



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Toruń, 15.04.2024 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 Ady Połońskiej,
pt. „Identyfikacja acylotransferaz lizofosfolipidów okrzemka *Phaeodactylum tricornutum*
oraz charakterystyka tych zidentyfikowanych ze szczególnym uwzględnieniem
acylotransfereazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina”,
wykonanej pod opieką
promotora Pana prof. dr. hab. Antoniego Banasia
oraz promotora pomocniczego Pani dr Katarzyny Jasienieckiej-Gazarkiewicz

Przedmiot rozprawy doktorskiej i jego znaczenie naukowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Ady Połońskiej została poświęcona identyfikacji enzymów o aktywności LPCAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) u okrzemka *Phaeodactylum tricornutum* L. oraz charakterystyce katalizowanych przez nie reakcji w warunkach *in vitro*. Wykonane analizy wnoszące oryginalną wiedzę na temat szlaków biosyntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych o bardzo długich łańcuchach węglowych (VLC-PUFA) u okrzemek mają przede wszystkim znaczenie poznawcze i mieszczą się w obszarze badań podstawowych. Jednak uzyskane wyniki oraz kontynuacja tego wątku naukowego zapoczątkowanego w ramach kierowanego przez Pana prof. dr. hab. Antoniego Banasia projektu SHENG 1 (UMO-2018/30/Q/NZ3/00497), w którego realizację Pani mgr Ada Połońska była zaangażowana, mogą mieć w przyszłości znaczenie aplikacyjne, co podnosi rangę dysertacji. Zdobyta wiedza może posłużyć do opracowania „narzędzi metabolicznych” służących w bioinżynierii do modulowania biosyntezy olejów o określonym, pożądanym składzie, np. w wysokowydajnych roślinach oleistych, które mogą stanowić dla człowieka alternatywne do ryb źródło VLC-PUFA omega-3 o wysokiej wartości odżywczej i zdrowotnej. Na korzyść Doktorantki przemawia także fakt, że badania przeprowadziła na *P. tricornutum*, który ze względu na krótki cykl rozwojowy, a także mały w odniesieniu do innych organizmów, w pełni zsekwencjonowany genom oraz opracowanie technik jego edycji jest modelowy w

badaniach molekularnych prowadzonych nad okrzemkami. Co więcej, okrzemek jest zdolny do biosyntezy VLC-PUFA omega-3, w szczególności najkorzystniejszego dla zdrowia człowieka kwasu eikozapentaenowego (EPA) oraz jego selektywnego kierowania z fosfatydylocholiną (PC) do galaktoglicerolipidów i w niewielkich ilościach do triacylogliceroli (TGA). O ile szlak biosyntezy EPA w glonach jest zasadniczo dobrze poznany, to jednak mechanizmy transferu jego prekursorów z miejsca ich modyfikacji, czyli PC do miejsca elongacji (a więc puli acylo-CoA), a także mechanizmy transferu samego EPA do galaktoglicerolipidów i TGA, pozostają nieznane. Biorąc pod uwagę powyższe, a także założone cele pracy, uważam dobór materiału za adekwatny.

Aspekty formalne rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji dysertacja liczy 243 strony i ma formę monograficznego tomu, przygotowanego w klasycznym układzie rozdziałów. Rozpoczyna go wykaz stosowanych *Skrótów* i terminów, *Streszczenie* w języku polskim i angielskim zwieńczone konkluzją, rozdział *Wprowadzenie* z opisowo zaprezentowanymi najważniejszymi celami badawczymi. Napisany rzeczowo z wycuciem optymalnego stopnia szczegółowości *Przegląd literatury* mieszczący w sobie 6 przejrzystych rysunków, poprzedza rozdział zawierający staranny opis wykorzystanych przez Doktorantkę *Materiałów* i *Metod* badawczych. Najobszerniejszą częścią dysertacji liczącą 103 strony jest rozdział *Wyniki* zawierający 12 zestawień tabelarycznych oraz 48 rysunków. Część rezultatów Autorka zaprezentowała na rysunku i w 8 tabelach dołączonych do pracy jako suplement. Po rozbudowanej *Dyskusji* omawiającej uzyskane wyniki w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy w zakresie poruszanego przez Nią problemu naukowego, znajduje się rozdział *Wnioski* prezentujący 12 rozbudowanych punktów. Pracę wieńczy wykaz dobrze dobranej literatury obejmujący 106, głównie anglojęzycznych pozycji. Do spisu wkradł się drobny błąd, prawdopodobnie natury drukarskiej, wynikający z automatycznej edycji (numeracja pozycji literaturowych zaczyna się od pozycji nr 3, a nie nr 1).

