, które były przedmiotem zrealizowanych prac eksperymentalnych.

„Część eksperymentalna” (20 stron) podzielona jest na podrozdziały. W pierwszych trzech podrozdziałach Autorka przedstawiła wykaz odczynników, wykaz aparatury oraz standardowe metody pomiarowe stosowane przy oznaczaniu białek (oznaczanie zawartości białka metodą Bradford i metodą spektrometrii w podczerwieni, oznaczanie aktywności aminopeptydazowej). W kolejnych podrozdziałach Doktorantka przedstawiła pozostałe metody stosowane przy realizacji eksperymentów tzn. izolowania, oczyszczenia i charakterystyki aminopeptydaz z nasion rzepaku ozimego (oszacowania masy cząsteczkowej, wyznaczenia punktu izoelektrycznego, specyficzności substratowej, stabilności termicznej, wyznaczenia optimum pH, wpływu wybranych jonów metali i wybranych inhibitorów na aktywność enzymów); wyznaczenia profilu zmian aktywności aminopeptydaz w pierwszych godzinach rozwoju siewek rzepaku i metody użyte do scharakteryzowania tych enzymów; badania wpływu wybranych czynników abiotycznych i biotycznych na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku; badania wpływu wybranych fungicydów na aktywność aminopeptydaz rzepaku na etapie formowania się łuszczyń; analizy statystycznej stosowanej przy opracowywaniu wyników badań; syntezy *p*-nitroanilidów glicyny, metioniny, fenyloalaniny i proliny. Przy opisach metod syntezy substratów została podana wydajność syntezy i potwierdzenie struktury otrzymanych związków metodami spektroskopii ^1H NMR i ^{13}C NMR. Cała część eksperymentalna opracowana jest bardzo szczegółowo. Metody użyte do realizacji pracy zostały starannie dobrane, ich opis jest precyzyjny i zawiera odnośniki do literatury. Świadczy to o zdolnościach Doktorantki do planowania i wykonywania eksperymentów.

Wydaje mi się jednak, że wykresy przedstawione na rysunkach od 4 do 6 powinny być prezentowane przy omawianiu wyników eksperymentalnych, a nie przy metodyce. Natomiast



przy syntezie związków optycznie czynnych warto podać wartość skręcalności właściwej, tak jak jest to prezentowane w publikacjach, na które powołuje się Doktorantka.

W kolejnej części pracy, zatytułowanej „Wyniki”, Doktorantka na 96 stronach opisała przeprowadzone badania i dokonała interpretacji swoich wyników na tle wielu pozycji literaturowych. W tej części dysertacji znajduje się 76 rysunków i 9 tabel. Omawianie wyników Autorka rozpoczęła od opisu izolacji aminopeptydaz z nasion rzepaku oraz kilkuetapowej procedury ich oczyszczania. W wyniku zaproponowanej metody Doktorantka otrzymała częściowo oczyszczone białko o masie molekularnej 60 kDa i szerokiej specyficzności substratowej. Analizę wyników oczyszczania ułatwia przejrzysty schemat obrazujący proces oczyszczania enzymu (Rys. 7) oraz tabela ze stopniami oczyszczenia po kolejnych etapach. Najwyższą aktywność aminopeptydazową Autorka zaobserwowała wobec *p*-nitroanilidu fenyloalaniny (Phe-*p*NA), jako substratu. Następnie przeprowadziła dokładną charakterystykę enzymu wyznaczając m.in. masę molekularną, punkt izoelektryczny, optimum temperaturowe i stabilność termiczną, optimum pH, wpływ wybranych jonów metali (11 jonów) i wybranych inhibitorów oraz wyznaczyła parametry kinetyczne (K_m i V_{max}). Parametry kinetyczne reakcji hydrolizy katalizowanej aminopeptydazami dwóch syntetycznych substratów (Leu-*p*NA i Phe-*p*NA) zostały wyznaczone czterema metodami z zastosowaniem regresji liniowej i nieliniowej. Wartości stałej Michaelisa dla obydwu substratów są zbliżone, ale wartości szybkości maksymalnej są sześciokrotnie wyższe dla substratu Phe-*p*NA. Czystość wyizolowanych i oczyszczonych enzymów oraz ich masę molekularną Doktorantka potwierdziła stosując elektroforezę w warunkach denaturujących i niedenaturujących. Analizując wyniki (profile aktywności, elektroforegramy oraz dane literaturowe) Doktorantka stwierdziła, że w otrzymanym preparacie białkowym znajduje się więcej niż jedna aminopeptydaza, bądź więcej niż jedna izoforma enzymu.

