



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Biologii
INSTYTUT BIOCHEMII



dr hab. Anna Szakiel, prof. ucz.
Zakład Biochemii Roślin

Warszawa, 2024-04-24

Do Rady Dyscypliny Biotechnologia
Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Ady Połośkiej

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

wykonanej w Zakładzie Biochemii Roślin Instytutu Biotechnologii
Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

pod kierunkiem prof. dr hab. Antoniego Banasia jako promotora oraz dr Katarzyny
Jasienieckiej-Gazarkiewicz jako promotora pomocniczego

Ocena formalna. Przedstawiona do recenzji dysertacja ma układ klasycznej rozprawy doktorskiej przygotowywanej w naukach eksperymentalnych; jest złożona z kolejnych rozdziałów: streszczenia, wprowadzenia i celów pracy, przeglądu literatury, oddzielnie zestawionych materiałów i metod, wyników, dyskusji i wniosków. Rozprawa jest bardzo obszerna - liczy 243 strony, zamieszczono w niej 12 tabel i 48 rycin; ponadto zawiera także suplement z dodatkowymi materiałami nie zamieszczonymi w głównym tekście (8 tabel i 1 ryciny), spis stosowanych skrótów oraz spis cytowanego piśmiennictwa, obejmujący 109 pozycji literaturowych, będących anglojęzycznymi publikacjami z renomowanych czasopism międzynarodowych. Rozprawa jest kompletna, prawidłowo zredagowana, kolejność rozdziałów jest logiczna, a sposób cytowania odnośników literaturowych poprawny i konsekwentny.

Ocena merytoryczna. Zgodnie z tytułem rozprawy, głównymi celami podjętych badań było zidentyfikowanie genów kodujących acylotransferazy lizofosfolipidów okrzemka *Phaeodactylum tricornutum* (pierwotnie wytypowano sześć takich genów), a następnie charakterystyka zidentyfikowanych enzymów, w tym zwłaszcza acylotransferazy acylo-CoA: lizofosfatydylocholina. Badania zostały przeprowadzone w ramach międzynarodowego projektu SHENG 1 („Specyficzność substratowa LPCATów z fotosyntetyzujących glonów jednokomórkowych akumulujących oleje, w reakcjach do przodu i do tyłu oraz charakterystyka ich funkcji w edycji grup acylowych fosfatydylocholiny”, UMO-2018/30/Q/NZ3/00497). Podjęty temat badawczy uważam za bardzo interesujący i wartościowy; gdyż nie tylko zawiera elementy potencjalnie aplikacyjne, ale znacząco poszerza także dotychczasową wiedzę o metabolizmie lipidów, zwłaszcza długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, a przede wszystkim o enzymach katalizujących procesy zachodzące z udziałem tych kwasów.

Rozpoczynający rozprawę wstęp, oparty na przeglądzie dostępnej literatury naukowej, jest bardzo obszerny i stanowi bardzo dobrze zredagowane kompendium wiedzy o budowie, biosyntezie i funkcji kwasów tłuszczowych, triacylogliceroli, fosfolipidów. Doktorantka wykazała się wnikliwą i dogłębną znajomością tematyki związanej z podjętymi badaniami. Scharakteryzowała także modele badawcze, w tym oczywiście okrzemki; wyjaśniła, jakie znaczenie w diecie człowieka mają wielonienasycone kwasy tłuszczowe o bardzo długich łańcuchach (VLC-PUFA), a na koniec przedyskutowała możliwości wykorzystania inżynierii genetycznej do produkcji tych związków w roślinach wyższych. Wstęp teoretyczny został zilustrowany czytelnymi schematami ułatwiającymi zrozumienie opisywanych procesów.

Część metodyczna została podzielona na dwie oddzielne części, w których szczegółowo zostały opisane materiały i zastosowane metody; są one nowoczesne i adekwatnie dobrane do wyznaczonych celów eksperymentalnych. Na podstawie części metodycznej można wnioskować, że w trakcie realizacji swojej rozprawy Doktorantka opanowała wiele technik laboratoryjnych i znacząco wzbogaciła swoje umiejętności eksperymentatorskie. Prowadzone prace obejmowały różne metody biologii molekularnej oraz metody biochemiczne; uważam, że zakres przeprowadzonych badań był naprawdę imponujący. Na szczególne uznanie zasługują wieloetapowe badania enzymatyczne dotyczące specyficzności substratowej oraz remodelowania fosfolipidów, które wymagały

pracochłonnych prac wstępnych (m.in. przygotowania znakowanych izotopowo substratów i izolowania frakcji mikrosomalnej z *S. cerevisiae* jako źródła enzymów) oraz prowadzenia licznych testów enzymatycznych w różnych układach eksperymentalnych. Na uwagę zasługuje też próba uzyskania roślin transgenicznych, wymagająca tworzenia wielogenowych konstruktów genetycznych.

Uzyskane wyniki, przedstawione w postaci tabel i wykresów, zostały szczegółowo omówione i zinterpretowane. Za najważniejsze osiągnięcia recenzowanej rozprawy można uznać:

- scharakteryzowanie aktywności enzymów kodowanych przez geny pochodzące z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum*, co doprowadziło do identyfikacji trzech genów i odpowiadających im enzymów o aktywności acetylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid, w tym acetylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina;
- określenie parametrów aktywności enzymatycznej (m.in. optymalnej temperatury, pH, stężenia jonów wapnia, magnezu i potasu) oraz szczegółowe zbadanie specyficzności substratowej acetylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina zarówno w reakcjach prowadzących do syntezy odpowiednich fosfolipidów (reakcjach typu *forward*) jak i w procesach remodelowania fosfolipidów (reakcjach typu *backward*). Badania te dostarczyły nowych informacji o możliwości przepływu intermediatów przez szlak biosyntezy kwasu eikozapentaenowego oraz zależności intensywności remodelowania fosfolipidów zarówno od rodzaju donora kwasów tłuszczowych, jak i rodzaju remodelowanego fosfolipidu.

