

Gdańsk, dnia 10 października 2015 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Katarzyny Jasienieckiej-Gazarkiewicz zatytułowanej:
„Charakterystyka specyficzności substratowej ora określanie funkcji fizjologicznych
wybranych acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid”

Praca doktorska mgr Katarzyny Jasienieckiej-Gazarkiewicz dotyczy analizy wybranych enzymów szlaku metabolicznego biosyntezy lipidów membranowych i zapasowych uczestniczących w przenoszeniu reszty acylowej z acylo-CoA na lizofosfolipidy. Do badań analizy biochemicznej specyficzności substratowej zostały wybrane dwie główne acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipidu (LPLAT) *S.cerevisiae* - Slc1 i Ale1 oraz enzymy *A.thaliana* – LPCAT2, LPEAT1 i LPEAT2. Przeprowadzone analizy wykazały, że enzymy te charakteryzują się istotną specyficznością substratową zarówno względem donora (acylo-CoA) jak i akceptora kwasów tłuszczowych (lizofosfolipidy). Równocześnie acylotransferaza posiadała charakterystyczną dla siebie specyficzność substratową. W pracy przebadano również mutanty insercyjne *A.thaliana* z brakiem aktywności LPEATów. Wyłączenie tych genów bardzo istotnie wpływało na fenotyp roślin. Posiadały one liczne defekty rozwoju, karłowaty fenotyp, obniżenie masy liści i korzenia, zmniejszenie masy produkowanych nasion. Rośliny te charakteryzowały się również zmienionym profilem lipidowym, a całkowita zawartość lipidów była obniżona w porównaniu do roślin kontrolnych. Równocześnie doktorantka wykazała, że działania odwrotne – nadekspresja genów odpowiedzialnych za aktywność LPEATów nie powodowała istotnego zmianu profilu lipidowego. Jednak rośliny w tym przypadku były większe, produkowały większą ilość nasion i posiadały podwyższoną zawartość lipidów w korzeniach. Wynik ten otwiera drogę do dalszych badań nad zwiększeniem wydajności produkcji lipidów w roślinach oleistych i może on mieć istotne znaczenie i zastosowanie przemysłowe. Doktorantka podczas badań zajęła się również problemem

określenia funkcji fizjologicznych wybranych acylotransferaz w drożdżach piekarniczych. Jednak efekty fenotypowe i biochemiczne w tym przypadku były znacząco słabsze. Delecja genu ALE1 i SLC1 powodowała jedynie nieznaczne osłabienie wzrostu nie wpływając istotnie na profil lipidowy. Analogicznie nadekspresja drożdżowych genów kodujących LPLATy oraz nadekspresja genów kodujących LPLATy z genomu *A. thaliana* tylko nieznacznie wpływała na zwiększenie produkowanej biomasy. W przeprowadzonych doświadczeniach na wyizolowanych frakcjach mikrosomalnych, doktorantka pokazała możliwość przebiegu reakcji w kierunku odwrotnym – remodelowania składu kwasów tłuszczowych fosfolipidów i puli acylo-CoA.

Doktorantka w swojej pracy wykorzystwała zarówno metody biologii molekularnej, biotechnologii jak i zaawansowane techniki biochemiczne i chromatograficzne. Wykonała ona klonowania oraz delecje badanych genów w komórkach bakteryjnych, drożdżowych i roślinnych; opanowała metodykę ekstrakcji różnych klas lipidów z badanego materiału; oznaczała aktywność enzymów frakcji mikrosomalnych przy wykorzystaniu znakowanego izotopowo substratu; wykonała analizę składu i określiła profil lipidowy ekstraktów przy pomocy chromatografii gazowej.

Wybrana przez doktorantkę tematyka rozprawy doktorskiej i zainteresowanie syntezą lipidów wynika zapewne z coraz większego znaczenia ukierunkowanej nadprodukcji lipidów w przemyśle biotechnologicznym. Wysokoenergetyczne oleje roślinne są w coraz większym stopniu wykorzystywane w przemyśle paliwowym jako alternatywne źródła energii i paliw. Jednak bardziej powszechne ich wykorzystanie wymaga zwiększenia wydajności ich produkcji przez organizmy roślinne. W swojej pracy doktorantka wskazała jedną z możliwych dróg modyfikacji genetycznych prowadzących do zwiększenia wydajności produkcji lipidów przez rośliny. Oprócz przemysłu energetycznego ukierunkowana synteza lipidów jest coraz częściej wykorzystywana w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym, gdzie mamy zapotrzebowanie na ściśle określone lipidy lub fosfolipidy. Badane przez doktorantkę grupy enzymów nie tylko uczestniczą w procesie syntezy lipidów, ale również odgrywają rolę w transporcie kwasów tłuszczowych do miejsca ich magazynowania, w czym istotną rolę może odgrywać pokazana przez doktorantkę specyficzność substratowa enzymów oraz potwierdzona reakcja odwrotna.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest bardzo rozbudowana i zawiera 226 stron, w tym 40 tabel, 26 rycin i 171 odnośników literaturowych. Praca składa się z siedmiu rozdziałów: przeglądu literatury, materiałów, metod, wyników, dyskusji, wniosków i spisu literatury oraz streszczenia i celu pracy.

