

Toruń, 15.04.2022 r.

dr hab. Emilia Wilmowicz, prof. UMK  
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii  
Instytut Biologii  
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
ul. Lwowska 1  
87-100 Toruń

## RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Sylwii Klińskiej

„Charakterystyka biochemiczna oraz określenie roli w remodelowaniu fosfolipidów  
wybranych acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid”

Praca doktorska Pani mgr Sylwii Klińskiej to efekt podjęcia głęboko uzasadnionych, a zarazem ambitnych badań wnoszących nową wiedzę na temat regulacji gospodarki lipidowej u roślin. Dysertacja jest poświęcona scharakteryzowaniu procesu remodelowania lipidów, w którym kluczową rolę odgrywają acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (LPAT) odpowiedzialne za edycję grup acylowych. Doktorantka wybrała do badań *Camelina sativa* L. (Inicznik pospolity), ponieważ jako roślina oleista, której nasiona dodatkowo zawierają białka o dobrym składzie aminokwasowym, ma duże znaczenie przemysłowe. Gatunek ten charakteryzuje również szereg cech agronomicznych, m.in. odporność na niską temperaturę i patogeny, co ogranicza konieczność stosowania kosztownych zabiegów agrotechnicznych i w konsekwencji zmniejsza wysokość nakładów finansowych związanych z jego uprawą. Poznany genom oraz łatwość uzyskania roślin transgenicznych sprawiają, że zdecydowana większość dotychczasowej wiedzy na temat regulacji przemian lipidowych u roślin dotyczy *Arabidopsis thaliana*. Gatunek ten został wykorzystany jako model eksperymentalny we wcześniejszych badaniach zespołu naukowego, który pod kierownictwem Pana prof. dr. hab. Antoniego Banasia, odkrył, że białka LPAT mogą być modulatorami procesów wzrostu u roślin. Te wyniki zostały opublikowane w 2017 r. w prestiżowym czasopiśmie *Plant Physiology*. W związku z tym, że odkryte mechanizmy mogą być jedynie częściowo specyficzne gatunkowo, coraz częściej poszukuje się nowych modeli badawczych, zwłaszcza wśród gatunków uprawnych o znaczeniu utylitarnym, a w ten trend doskonale wpisuje się *C. sativa*. Dlatego badania dotyczące metabolizmu lipidów u tego gatunku kontynuowane są w ramach kierowanego przez Pana prof. dr. hab. Antoniego Banasia grantu OPUS13 (2017/25/BNZ3/00721), w którego realizację Pani mgr Sylwia Klińska była zaangażowana.

Celem podjętych badań była charakterystyka biochemiczna oraz określenie preferencji substratowych enzymów LPAT w wybranych wegetatywnych i generatywnych organach *C. sativa*, a także określenie wpływu warunków uprawy na modyfikacje lipidów. Podjęcie przez Doktorantkę tych badań jest trafne i w pełni uzasadnione.

## Struktura pracy – ocena formalna

Przedłożona do recenzji dysertacja ma postać bardzo obszernego tomu liczącego 269 stron. Zawiera ona 47 rycin i 17 tabel. Część wyników Autorka zaprezentowała na 5 rycinach i w 5 tabelach dołączonych do pracy w formie aneksu. Rozprawa doktorska została napisana zrozumiałym, naukowym językiem, jest przygotowana w sposób klasyczny i zawiera wszystkie elementy charakterystyczne dla dysertacji. Rozpoczyna ją zwięzłe streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów i terminów, krótkie wprowadzenie z najważniejszymi, przejrzyste sformułowanymi celami badawczymi, źródła finansowania badań oraz wykaz 4 artykułów eksperymentalnych, w których Doktorantka opublikowała większość wyników prezentowanych także w niniejszej dysertacji. Obszerny wstęp, będący świadectwem znajomości literatury przedmiotu przez Autorkę, poprzedza rozdział zawierający opis wykorzystanych podczas realizacji pracy materiałów i metod badawczych. Najobszerniejszą częścią dysertacji są wyniki zaprezentowane na 97 stronach. Następnie, po rozbudowanej dyskusji znajduje się rozdział ze zwięzłym podsumowaniem uzyskanych wyników. Pracę wieńczy wykaz literatury obejmujący 217, głównie anglojęzycznych pozycji.