Doktorantka przeprowadziła także testy dotyczące specyficzności substratowej zidentyfikowanych acetylotransferaz acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy oraz wspomnianą wcześniej próbę uzyskania transgenicznych roślin *A. thaliana* produkujących wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 o bardzo długich łańcuchach, która, choć nie zakończyła się spektakularnym sukcesem, może stanowić punkt wyjściowy do ewentualnych kolejnych prób.

Rozprawę zamyka bardzo wnikliwa dyskusja, która dowodzi świetnej umiejętności interpretacji uzyskanych wyników – z wykorzystaniem istniejącej wiedzy oraz w odniesieniu do wyników badań z cytowanych źródeł literaturowych.

Jak wspomniałam wcześniej, bardzo wysoko oceniam różnorodność metod zastosowanych przez Doktorantkę w przeprowadzonych przez nią eksperymentach. Mam natomiast pytanie – dlaczego do ekstrakcji lipidów użyto mieszaniny chloroform:metanol w

proporcji 1:2, a nie klasycznej proporcji 2:1 znanej z mieszaniny Folcha? Wydaje się, że użycie znacząco bardziej polarnej mieszaniny z przewagą metanolu może obniżyć oczekiwaną wydajność ekstrakcji niskopolarnych związków.

Jakiego standardu wewnętrznego użyto do oznaczeń ilościowych przeprowadzonych metodą chromatografii gazowej? Doktorantka pisze w rozdziale o Metodach, że dodawano go w znanym stężeniu do każdej badanej próbki, jednak nie precyzuje, co to był za związek. Być może ta uwaga ma jedynie charakter redakcyjny, bo w rozdziale o Materiałach jest wspomniany ester metylowy kwasu heptadekanowego. Jeśli faktycznie ten związek został użyty jako standard wewnętrzny, można było o nim jeszcze raz wspomnieć w opisie metody.

Uwagi te w żaden sposób nie wpływają na ogólną bardzo wysoką ocenę merytoryczną recenzowanej rozprawy.

Wobec niepowodzenia próby uzyskania transgenicznych roślin *A. thaliana* produkujących wielonienasycone kwasy tłuszczowe o bardzo długich łańcuchach chciałabym, żeby Doktorantka podczas publicznej obrony ustosunkowała się do przyszłych perspektyw tych badań. Modelem doświadczalnym były w tym przypadku rośliny *Arabidopsis*, ale czy z praktycznego punktu widzenia nie warto byłoby przeprowadzić analogicznych prób z jakąś typową rośliną oleistą? Gdyby mimo wszystko próby uzyskania roślin transgenicznych produkujących wielonienasycone kwasy tłuszczowe o bardzo długich łańcuchach nie zakończyły się sukcesem, jakie są inne, alternatywne możliwości pozyskiwania tych związków na większą skalę i wprowadzania ich do diety człowieka?

Podsumowując - uważam, że temat podjęty w recenzowanej rozprawie doktorskiej jest ważny naukowo i wartościowy z punktu widzenia aplikacyjnego, zastosowane metody zostały adekwatnie dobrane, doświadczenia prawidłowo zaplanowane i starannie przeprowadzone, a uzyskane wyniki są oryginalne i interesujące.

Doktorantka wykazała się samodzielnością i pracowitością, znajomością różnorodnych technik laboratoryjnych, umiejętnością planowania eksperymentów oraz prezentacji i interpretacji ich wyników, a także doboru i korzystania z literatury naukowej do przeprowadzenia dyskusji.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Ady Połońskiej pt. „Identyfikacja acylotransferaz lizofosfolipidów okrzemka *Phaeodactylum tricornutum* oraz charakterystyka tych zidentyfikowanych ze szczególnym uwzględnieniem acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i wnosi nowe fakty do takich dziedzin jak biochemia i biotechnologia lipidów. Ponadto świadczy o nabyciu dogłębnej wiedzy teoretycznej, znajomości technik laboratoryjnych i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy badawczej przez Kandydatkę. Spełnia zatem wszystkie wymogi ustawowe (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.; Dz.U. z 2018 r. poz.1668 – prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

W związku z powyższym, przedstawiam Radzie Dyscypliny Biotechnologia Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego **wniosek o dopuszczenie Pani mgr Ady Połońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie stopnia doktora w reprezentowanej dyscyplinie.**

Przeprowadzony zakres prac badawczych i różnorodność zastosowanych metod uważam za wyróżniający. Uzyskane wyniki zostały wnikliwie zinterpretowane i przedyskutowane; dostarczyły one nowych, ważnych danych o procesach biosyntezy kwasów tłuszczowych i remodelowania fosfolipidów. Część wyników została opublikowana w dwóch artykułach naukowych, które ukazały się w renomowanych czasopismach o wysokich współczynnikach wpływu (*International Journal of Molecular Sciences*, IF 5.5 i *New Phytologist*, IF 9.4), w pierwszym z nich Doktorantka jest pierwszą autorką.

Biorąc pod uwagę wysoką merytoryczną wartość rozprawy, wnioskuję zatem o jej wyróżnienie.

