

Ewa Świeżewska

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Sylwii Klińskiej
pt.: „Charakterystyka biochemiczna oraz określenie roli w remodelowaniu fosfolipidów wybranych acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid”

Przedmiot rozprawy i jego znaczenie naukowe

Przedmiotem badań opisanych w ocenianej rozprawie jest dokonanie charakterystyki biochemicznej i ocena roli enzymów z grupy acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT) w utrzymaniu homeostazy lipidów w komórkach roślin licznika siewnego *Camelina sativa*. Badania opisane w rozprawie mieszczą się w obszarze badań podstawowych - biologia komórki i biochemia roślin, a równocześnie mają one istotny potencjał aplikacyjny – wykorzystanie uzyskanych wyników w celu zwiększenia udziału surowców odnawialnych w różnych gałęziach gospodarki, takich jak energetyka, przemysł chemiczny, przemysł farmaceutyczny i równoczesnej minimalizacji konsumpcji surowców kopalnych. Jednym z silnie promowanych kierunków działań są biopaliwa. Komponentem głównym tych materiałów są pochodne kwasów tłuszczowych pozyskiwanych z roślinnych triacylogliceroli, syntetyzowanych w komórce dzięki aktywności szeregu enzymów tworzących złożoną i nie do końca poznaną sieć metaboliczną – jednym z jej elementów są także LPLATy. Te aplikacyjne aspekty prowadzonych badań podkreślają znaczenie ocenianej rozprawy. Równocześnie rangę projektu podkreśla wykorzystanie, jako modelu badawczego, rośliny *Camelina sativa* – rośliny oleistej cechującej się wysoką zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, opisaną w literaturze jako potencjalne źródło kwasów tłuszczowych o rybo-podobnym profilu. *C. sativa* jest także wykorzystywana jako źródło innych cennych metabolitów (polihydroksymaślan, woski). Co więcej - jest rośliną o wysokiej zdolności adaptacyjnej do niekorzystnych warunków środowiskowych. *C. sativa* jest słabo scharakteryzowana na poziomie molekularnym i biochemicznym, co nie dziwi ze względu na heksaploidalną strukturę genomu. Jednak dostępność danych genomowych i transkryptomicznych (*C. sativa* DH55) stanowi ważny atut w planowaniu projektów z wykorzystaniem tego modelu.

Recenzowana rozprawa została przygotowana w Zakładzie Biochemii Roślin Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem promotora - prof. dr hab. Antoniego Banasia i promotora pomocniczego – pani dr Katarzyny Jasienieckiej-Gazarkiewicz, wybitnych ekspertów w obszarze badań nad metabolizmem lipidów acylowych u roślin. Taka opieka promotorska gwarantowała pomyślną realizację zaplanowanych badań.

Cele rozprawy i zastosowane metodyki badawcze

Celem badań opisanych w rozprawie była charakterystyka biochemiczna wybranych enzymów z grupy LPLAT w nasionach oraz tkankach wegetatywnych *C. sativa* z uwzględnieniem ich aktywności w reakcjach typu *forward* i *backward* oraz ocena roli tych enzymów w procesie remodelowania profilu fosfolipidów. Równoległym celem było zweryfikowanie, czy enzymy LPLAT mogą pełnić rolę w adaptacji rośliny do zmian temperatury otoczenia. W tym kontekście badano LPEAT wyrażane w heterologicznym układzie drożdżowym.

Równocześnie, postawionym w rozprawie zadaniem było określenie względnych udziałów LPAT vs fosfolipazy A2 i PDAT (acylotransferazy fosfolipid:diacyloglicerol) w reakcji przenoszenia kwasów z fosfolipidów do puli acylo-CoA.

Cele pracy ujęte są opisowo w rozdziale pt. *Wprowadzenie i cele pracy*. Dla wygody recenzenta, ale także ze względu na organizację kolejnych rozdziałów rozprawy, użyteczne byłoby zestawienie celów pracy w formie krótkiej listy punktów – proszę o przedstawienie takiej listy w czasie obrony.

Zakładane w projekcie cele zostały w pełni zrealizowane i, co niezwykle ważne, w znaczącej części już opublikowane w czterech pracach opublikowanych w czasopismach z listy JCR: *Planta* 2019 i 2020, *Int. J. Mol. Sci.* 2021 oraz *Cells* 2021 – są to czasopisma specjalistyczne o dobrej reputacji naukowej. Doktorantka jest pierwszą autorką wszystkich tych prac. Ponadto, Kandydatka jest współautorką trzech innych publikacji (PubMed 2022.04.14)

Realizując projekt Doktorantka zastosowała dużą paletę metod biochemicznych, analitycznych, biologii komórki, metod molekularnych i syntezy organicznej. Metody te dobrane są właściwie, spełniają standardy właściwe dla projektów z zakresu tematycznego rozprawy, ich zastosowanie pozwoliło na realizację zakładanych celów.

Najważniejsze uzyskane wyniki i uwagi krytyczne

Wyniki opisane w rozprawie dokumentują, iż program badań zrealizowany przez Doktorantkę został dobrze przemyślany i uporządkowany, jest także uzasadniony wynikami uprzednio opublikowanymi przez członków Zespołu oraz danymi literaturowymi.

Za najważniejsze wyniki uzyskane przez Doktorantkę uważam:

- - wstępną charakterystykę biochemiczną enzymów LPCAT, LPAAT oraz LPEAT w nasionach, liściach i korzeniach *C. sativa* (określenie optimum pH i temperatury oraz preferencji substratowych) oraz wykazanie roli LPLAT w remodelowaniu puli fosfolipidów vs. cytoplazmatycznej puli acylo-CoA (komentarz niżej);
- - ilościową ocenę efektywności remodelowania puli acylo-CoA vs. fosfolipidy;
- - pokazanie zależności profilu gromadzonych lipidów od warunków wzrostu roślin *C. sativa*;
- - sugestia roli LPEAT w odpowiedzi roślin na stres cieplny („czujniki reagujące na zmiany temperatury, prowadzące do modyfikacji profilu kwasów tłuszczowych PE”).

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę, jak każdy interesujący projekt badawczy, prowokują do dyskusji.

Lista najistotniejszych pytań i sugestii poniżej:

- 1) Wykonana w projekcie szczegółowa charakterystyka biochemiczna enzymów LPLAT przeprowadzona została dla frakcji mikrosomalnej co niesie za sobą duże ograniczenia interpretacyjne, które zresztą Kandydatka w pracy omawia (m.in. współobecność innych enzymów o nakładającym się profilu specyficzności substrat/produkt, fakt iż każda z izoform CsLPCAT, CsLPAAT oraz CsLPEAT jest kodowana przez trzy warianty genów). Jak zdaniem Doktorantki można by uzupełnić paletę doświadczeń, aby te wątpliwości zniwelować?

- 2) Jednym z wątków badań jest konkurencja o substrat pomiędzy LPLAT w reakcji *backward* a fosfolipazą A2 i PDAT. Czy można pokusić się o (spekulatywną nawet) ocenę względnych udziałów tych enzymów? Jaki mechanizm i jakie czynniki (środowiskowe?) modulują tę równowagę?
- 3) Zmiana profilu lipidów w zależności od warunków hodowli tłumaczona jest, i słusznie jak sądzę, warunkami stresowymi. A jaki efekt może wywoływać obecność w pożywce sacharozy (2%) – co wiadomo o sygnalingu cukrowym w kontekście badanych szlaków? [Zhai et al. 2021; Anaokar et al, 2021]. Dlaczego hodowle *in vitro* *C. sativa* prowadzono nie w pudełkach do hodowli a w wersji „zanurzeniowej” – te warunki powodują niedotlenienie roślin.
- 4) Czy analizowano profil acylolipidów w korzeniach *C. sativa*? Mimo, że LPLATy pochodzące z tej tkanki były charakteryzowane w rozprawie nie znalazłam tych danych.
- 5) Ocena wpływu stężenia kationów w teście enzymatycznym opisana w rozprawie nie jest łatwa do interpretacji ze względu na obecność endogennej ich puli we frakcji mikrosomalnej. Zastosowanie czynnika chelatującego endogenne kationy (np. EDTA) mogłoby pomóc określić stężenie jonów w mieszaninie inkubacyjnej. Czy podjęto takie próby?
- 6) BSA (jako substytut białka wiążącego acylo-CoA, ACBP) był zastosowany w stężeniu 0,2mg/probówkę. Z przewijających się w tekście danych wynika, że całkowita ilość białka pochodzącego z frakcji mikrosomalnej wynosiła ok 2 µg/probówkę, a zatem użyte 200 µg BSA znacznie tę ilość przewyższa i może wywołać efekty nieswoiste. Jak może to wpływać na uzyskane wyniki? Czy rekombinowany ACBP nie jest dostępny?
- 7) W doświadczeniach, których celem była optymalizacja czasu i temperatury inkubacji zabrakło danych dla mikrosomów izolowanych z drożdży szczepu wyjściowego transformowanego pustym plazmidem ($\Delta ALE1$ + pDEST) – czy prowadzono takie kontrole?