Praca zawiera informacje dotyczące źródeł finansowania badań oraz wykaz 2 artykułów eksperymentalnych, w których opublikowano część wyników zamieszczonych w niniejszej dysertacji. Doktorantka jest wiodącym autorem w jednym i współautorem w drugim artykule. Rozprawa jest dobrze przygotowana pod względem edytorskim, została napisana poprawnym, komunikatywnym językiem naukowym, niesprawiającym trudności w czytaniu. Autorka ustrzegła się stosowania neologizmów i określeń anglojęzycznych.

Przedłożona praca spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. Zm.).

Ocena merytoryczna

Przegląd literatury został bardzo logicznie opracowany i wprowadza czytelnika w tematykę badawczą podjętą przez Doktorantkę. Autorka rozpoczyna dysertację od charakterystyki okrzemek, ze szczególnym uwzględnieniem gatunku *P. tricornutum* oraz *Arabidopsis thaliana* uzasadniając wybór tego materiału do zaplanowanych analiz. Szczegółowo opisuje informacje dotyczące struktury i biosyntezy kwasów tłuszczowych oraz

wykorzystania ich w syntezie glicerolipidów. W dalszej części Doktorantka prezentuje budowę, funkcje, znaczenie i szlaki biosyntezy fosfolipidów oraz głównych lipidów magazynujących energię u roślin, to jest TGA. Z uwagi na podjętą w dysertacji tematykę szczególnie ważna jest ta część *Przeglądu literatury* traktująca o acetylotransferazach acylo-CoA:lizofosfolipid, z podziałem na grupy, w których kryterium przyporządkowania stanowi ich specyficzność substratowa w stosunku do akceptora kwasów tłuszczowych. Następnie Autorka pracy prezentuje dane dotyczące remodelowania fosfolipidów, szlaków biosyntezy VLC-PUFA oraz ich roli w diecie człowieka. Zwieńczeniem *Przeglądu literatury* jest część poświęcona wykorzystaniu inżynierii genetycznej do produkcji VLC-PUFA w roślinach wyższych, uwzględniająca geny kodujące białka biorące udział w szlaku ich biosyntezy, ukierunkowany transport substratu, jak i związków pośrednich celem ostatecznego ich umiejscowienia w TAG. Doktorantka podaje także przykłady udanych eksperymentów, w wyniku których otrzymano rośliny transgeniczne, m.in. Inu, tytoniu, soi, zdolne do biosyntezy VLC-PUFA w organach wegetatywnych i nasionach. Ważnym przesłaniem tej części pracy jest zasygnalizowanie, że aby oleje tego typu mogły być produkowane na skalę przemysłową, pożądanym jest osiągnięcie wysokich poziomów VLC-PUFA w nasionach roślin oleistych przy jednoczesnym zmniejszeniu lub całkowitym wyeliminowaniu niepożądanych produktów ubocznych (omega-6).

