



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin
dr hab. Dariusz Latowski

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Ady Połońskiej

pt. „Identyfikacja acylotransferaz lizofosfolipidów okrzemka *Phaeodactylum tricornutum* oraz charakterystyka tych zidentyfikowanych ze szczególnym uwzględnieniem acylotransfereazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina”

Promotorem jest Pan Prof. dr hab. Antoni Banaś

Promotorem pomocniczym jest Pani dr Katarzyna Jasieniecka-Gazarkiewicz

1. Podstawa prawna: pismo N002/2024/35 Pana dr. hab. Mariusza Grinholca, prof. UG, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego z dnia 28 lutego 2024 roku dotyczące przygotowania poniższej recenzji.

2. Ogólna ocena

Rozprawę doktorską Pani mgr Ady Połońskiej oceniam jako bardzo dobrą i wnioskuję do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

3. Ocena szczegółowa – najmocniejsze i najsłabsze strony pracy

Już sam wybór tematyki badawczej realizowanej w ramach pracy doktorskiej zasługuje na uznanie zarówno w aspekcie potrzeby badań podstawowych w tym obszarze jak i badań o wyraźnym charakterze aplikacyjnym. Doktorantka jest w pełni świadoma konieczności zaspokojenia tych potrzeb i doskonale prezentuje tę świadomość we wstępie swojej pracy doktorskiej zaznaczając, że „U okrzemek mechanizm biosyntezy poszczególnych klas lipidów nie jest na chwilę obecną do końca poznany”. Fakt względnie słabo poznanej syntezy kwasów tłuszczowych u okrzemek jest w rzeczywistości fundamentalnym uzasadnieniem wyboru tematyki, ale także podkreśleniem istotności tematu badawczego. Okrzemki są nie tylko jedną z grup glonów, ale są jedną z najistotniejszych grup glonów dla podtrzymania życia na Ziemi w znanej nam formie. Jest tak ze względu na ich wysoki udział w pochłanianiu CO₂, a tym samym w stabilizowaniu klimatu. Biorąc pod uwagę, że w wyniku działań człowieka ekosystemy leśne przestają spełniać funkcję tzw. zielonych płuc ziemi, bo roczna ilość pochłanianego przez nie CO₂ za około 25 lat zrówna się z ilością

CO₂ przez nie widzialnego, życie na Ziemi w coraz większym stopniu zaczyna opierać się na ekosystemach wodnych, w których udział okrzemek jest kluczowy. Okrzemki są nie tylko bazowym biostabilizatorem klimatu czy poziomu tlenu i dwutlenku węgla w atmosferze, ale są też pierwotnymi producentami cennych kwasów tłuszczowych z grupy niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), w tym szczególnie poszukiwanych kwasów eikozapentaenowy (EPA) i dokozaheksaenowy (DHA). Powyższe fakty przynaglają więc badaczy z dyscyplin nauk biologicznych do pilnego zgłębiania wiedzy na temat biochemicznych aspektów syntezy lipidów w okrzemkach. W ten światowy trend badań doskonale wpisują się badania prowadzone przez mgr Adę Połońską i zespół w którym pracuje. O istotności tych badań świadczyć też może fakt, że są prowadzone we współpracy z Instytutem Badawczym Roślin Oleistych, Chińskiej Akademii Nauk Rolniczych (Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences) i finansowane były z projektu NCN.

Należy również zaznaczyć, że poza udowodnioną we wstępie świadomością potrzeb badania okrzemek, w tym ich biochemii lipidów, wstęp stanowi cenne opracowanie porządkujące wiedzę z omawianego zakresu. Szczególnie doceniam wnikliwą analizę wiedzy na temat syntezy kwasów tłuszczowych okrzemek i jej konfrontację z tym, co w tej tematyce wiadomo u innych organizmów. Bardzo wartościowym aspektem wstępu jest też rozdział „Wykorzystanie inżynierii genetycznej do produkcji VLC-PUFA w roślinach wyższych”. Wstęp nie tylko obrazuje obszerną wiedzę pani mgr Ady Połńskiej o syntezie lipidów w różnych organizmach, ale też jej biotechnologicznym zastosowaniu i związanych z tym problemach. Ponadto Doktorantka stosuje właściwą i świetnie ugruntowaną w literaturze argumentację podjętych poszczególnych wartościowych badań. Zatem cel badań i jego uzasadnienie, w moim odczuciu należy uznać, za jedną z mocnych stron pracy.