Forma pracy

Od strony formalnej rozprawa przygotowana jest w klasycznym układzie rozdziałów: *Streszczenie* w j. polskim i angielskim, *Wykaz skrótów*, *Wprowadzenie i cele pracy*, *Przegląd literatury*, *Materiały*, *Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Podsumowanie*, *Piśmiennictwo*, *Aneks*.

W *Streszczeniu*, podobnie jak w *Podsumowaniu* brak krótkiej konkluzji – co Doktorantka uważa za główne osiągnięcie swojej pracy. Prosiłabym o taką informację w formie krótkich stwierdzeń (1-2) w czasie obrony.

Rozdział *Wprowadzenie i cele pracy* ujęty jest nietypowo, w formie niemal popularno-naukowej, bez cytowań literaturowych. Cel pracy ujęty jest opisowo. Rozdział ten zamyka wykaz 4 opublikowanych prac, które zawierają wyniki opisane w rozprawie.

Rozdział *Przegląd literatury* jest opracowany szczegółowo, dostarcza informacji potrzebnych do zrozumienia prowadzonych badań, zawiera ilustracje graficzne ułatwiające śledzenie omawianych złożonych ścieżek metabolicznych. Brakuje w tej części rozprawy krótkiej wzmianki o Acyl-CoA Binding Proteins, ACBP, zwłaszcza, że białko to jest wzmiankowane w rozdziale *Wyniki*. Proszę, aby Doktorantka w czasie obrony przedstawiła syntetyczne podsumowanie wiedzy literaturowej na temat ACBP i możliwych interakcji z badanymi procesami.

Jeśli się nie mylę w rachunkach - wzory strukturalne kwasów tłuszczowych (Rys 1) pozbawione są jednej grupy metylenowej CH₂.

Rozdział *MATERIAŁY* opracowany jest bardzo starannie, jednak nie znalazłam tu informacji o pochodzeniu lizofosfolipidów ani ich eterowych analogów.

Rozdział *METODY* opisany jest także szczegółowo. Metodyczne aspekty pracy budzące podziw to separacja zarodków (z 300-400 nasion/próbę) czy wykorzystanie dziesięciu znakowanych substratów [¹⁴C]acylo-CoA. Nasuwające się pytanie dotyczy analizy estrów kwasów tłuszczowych – czy wykonano analizę GC standardów FAME i zidentyfikowano ich czasy retencji? W rozprawie opisano wyłącznie użycie oprogramowania GCsolution Analysis.

Rozdział *WYNIKI* zawiera bardzo obszerny zestaw danych doświadczalnych, ich opis jest bardzo szczegółowy, w sporej części tekstu niepotrzebnie powielane są niezwykle szczegółowe komentarze do informacji widocznych w formie wykresów/tabel.

W kilku paragrafach rozprawy Doktorantka przytacza wyniki uzyskane wcześniej i opisane w pracy magisterskiej wyraźnie wskazując ich pochodzenie. W moim odczuciu te wyniki należałoby umieścić w wydzielonym paragrafie części wstępnej w rozdziale *Przegląd literatury*.

Rozdział *DYSKUSJA* zawiera omówienie uzyskanych danych w kontekście literatury, jednak spore fragmenty tekstu zawierają podsumowanie wyników – w moim odczuciu tekst byłby łatwiejszy do śledzenia, gdyby te fragmenty skrócić. Być może pomocne byłoby ich opracowanie tabelaryczne/graficzne.

Na rozdział *PODSUMOWANIE* składa się trzynaście rozbudowanych punktów. Jak wspomniałam – proszę, aby Doktorantka wskazała dwa-trzy najważniejsze wyniki opisanych w rozprawie.

W rozdziale *PIŚMIENNICTWO* wymieniono 217 pozycji, w tym 6 prac, których współautorką jest doktorantka. Można zauważyć pewne niekonsekwencje formatowania, np. użycie dużych liter w tytułach prac, nie wszystkie nazwy czasopism pisane są kursywą.

Rozdział *APPENDIX* zawiera pięć tabel i pięć rysunków. Rozprawa napisana jest poprawnym językiem, listę lapsusów językowych i błędów typograficznych oraz kilka dodatkowych pytań i drobnych uwag przekazałam bezpośrednio Autorce.

Konkluzje

Wymienione komentarze i uwagi krytyczne nie wpływają na pozytywną opinię o przedstawianej mi do oceny rozprawie. Uzyskane w pracy wyniki stanowią nowe dane naukowe, a znaczna ich część została opublikowana w czterech pracach eksperymentalnych, których Doktorantka jest pierwszym autorem.

Wniosek końcowy:

Rozprawa zawiera interesujące wyniki posiadające istotny element nowości naukowej. Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Klińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Warszawa, dnia 19 kwietnia 2022r.



Ewa Świeżewska
prof. dr hab.
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Warszawa