Cel pracy jest dobrze sformułowany, świadczy przemyśleniu i dokładnym opracowaniu planu działania umożliwiającego wnioskowanie na podstawie przeprowadzonych analiz i zebranych danych. Obejmuje on zidentyfikowanie genu kodującego enzym/y LPCAT u *P. tricornutum* oraz charakterystyka katalizowanych przez niego/przez nie reakcji w warunkach *in vitro*. Równorzędnym celem było przeprowadzenie wstępnej charakterystyki zidentyfikowanych enzymów PtLPAAT1 i PtLPAAT2 oraz zasługujące na duże uznanie podjęcie pracochłonnej próby uzyskania transgenicznych roślin *Arabidopsis thaliana* produkujących VLC-PUFA.

Do realizacji tak precyzyjnie wyszczególnionych zadań Doktorantka wykorzystwała liczne, dobrze dobrane techniki biologii molekularnej, metody biochemiczne, analizy instrumentalne oraz bioinformatyczne. Autorka opisała je w podrozdziałach **Materiały** i **Metody** w jasny, jednoznaczny i umożliwiający ich odtworzenie sposób. Ta część dysertacji upewnia w przekonaniu, że warsztat badawczy Pani mgr Ady Połońskiej oraz Jej kompetencje w prawidłowym doborze i opanowaniu technik badawczych są imponujące.

Wyniki zaprezentowane w rozprawie potwierdzają, że zamierzone cele zostały osiągnięte. Doktorantka prowadzi czytelnika przez kolejne etapy pracy, logicznie uzasadniając następujące po sobie zaplanowane analizy, które są rozwijane w kierunkach wytyczonych na podstawie uzyskiwanych na bieżąco wyników. Ich omawianie Autorka pracy rozpoczyna od określenia funkcji sklonowanych genów z *P. tricornutum* potencjalnie kodujących enzymy typu LPLAT. Wstępne testy enzymatyczne wykazały, że spośród sześciu analizowanych genów tylko jeden koduje enzym wykazujący aktywność acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina, który nazwano PtLPCAT1. Z kolei dwa inne geny kodują enzymy, które wykazują aktywność typu LPAAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid) i

nazwano je PtPAAT1 oraz PtLPAAT2. W kolejnym etapie Doktorantka przeprowadziła analizy biochemiczne oraz zbadała specyficzność substratową PtLPCAT1. Podczas remodelowania PC enzym wykazał najwyższą aktywność w temperaturze 40°C, z kolei w reakcjach „do tyłu” optimum temperaturowe wynosiło 30°C. Aktywność PtLPCAT1 w obydwu typach reakcji była wysoka w pH zasadowym, jednak proces remodelowania PC zachodził także intensywnie w środowisku lekko kwaśnym. Doktorantka wykazała, że stymulatorami reakcji „do przodu” katalizowanych przez PtLPCAT1 były jony wapnia i magnezu zastosowane w przedziale stężenia od 0,05 do 0,5 mM, z kolei w reakcjach remodelowania mikrosomalnego PC najniższe badane stężenia hamowały reakcje. Nieznaczne hamowanie aktywności PtLPCAT1 w reakcjach „do przodu” wywołały jony potasu. Wyniki badania specyficzności substratowej PtLPCAT1 dowiodły, że enzym wykazuje w reakcjach „do przodu” wysoką aktywność w stosunku do acylo-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi ze szlaku biosyntezy EPA, szczególnie w stosunku do 20:4-CoA n-3 oraz niską do 20:4-Co n-6, co może pozytywnie wpływać na biosyntezę EPA i kwasu dokozahexaenowego (DHA) w transgenicznym roślinach oleistych. Autorka pracy odkryła, że spośród wykorzystywanych w testach gatunków lizofosfolipidów PtLPCAT1 wykorzystywał dobrze 16:0-LPC, 18:0-LPC i 18:1-LPC. Aktywność PtLPCAT1 w stosunku do pozycji sn-2 była wyższa niż w stosunku do pozycji sn-1. Przeprowadzone analizy dowiodły, że katalizowany przez PtLPCAT1 proces remodelowania składu kwasów tłuszczowych fosfolipidów głównie PC zależy od składu kwasów tłuszczowych fosfatydylocholiny oraz rodzaju acylo-CoA wykorzystywanych w tym procesie. Stosując zmodyfikowane frakcje mikrosomalne wzbogacone o PC zawierające kwasy tłuszczowe ze szlaku EPA najintensywniejszemu remodelowaniu podlegało PC frakcji wzbogaconej o sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC, co jak postuluje Doktorantka może wskazywać, że synteza EPA u *P. tricornutum* przebiega intensywnie przez produkt pośredni jakim jest 18:3 n-6, który po odłączeniu jest następnie przedłużany do 20:3 (n-6). Doktorantka sygnalizuje, że specyficzność PtLPCAT1 w remodelowaniu różnych „gatunków” PC nie eliminuje możliwości szlaku EPA także przez 18:3 n-3 przekształcanego dalej w PC do 18:4. Najprawdopodobniej o wyborze szlaku biosyntezy EPA będzie decydowała aktywność pozostałych enzymów odpowiedzialnych za jego biosyntezę.

Pani mgr Ada Połńska dokonała wstępnej charakterystyki biochemicznej zidentyfikowanych enzymów typu LPAAT. Wykazywały one w systemie drożdżowym niższą aktywność niż PtLPCAT1. Charakteryzowały się również odmienną specyficznością substratową w odniesieniu do różnych acylo-CoA. Doktorantka dowiodła, że enzym PtLPAAT1 najlepiej akceptował 18:4-CoA n-3, a PtLPAAT2 18:1-CoA. Oba enzymy wykazywały najwyższą aktywność w temperaturze 23°C, jednak charakteryzowały się odmienną wrażliwością na zmianę tego parametru. Kolejnymi czynnikami wpływającym na ich aktywność były pH oraz obecność jonów wapnia i magnezu. PtLPAAT1 wykazywał najwyższą aktywność przy pH 9,0, a PtLPAAT2 przy pH 10,0. Jony wapnia hamowały aktywność obydwu enzymów, podobnie jak jony magnezu zastosowane w wyższym stężeniu.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka wnikliwie analizuje rezultaty własnych badań i krytycznie konfrontuje je z danymi opublikowanymi we współczesnej literaturze. Nie zapomina przy tym o zachowaniu dystansu do uzyskanych wyników, co w parze z wyciągniętymi na ich podstawie wnioskami świadczy o dużej dojrzałości naukowej Autorki

pracy. Ta część dysertacji jest wielokierunkowa i oceniam ją bardzo dobrze. Recenzowana praca spełnia pod względem merytorycznym wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Pracę wieńczą **Wnioski**, z których Doktorantka trzymaście uznała za najistotniejsze.

Przedłożona do recenzji praca nie jest wolna od drobnych błędów literowych, nieprecyzyjności i niezręczności stylistycznych oraz interpunkcyjnych. Zdarzają się w niej nieliczne potknięcia np. nazwy mutantów niepisane kursywą, błędy literowe zwłaszcza w nazwach enzymów będące zapewne wynikiem kontrolowanej przez program autokorekty. Uchybienia te nie umniejszają walorowi naukowemu oraz wartości pracy i osiągnięć jej Autorki.

Wniosek końcowy

Dysertacja doktorska Pani mgr Ady Połońskiej zawiera liczne i zupełnie nowe dane naukowe na temat reakcji enzymatycznych przeprowadzanych przez acylotransferazy lizofosfolipidów okrzemka. 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 Biotechnologii UG o dopuszczenie Pani mgr Ady Połońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie

Doceniam logiczny zamysł i założone cele, zastosowanie różnorodnych technik badawczych, a także uzyskanie pionierskich wyników badań ustalających nowe fakty dotyczące gospodarki lipidowej u okrzemek, które już wzbudziły międzynarodowe zainteresowanie. Powyższe daje podstawę do zakończenia recenzji wnioskiem o wyróżnienie dysertacji doktorskiej Pani mgr Ady Połońskiej, o co wnoszę.

odr. hab. E. Lisa Wiskul