Kolejną bardzo mocną stroną pracy jest różnorodność oraz wielość zastosowanych metod i technik badawczych a także koncepcja planu badań.

Bardzo mocną stroną pracy są wreszcie uzyskane wyniki. Identyfikacja i charakterystyka okrzemkowej acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina (PtLPCAT1), wraz ze wskazaniem jej roli w biosyntezie EPA jest istotnym osiągnięciem naukowym ważnym zarówno dla wielu dziedzin nauki (biologia, medycyna, nauki o żywieniu) jak i przemysłu m. in. spożywczego i farmaceutycznego.

Warto wspomnieć o zakresie badań związanych z charakterystyką PtLPCAT1. Nie tylko testowano aktywność tego enzymu przy zmieniających się parametrach reakcji, ale badano również jego aktywność i specyficzność substratową w stosunku do różnych donorów i akceptorów kwasów tłuszczowych a nawet preferencję w stosunku do pozycji sn-1 i sn-2 lizofosfatydylocholin w reakcjach typu forward. Bardzo cenne są też wyniki badań nad PtLPCAT1 w aspekcie remodelowania lipidów.

Poza bardzo rozbudowanym zestawem eksperymentów, które określiłbym jako modelowe, ze względu na ich przebieg w układach *in vitro*, Doktorantka otrzymała też transgeniczne rośliny realizując tym samym bardzo interesujące w założeniach doświadczenie z wykorzystaniem dwóch typów konstruktów, każdy w opcji z i bez genu PtLPCAT1, aby zapewnić potencjalną możliwość weryfikacji wpływu enzymu PtLPCAT1 na ewentualną biosyntezę EPA w transgenicznym *A. thaliana*. Mimo, iż w pracy ostatecznie nie udało się istotnie zwiększyć produkcji EPA w transformowanej roślinie, to zaprezentowano wiele nowych faktów, które wydają się ten wzrost produkcji EPA w roślinach przybliżać. Szczególnie doceniam zawarte w dyskusji rozważania na temat roli PtLPCAT1 w syntezie EPA. Doktorantka wskazuje, że dzięki znaczącej aktywności PtLPCAT1 w stosunku do 20:4-CoA n-3, enzym ten może potencjalnie eliminować wąskie gardło ograniczające wydajną biosyntezę EPA w tym w przyszłości w transgenicznych roślinach oleistych. Rozważania te są w pełni uprawnione. Doktorantka poza identyfikacją i charakterystyką okrzemkowej PtLPCAT1 dokonała jeszcze analizy porównawczej aktywności i specyficzności tego enzymu z enzymami LPCAT pochodzącymi z rozwijających się nasion *Camelina sativa*, m. in. w stosunku do 20:4-CoA n-3, względem którego aktywność LPCAT z *C. sativa* była niemal niezauważalna. Dodatkowo Doktorantka wykazała m. in. że PtLPCAT1 charakteryzuje się wysoką aktywnością w stosunku do 20:4-CoA n-3, ale niską w stosunku do 20:4-CoA n-6, co sugeruje lepsze wykorzystywanie tego pierwszego do biosyntezy EPA, co jak zaznaczyła jest zgodne z obecnie proponowanym szlakiem biosyntezy EPA u *P. tricornutum*.

Przy okazji należy bardzo wysoko ocenić jakość dyskusji naukowej w rozprawie. Jestem pełen uznania za znakomite opracowanie tej części pracy. Autorka nie tylko wykazała się wzorowymi umiejętnościami analitycznymi, dzięki którym dostrzegła i omówiła wszystko, co omówienia wymagało. Wykazała się również wiedzą pozwalającą na bardzo trafne wnioski i interpretacje wyników eksperymentów uwzględniające liczne aktualne publikacje. Co prawda jedna z cytowanych prac, której jestem współautorem, tj. Bojko i wsp., ma podany rok publikacji jeszcze sprzed moich urodzin, ale przy licznych dobrze dobranych i zasadniczo poprawnie cytowanych pracach nie ma to istotnego znaczenia.

To, co zwróciło moją uwagę wśród imponującej liczby wyznaczonych parametrów charakteryzujących omawiane enzymy, to wartość optymalnej temperatury dla aktywności PtLPCAT1, szczególnie w reakcji forward. Doktorantka bardzo poprawnie omawia tę problematykę, zwraca uwagę na wszystkie znane z literatury istotne w tej kwestii szczegóły, w tym niższą o ponad 10°C optymalną temperaturę wzrostu okrzemek, ale nie porusza, w moim odczuciu, w pełni faktu, że źródłem enzymu są frakcje mikrosomalne izolowane z drożdży, drożdży, które hodowano w temperaturze 30°C. Proponuję uwzględnić ten szczegół w aspekcie otrzymanych wyników i potencjalnego mechanizmu działania PtLPCAT1 w komórce. Będę wdzięczny za krótką refleksję na ten temat w czasie obrony. Zastanawia mnie również, czy jeszcze wyższa temperatura optymalna

aktywności PtLPCAT1 w remodelowaniu fosfatydylocholiny nie wskazuje bardziej na rolę PtLPCAT1 w procesach związanych ze śmiercią komórki niż w rzeczywistym remodelowaniu lipidów. Jakie argumenty obalają tę moją wątpliwość? W ocenie pracy nie można też zapomnieć o identyfikacji i charakterystyce nowych okrzemkowych enzymów o aktywności acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (PtLPAAT1 i PtLPAAT2). W kontekście tych rozważań nad potencjalnym wykorzystaniem otrzymanych wyników w formułowaniu hipotetycznego mechanizmu działania PtLPCAT1 w komórce warto też, moim zdaniem, zastanowić się nad bliższą fizjologiczną optymalną temperaturą dla aktywności enzymów PtLPAAT i większej zależności aktywności tych enzymów od zmian temperatury niż w przypadku PtLPCAT1.

Zwieńczeniem licznych i bardzo dobrych prac eksperymentalnych jest część badań związana z transformacją *A. thaliana* pod kątem weryfikacji wzrostu produkcji EPA w transformowanej roślinie. Wspomnianym we wstępie pracy doktorskiej problemem z zastosowaniem roślin transgenicznych w produkcji VLC-PUFA, w tym EPA i DHA jest niska wydajność produkcji tych kwasów. Istnieje hipoteza, że może to być spowodowane wyciszeniem niektórych transgenów z powodu użycia tego samego promotora (USP) do wszystkich trzech genów w konstrukcie genetycznym. W pracy doktorskiej zastosowano ten sam zestaw genów jak w jednej z publikacji opisujących omawianą problematykę, wszystkie geny miały również taki sam promotor, choć inny niż we wspomnianej pracy, bo nie USP a NOS. Dlaczego wybrano taki plan eksperymentu zamiast próby zastosowania konstruktów, w którym geny są pod różnymi promotorami? Moim zdaniem zastosowanie konstruktów, w którym geny są pod różnymi promotorami daje wysokie prawdopodobieństwo weryfikacji omawianej hipotezy negatywnego wpływu wspólnego promotora na wydajność produkcji EPA.

Słabszą stroną pracy jest, moim zdaniem, nadmierna długość rozprawy, która nie jest uzasadniona, bo spowodowana m. in. powtarzaniem niektórych treści, szczególnie tych ze wstępu w dyskusji. Przykładem może tu być ogólny opis *Phaeodactylum tricornutum* zawierający te same informacje w obu rozdziałach rozprawy.

Z drugiej strony mimo długości pracy nie wyjaśniono niektórych drobiazgów związanych z założeniami i przebiegiem eksperymentów pozostawiając je w sferze domysłów czytelnika. Przykładem są eksperymenty pierwszego etapu pracy, w których skupiono się na określeniu funkcji sześciu sklonowanych genów z *P. tricornutum*, które wytypowano, jako potencjalnie kodujące enzymy typu LPLAT. Po pierwsze nie jest dla mnie jasne, kto i jak, tzn. z zastosowaniem jakich narzędzi i baz, wytypował te sześć genów. Zasadniczo wskazane byłoby też podanie baz i numerów dostępu do sekwencji genów według których typowano geny w genomie *P. tricornutum*. Rozdziały od 4.1.1. do 4.1.6, choć opisują bardzo wartościowe eksperymenty, to pozornie wydają się nie zachowywać spójności metodycznej, bo w przypadku produktów genów kodujących enzymy oznaczone jako A, C i G zastosowano uboższy zestaw analiz niż dla enzymów B, D i F, przy czym dla

enzymów B i D ten zestaw analiz był poszerzony o inny zakres niż dla enzymu F. Oczywiście, można się bez większych problemów domyśleć, co jest tego przyczyną, ale wskazane byłoby, aby intencje badawcze Autorki zaistniały w tekście a nie tylko w domysłach czytelnika.

Z pewnością należy zwrócić uwagę na dwa powtarzające się błędy językowe. Okrzemki to grupa organizmów. Liczba pojedyncza to rodzaj żeński, czyli ta okrzemka a nie ten okrzemek. Gdyby okrzemki były rodzaju męskiego, to w dopełniaczu powinno być okrzemków, np. „cechy okrzemków”, „kwasy tłuszczowe okrzemków” a zawsze jest „okrzemek”.

Jedyną poprawną formą jest „spośród” a w pracy chyba zawsze i często jest „z pośród”.

4. Wniosek końcowy

Rozprawa Pani mgr Ady Połońskiej zatytułowana: „Identyfikacja acylotransferaz lizofosfolipidów okrzemka *Phaeodactylum tricornutum* oraz charakterystyka tych zidentyfikowanych ze szczególnym uwzględnieniem acylotransfereazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina” przygotowana pod opieką Pana Promotora, prof. dr hab. Antoniego Banasia we współpracy z Kopromotorem Panią dr Katarzyną Jasieniecką-Gazarkiewicz, spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim w Art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dn. 20 lipca 2018 (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) tj.:

– prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie biotechnologia oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej;

– jej przedmiotem jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego polegającego na:

- identyfikacji trzech enzymów zaangażowanych w metabolizm lipidów okrzemek w tym w szczególności acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina (PtLPCAT1),
- szeroko rozumianej charakterystyce biochemicznej tych enzymów,
- określeniu roli zidentyfikowanej PtLPCAT1 m. in. w remodelowaniu fosfatydylocholiny i potencjalnym udziale w biosyntezie kwasu eikozapentaenowego (EPA).

Wobec powyższego wnioskuję o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Ady Połońskiej i dopuszczenie Doktorantki do dalszych procedur związanych z nadaniem stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.

5. Wniosek o wyróżnieniu pracy wraz z uzasadnieniem

Biorąc pod uwagę istotny wkład pracy doktorskiej w pionierskie badania acylotransferaz lizofosfolipidów okrzemkowych, prowadzenie badań w zespole międzynarodowym, zdobycie finansowania na przeprowadzenie części badań, wystarczający dorobek naukowy Doktorantki, a także spełnione inne wymogi wyszczególnione we wspomnianej wyżej ustawie i Regulaminie wyróżniania

rozpraw doktorskich przez Radę Dyscypliny Biotechnologia UG, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy Pani mgr Ady Połońskiej.

Istotny wkład wspomnianej rozprawy doktorskiej, a zarazem jej wyróżniający się charakter, dostrzegam w:

1. wielopłaszczyznowości przeprowadzonych analiz – zakres badań i zastosowany warsztat metodyczny, w mojej ocenie, znacznie wykraczają poza wymagania wystarczające do otrzymania stopnia doktora;
2. zasadności wyboru tematu i jego istotności dla badań aplikacyjnych i podstawowych, szczególnie w zrozumieniu okrzemkowej biochemii lipidów;
3. znaczeniu uzyskanych wyników.

Za szczególnie znaczące osiągnięcie pracy doktorskiej uważam identyfikację i wnikliwą charakterystykę okrzemkowego enzymu typu LPCAT (preferującego lizofosfatydylocholinę jako akceptor kwasów tłuszczowych) oznaczonego jako PtLPCAT1 oraz identyfikację i charakterystykę dwóch enzymów wykazujących aktywność typu LPAAT (preferujących kwas lizofosfatydowy jako akceptor kwasów tłuszczowych).

Kolejnym znaczącym osiągnięciem są wyniki badań nad specyficznością substratową PtLPCAT1 w stosunku do donorów kwasów tłuszczowych w reakcjach typu forward i backward, sugerujące rolę PtLPCAT1 w biosyntezie EPA.

Zgodnie z moją znajomością obszaru badań realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej Pani mgr Ady Połońskiej wspomniane wyżej wyniki odegrają istotną rolę w wyznaczaniu trendu dalszych badań pozwalających poznać biochemię lipidów okrzemek a być może ułatwią wydajną produkcję EPA.

Ponadto uważam, że praca stanowi bardzo dobry przegląd literatury, który czyni ją cennym źródłem informacji na temat biochemii lipidów okrzemek. Ostatnim, w mojej ocenie, wyróżniającym się aspektem pracy jest dojrzałość dyskusji. Świadczy ona nie tylko o ponadprzeciętnej wiedzy Doktorantki w zakresie omawianego tematu, ale o znakomitej umiejętności wykorzystania tej wiedzy do krytycznej analizy wyników własnych badań, do ich interpretacji i dostrzeżenia tego, co rzeczywiście nowe, przełomowe, warte podkreślenia.

Jurijusz Katoński