## Ocena merytoryczna

Treści dotyczące procesu remodelowania fosfolipidów zawarte w krótkim *Wprowadzeniu* prawidłowo uzasadniają tematykę badań podjętych przez Doktorantkę. Zarówno nadrzędny cel pracy, jak i cele szczegółowe, zostały dobrze oraz przejrzyste sformułowane. Obejmują one charakterystykę biochemiczną, wraz z określeniem preferencji substratowych oraz aktywności w reakcjach typu *forward* oraz *backward* enzymów acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT) obecnych w wybranych wegetatywnych i generatywnych organach *C. sativa*, a także zbadanie wpływu warunków uprawy roślin i stresu temperaturowego na proces modyfikacji fosfolipidów zachodzących w różnych tkankach u tego gatunku. Precyzyjnie wyszczególnione w tej części dysertacji zadania cząstkowe, wskazują na dogłębne przemyślenie i opracowanie przez Autorkę szczegółowego planu badań, którego realizacja pozwoliła na wzorowe osiągnięcie wytyczonych celów.

W syntetycznie napisanym, wartościowym *Przeglądzie literatury*, Autorka zamieściła ogólne informacje dotyczące lipidów, omówiła syntezę kwasów tłuszczowych i scharakteryzowała glicerolipidy. Doktorantka wiele miejsca poświęciła opisowi budowy, roli oraz alternatywnym ścieżkom syntezy fosfolipidów i glikolipidów. Ponadto scharakteryzowała lipidy neutralne z uwzględnieniem triacylogliceroli. Omówiła również modyfikacje fosfolipidów i galaktolipidów zachodzące wskutek ich remodelowania oraz potencjalne enzymy katalizujące te przemiany. Z uwagi na podjętą w dysertacji tematykę badawczą niezwykle cenne są podrozdziały, w których Autorka szczegółowo scharakteryzowała LPLAT z podziałem na grupy, w których kryterium przyporządkowania enzymów stanowi ich szczególna specyficzność względem jednego z akceptorów grup acylowych. Ostatnie dwa podrozdziały tej części pracy poświęcono charakterystyce *C. sativa* z uwzględnieniem właściwości oraz możliwości wykorzystania tego gatunku w badaniach naukowych. *Przegląd literatury* został bardzo starannie i logicznie opracowany, uwzględnia najnowsze dane na temat regulacji

gospodarki lipidowej i wytycza nowe, ambitne nurty badań dla zespołów badawczych specjalizujących się w tematyce lipidów roślinnych.

Do realizacji zamierzonych celów Doktorantka wykorzystwała bardzo szeroką gamę technik, co jest zrozumiałe i konieczne, biorąc pod uwagę mnogość analizowanych wątków. Są to techniki biologii molekularnej, metody biochemiczne, analizy instrumentalne oraz te, prowadzone z użyciem narzędzi bioinformatycznych. Autorka opisała je w jasny, jednoznaczny i wyczerpujący sposób w podrozdziałach *Materiały* i *Metody*. Ta część dysertacji pozwala bardzo wysoko ocenić biegłość warsztatową Pani mgr Sylwii Klińskiej oraz Jej kompetencje w prawidłowym doborze i opanowaniu technik badawczych.

Wyniki zaprezentowane w dysertacji doktorskiej wskazują, że wytyczone cele zostały wzorowo osiągnięte. Pani mgr Sylwia Klińska wykazała, że w nasionach, liściach i korzeniach *C. sativa* występują enzymy, które odpowiadają za syntezę/remodelowanie fosfatydylocholiny (LPCAT, – acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina), kwasu fosfatydowego (LPAAT – acylotransferazy acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy) oraz fosfatydyloetanolaminy (LPEAT – acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina). Autorka określiła optimum temperaturowe oraz zakres pH, przy których enzymy te wykazują najwyższą aktywność w nasionach. Odkryła także, że aktywność enzymatyczna LPEAT może być modulowana przez jony magnezu, wapnia i potasu. Wszystkie z analizowanych przez Doktorantkę enzymów LPLAT obecne w nasionach preferują jako donory kwasów tłuszczowych acylo-CoA z 18-węglowymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi. Kolejnym osiągnięciem jest wykazanie zależności między aktywnością enzymatyczną LPLAT w stosunku do poszczególnych donorów grup acylowych zmieniającą się w nasionach będących w różnym stadium rozwoju. W mojej opinii ważnym było odkrycie, że enzymy LPCAT pełnią kluczową rolę w transferze nienasyconych kwasów tłuszczowych z fosfatydylocholiny do puli acylo-CoA, z której mogą być wykorzystane przez pozostałe acylotransferazy zaangażowane w biosyntezę lipidów zapasowych oraz remodelowanie lipidów błonowych. Z kolei udział enzymów LPAAT oraz LPEAT w suplementacji puli acylo-CoA jest niski. Stosując metody chromatograficzne Doktorantka udowodniła, że warunki uprawy roślin determinują skład kwasów tłuszczowych oraz zawartość i skład poszczególnych klas lipidów. Ponadto wykazała, że zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, aktywność transkrypcyjna genów kodujących LPEAT nie jest skorelowana z aktywnością samych enzymów, które wykazują wyższą aktywność enzymatyczną w liściach roślin uprawianych *in vitro*. Obserwacje Doktorantki wskazują, że wyniki badań dotyczące profilu lipidowego oraz metabolizmu lipidów otrzymane na podstawie eksperymentów przeprowadzonych dla roślin uprawianych w warunkach *in vitro* nie oddają przemian zachodzących u roślin uprawianych w warunkach *in vivo*, a co za tym idzie nie mogą mieć także bezpośredniego przełożenia na rośliny uprawiane w warunkach naturalnych. Intensywność remodelowania fosfolipidów oraz udział w tym procesie enzymów LPLAT, fosfolipaz i acylotransferaz fosfolipid:diacyloglicerol (PDAT) zależy od klasy fosfolipidów podlegających modyfikacjom, tkanki w której zachodzą, warunków uprawy roślin oraz temperatury otoczenia. Doktorantka ujawniła nowe fakty dotyczące fizjologicznej roli enzymów LPEAT, które w odpowiedzi na działanie temperatury mogą modyfikować swoją specyficzność substratową i w ten sposób pełnić w roślinie rolę swoistych czujników stresu

termicznego. Cennym było sklonowanie genów kodujących poszczególne izoenzymy LPEAT, ich analiza filogenetyczna oraz wykazanie, że ekspresja poszczególnych izoform jest różna organowo. Stosując system drożdżowy Autorka dokonała także charakterystyki biochemicznej LPEAT oraz preferencji substratowych w zależności od temperatury. Wszystkie zaprezentowane w dysertacji wyniki stanowią nowość naukową i mają duży ciężar gatunkowy.

W rozdziale *Dyskusja* Doktorantka analizuje najważniejsze wyniki własnych badań i konfrontuje je z danymi opublikowanymi we współczesnej literaturze przedmiotu. Wyciągnięte wnioski świadczą o dużej dojrzałości naukowej Autorki. Ta część pracy jest bogata w wątki, wielokierunkowa, wyczerpująca i oceniam ją bardzo wysoko. Recenzowana praca spełnia pod względem merytorycznym wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Pracę wieńczy podsumowanie wyników, z których Doktorantka trzynaście uznała za najistotniejsze.

Przedłożona do recenzji praca nie jest wolna od drobnych błędów literowych, nieprecyzyjności i niezręczności stylistycznych oraz interpunkcyjnych. Jednak nie umniejszają one walorowi naukowemu oraz wartości pracy i osiągnięć jej Autorki.

#### **Wniosek końcowy**

Przedstawiona przez Panią mgr Sylwię Klińską dysertacja doktorska stanowi bardzo ważny element działań naukowych biotechnologów roślin zmierzających w kierunku kompleksowego poznania mechanizmu regulującego metabolizm lipidów. Autorka pracy dokonała niezwykle ważnych ustaleń, które jednocześnie pozwoliły na wytyczenie nowych kierunków badawczych na przyszłość. Prezentowane wyniki są liczne i oryginalne. Recenzowana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, o których mówi artykuł 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595; z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne UG o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Klińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

#### **Wniosek o wyróżnienie**

Umiejętność postawienia przez Doktorantkę pytania naukowego, wytyczenie drogi zmierzającej do uzyskania odpowiedzi na to pytanie, realizacja szeregu poprawnie zaplanowanych eksperymentów, przy zastosowaniu starannie dobranych podejść doświadczalnych, zaowocowało uzyskaniem wyników badań, które wzbudziły międzynarodowe zainteresowanie. Potwierdza to fakt, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały opublikowane aż w czterech pracach eksperymentalnych w bardzo prestiżowych periodykach naukowych o zasięgu światowym. Ukazuje to wysoki poziom naukowy wykonanych badań. W każdej z prac Pani mgr Sylwia Klińska jest pierwszym autorem. Powyższe jest podstawą do wyróżnienia dysertacji doktorskiej stosowną nagrodą, o co wnoszę do Szanownego Gremium Rady Instytutu.

dr hab. Ewelina Wiluszewska