Następny etap pracy przewidywał badanie aktywności aminopeptydaz w ekstraktach z siewek rzepaku na różnych etapach wzrostu rośliny. Doktorantka wyznaczyła profil zmian aktywności aminopeptydaz podczas 144 godzin kiełkowania nasion rzepaku ozimego. Oznaczenia aktywności wykonała wobec sześciu *p*-nitroanilidów aminokwasów. Najwyższą aktywność aminopeptydazową zaobserwowała wobec Phe-*p*NA, jako substratu. Autorka zbadała również poziom aktywności aminopeptydaz w zależności od części badanej rośliny. W tym przypadku również najwyższą aktywność aminopeptydazową niezależnie od rozpatrywanej części rośliny zauważyła wobec Phe-*p*NA. Charakterystykę aminopeptydaz



z ekstraktów z siewek rzepaku prowadziła na 120-godzinnych siewkach. Doktorantka wyznaczyła optimum pH, zbadała wpływ temperatury, wpływ wybranych jonów metali oraz oszacowała masę molekularną częściowo oczyszczonych aminopeptydaz. Na podstawie uzyskanych wyników Autorka wywnioskowała, że w ekstrakcie białkowym znajduje się więcej niż jedna aminopeptydaza, a potwierdziła ten wniosek prowadząc rozdział ekstraktu na kolumnie wypełnionej żelom Sphacryl HR-300 oraz elektroforezą SDS-PAGE.

Doktorantka przeanalizowała także wpływ różnych czynników stresowych (24 czynników abiotycznych, w tym 6 zanieczyszczeń i 2 czynników biotycznych – tab. 28) na aktywność aminopeptydaz z siewek rzepaku. Po zastosowaniu odpowiednich czynników na etapie uprawy siewek Autorka częściej obserwowała wzrost aktywności aminopeptydazowej w ekstraktach białkowych, niż jej spadek. Badania aktywności aminopeptydazowej prowadzone były wobec sześciu *p*-nitroanilidów aminokwasów. Dla 10 czynników abiotycznych Doktorantka zauważyła szczególny wzrost aktywności enzymów wobec *p*-nitroanilidów proliny i glicyny. Autorka prześledziła również wpływ grzybów chorobotwórczych na aktywność aminopeptydazową w siewkach rzepaku i stwierdziła, że obserwowany wzrost aktywności aminopeptydaz w siewkach wynika z uruchomienia mechanizmów obronnych rośliny.

Ostatni etap pracy omówiony w dysertacji polegał na zbadaniu wpływu trzech fungicydów na aktywność aminopeptydaz w rzepaku w poszczególnych częściach roślin (na etapie formowania się łuszczyń). Analizując wyniki tych badań Doktorantka zauważyła, że stosowanie badanych fungicydów wzmacnia m.in. mechanizmy obronne roślin i odporność na czynniki stresowe.

W części „Podsumowanie i wnioski” Doktorantka przedstawiła wyniki przeprowadzonych badań. Ta część pracy bardziej ma charakter podsumowania, niż wniosków. Wygodniej byłoby przedstawić wnioski w punktach.

Na zakończenie mam pytania do Doktorantki:

- Zastanawia mnie, czy w tabelach 22 i 23 przy szacowaniu wartości K_m i V_{max} wyznaczone są odchylenia standardowe, czy też przedziały ufności? Czy obliczenia wykonano metodą regresji ważonej czy nieważonej?
- Przy wyznaczaniu stopnia oczyszczenia aminopeptydaz Doktorantka pisze: „Nie udało się oczyścić białka do homogeniczności, (co potwierdzono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE, rysunek 13 w rozdziale 5.1.2), mimo stosowania procedur powszechnie



opisywanych w literaturze“. Czy próbowano przy oczyszczaniu białka zastosować chromatografię oddziaływań hydrofobowych?

- W rozdziale 4.5.7 Doktorantka opisuje metodę badania wybranych herbicydów na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach z siewek rzepaku. Niestety nie znalazłam wyników tego eksperymentu. Proszę o komentarz w czasie obrony publicznej.

W podsumowaniu przedstawionej recenzji stwierdzam, że dysertacja stanowi bardzo istotny wkład w badania nad charakterystyką roślinnych aminopeptydaz. Uzyskane wyniki stanowią poszerzenie wiedzy na temat właściwości aminopeptydaz i potwierdzają ich kluczową rolę w odpowiedzi roślin na stres. **W trakcie realizacji zaplanowanych badań Doktorantka osiągnęła stawiane sobie cele.** Zakres prac opisanych w dysertacji doktorskiej jest bardzo szeroki i obejmuje zarówno izolację, oczyszczanie i charakterystykę wybranych aminopeptydaz z nasion i siewek rzepaku ozimego na kolejnych etapach wzrostu rośliny, jak również syntezę substratów używanych do badań. Świadczy to o **dużej ilości pracy włożonej w realizację założonego celu.** Pani mgr inż. Joanna Kania wykazała się umiejętnością prowadzenia pracy eksperymentalnej, doboru odpowiednich technik badawczych, umiejętnością przedyskutowania otrzymanych wyników na tle literatury przedmiotu i wyciągania wniosków na podstawie otrzymanych wyników. Sposób przeprowadzenia dyskusji świadczy o dojrzałości badawczej Doktorantki. Część przedstawionych wyników badawczych była podstawą publikacji naukowych w renomowanych czasopismach (Doktorantka jest pierwszym autorem), a część z nich zapewne czeka jeszcze na publikację.

Reasumując, stwierdzam, że praca doktorska pt. „Aminopeptydazy z rzepaku – charakterystyka i wpływ wybranych czynników na ich aktywność” **spełnia ustawowe wymagania** określone w art.13 ust.1 Ustawy z dn. 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65, poz.595, z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Chemicznego, Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Kani do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Beata Kijewska