W obszernym przeglądzie literatury doktorantka przedstawiła budowę, strukturę i funkcję lipidów. Opisuje proces biosyntezy oraz znaczenie i fizjologiczne funkcje enzymów, którymi zajmowała się w pracy. W rozdziale materiały bardzo szczegółowo zostały przedstawione odczynniki i szczepy wykorzystywane w trakcie badań. Rozdział metody został opisany równie dokładnie. Należy tu podkreślić niezwykłą szczegółowość i dokładność w opisie całej metodyki, umożliwiając jej bezproblemowe odtworzenie przez innych badaczy. Wydaje się, że czasami jest ono nawet zbyt obszerne. Dokładne opisywanie powszechnie używanych technik – jak na przykład elektroforeza agarozowa nie jest konieczny, wystarczyłby odpowiedni odnośnik. W rozdziale tym dokładnie został opisany proces transmetylacji, ale równocześnie nie zostały tak dokładnie podane parametry rozdziałów użyte do rozdziału chromatograficznego - jak na przykład gradient temperatury, czas trwania analizy. Doktorantka w pracy do rozdziału lipidów użyła 60m kolumny typu WAX. Analogiczne analizy estrów metylowych są opisane np. w normie EN 14103:2011 "Produkty przetwarzania olejów i tłuszczów - Estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME) - Oznaczanie zawartości estrów i estru metylowego kwasu linolenowego". Jednak tam zastosowano dwukrotnie krótszą kolumnę o istotnie krótszym czasie analizy. Biorąc pod uwagę ilość wykonanych w pracy analiz chromatograficznych, skrócenie czasu ich wykonywania byłoby istotnym czynnikiem. Kolejny rozdział – wyniki przedstawia dokładnie opisane dane uzyskane z kolejnych doświadczeń i zajmuje aż 104 strony. W rozdziale większość przeanalizowanych i przeliczonych danych została zaprezentowana w postaci tabel i rycin. Są to dane wynikowe, zabrakło mi jednak w tej części chociażby przykładowych danych źródłowych – np. kilku przykładowych chromatogramów, na podstawie których obliczano zawartość lipidów. Ułatwiłyby one czytanie tych rozdziałów. Jako wzorca wewnętrznego w analizach doktorantka użyła estru C17. W cytowanej wcześniej normie został on zamieniony na C19. Wynikało to między innymi z faktu, że w obszarze C16-18 mamy dużą liczbę pików i istnieje ryzyko nakładania się pików ze wzorcem wewnętrznym. Prosiłbym o wyjaśnienie dotyczące rozdziału pików w tym obszarze, jaki uzyskała doktorantka.

Wszystkie wyniki zaprezentowane przez doktorantkę i przedstawione w tabelach są obarczone bardzo małym błędem- +/- co najwyżej kilka procent. Świadczy to o bardzo precyzyjnej pracy oraz doświadczeniu operatora w pracy laboratoryjnej. Część analiz posiada błąd nawet +/- 0,0%. Prosiłbym o wyjaśnienie czy błąd jest liczony jako błąd niezależnych analiz przeprowadzonych od samego początku (np. hodowli roślin), czy jest to błąd powtarzalności analizy chromatograficznej? Uzyskane wyniki zostały podsumowane w rozdziale dyskusja oraz rozdziale wnioski. Doktorantka wyniki swoich badań streściła w 9 interesujących i nowatorskich wnioskach. Mechanizm prowadzący do efektów wywołanych wyłączeniem lub nadekspresją genów kodujących LPEATy jest nieznany. Prosiłbym o przedstawienie przemyśleń doktorantki dotyczących możliwości i sposobu jego poznania w przyszłych badaniach.

Przestawiona praca jest pracą obszerną i zawiera tylko nieliczne błędy. Na przykład kilka rozdziałów (3.13, 3.22) zajmuje inne pozycje w stosunku do spisu treści.

Powyższe uwagi i pytania w żaden sposób nie obniżają wartości merytorycznej pracy. Podsumowując należy podkreślić, że w swojej pracy doktorantka uzyskała założone przez siebie cele, a nawet je przekroczyła. W pracy umiejętnie połączono i zinterpretowano wyniki otrzymane dzięki zastosowaniu bardzo różnorodnych technik badawczych. Uzyskane wyniki mają istotne znaczenie naukowe oraz mogą mieć zastosowanie w biotechnologii przemysłowej.

Moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Katarzyny Jasienieckiej-Gazarkiewicz zatytułowanej: „Charakterystyka specyficzności substratowej oraz określanie funkcji fizjologicznych wybranych acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid” jest bardzo wysoka. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego mgr Katarzyny Jasienieckiej-Gazarkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną pracy, solidność i różnorodność uzyskanych wyników wnioskuję o jej wyróżnienie.



Prof. UG, dr hab. Bogdan Banecki

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego