



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin

dr hab. Dariusz Latowski

**Recenzja**

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Sylwii Klińskiej**

**pt. „Charakterystyka biochemiczna oraz określenie roli w remodelowaniu fosfolipidów  
wybranych acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid”**

Promotorem jest Pan Prof. dr hab. Antoni Banaś

Promotorem pomocniczym jest Pani dr Katarzyna Jasieniecka-Gazarkiewicz

**1. Podstawa prawna:** pismo N002/2022/35 Pana dr. hab. Mariusza Grinholca, prof. UG, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego z dnia 7 marca 2022 roku dotyczące przygotowania poniższej recenzji.

**2. Ogólna ocena**

Rozprawę doktorską Pani mgr Sylwii Klińskiej oceniam jako bardzo dobrą i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

**3. Ocena szczegółowa – najmocniejsze i najsłabsze strony pracy**

Celem badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej było scharakteryzowanie procesu remodelowania grup acylowych fosfolipidów i cytoplazmatycznego acylo-CoA w wybranych organach rośliny lnicznika pospolitego (*Camelina sativa* (L.) Crantz). Już samo zainteresowanie wspomnianą rośliną, w aspekcie badań związanych z biochemią lipidów, należy uznać za istotny atut pracy. Doktorantka znakomicie uzasadniła wybór rośliny, wskazując z jednej strony na potencjał wpływu wyników eksperymentów prowadzonych z zastosowaniem tej rośliny na tzw. badania podstawowe (rosnąca liczba publikacji wyników badań nad lniczką), a z drugiej na znaczenie aplikacyjne tych badań. Z rozprawy doktorskiej można wnioskować, że Doktorantka posiada znakomite doświadczenie w różnorodnych analizach prowadzonych na wspomnianej roślinie, które zdobywała już w czasie pracy magisterskiej, a o znaczeniu lnicznika pospolitego w rozwoju naukowym Pani mgr Sylwii Klińskiej może świadczyć fakt, że w spisie wykorzystanej w badaniach aparatury na str. 73 w rozdz. 2.8. nawet słowo „licznik scyntylicyjny” zostało zamienione na „licznik scyntylicyjny”. Przyznam, że zastanawiam się, czy bardziej właściwym nie byłoby doprecyzowanie

tytułu pracy doktorskiej i nie powinien on brzmieć „Charakterystyka biochemiczna oraz określenie roli w remodelowaniu fosfolipidów wybranych acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid lnicznika pospolitego”. Warto przy tym wspomnieć, że jeśli podajemy łacińską nazwę osobnika, przynajmniej za pierwszym razem, wskazane jest podać też autora lub autorów, którzy dokonali opisu gatunku. Wybór lnicznika w badaniach remodelowania reszt acylowych lipidów to jeden z argumentów uzasadniających moją wysoką ocenę pracy doktorskiej Pani mgr Sylwii Klińskiej.

Drugim argumentem jest zastosowany w pracy wieloaspektowy model badawczy z wykorzystaniem lnicznika, zgodnie z którym badania prowadzono na kilku płaszczynach analitycznych. Płaszczyzna badań makroskopowych obejmowała hodowlę lnicznika w kulturach wazonowych (określanych jako *in vivo*) i w kulturach płynnych (określanych jako *in vitro*) oraz pozyskiwanie materiału analitycznego z tych hodowli. Materiał ten to nasiona i liście niepoprawnie i wielokrotnie określone w pracy jako tkanki, podczas gdy są one organami rośliny. Doktorantka koniecznie powinna zapoznać się z definicjami tych pojęć. Niestety to nie jedyne pojęcia, które w pracy doktorskiej są błędnie zdefiniowane. Na stronie 16 Doktorantka wyjaśnia znaczenie trzech terminów (izoenzym, izoforma i wariant), ale nie bardzo rozumiem intencje tego zabiegu, m. in. dlatego że pojęcia te są powszechnie stosowane w biochemii, a w doktoracie, bez podania odwołań do literatury, pojęcia izoenzymu i izoformy zostały zdefiniowane błędnie. Przy okazji warto wspomnieć o pojawiających się w pracy błędach logicznych. W wyjaśnieniu pojęcia izoformy Doktorantka napisała: „w skład każdej izoformy może wchodzić od jednego do kilku izoenzymów o zbliżonej strukturze pierwszorzędowej np.: enzymy LPEAT występują w komórkach roślinnych w dwóch izoformach – LPEAT1 i LPEAT2”. Możliwe, że chodzi tu nie o izoformy LPEAT1 i LPEAT2, a izoenzymy LPEAT1 i LPEAT2, bo tak są one określone w pracy kilka stron dalej. Byłbym wdzięczny za wyjaśnienie tej kwestii z podaniem właściwych definicji izoenzymu i izoformy w czasie publicznej obrony pracy doktorskiej.

Przy pobieraniu materiału analitycznego lnicznika, w przypadku nasion, Doktorantka uwzględniała etap ich rozwoju, a w przypadku liści sposób hodowli rośliny. Bez wątpienia wyniki analiz, zarówno nasion jak i liści, wnoszą bardzo istotny wkład w badania nad lnicznikiem i to te podstawowe, jak i aplikacyjne, jednak mnie szczególnie zainteresowały wyniki dotyczące analiz liści w zależności od rodzaju hodowli, tj. *in vivo* i *in vitro*. Wyniki te zostały przez Doktorantkę znakomicie przedyskutowane, w tym z bardzo trafnym wykorzystaniem danych literaturowych (str. 218–222) i opublikowane w czasopiśmie Cells (IF ponad 6). Dyskusja tego aspektu jest bardzo przekonująca, ale ciekaw jestem, jak Autorka rozwinęłaby poruszony wątek płynności błon w odpowiedzi na zmiany temperatury. Przypuszczam, że hodowle płynne lnicznika były prowadzone w tych samych temperaturach i warunkach oświetleniowych co hodowle na podłożu stałym. Czy według Doktorantki jakiś wpływ na otrzymane różnice w analizie liści z dwóch rodzajów hodowli mógł mieć fakt przypuszczalnego cyklicznie występującego spadku temperatury po wyłączeniu świetlni, który prawdopodobnie był istotniejszy dla hodowli na podłożu stałym niż płynnym? Pytam o to szczególnie



w aspekcie sugerowanego usztywnienia błon komórkowych w hodowlach płynnych i stwierdzenia Autorki, że „trudno jest określić, jakie to mogłoby mieć znaczenie fizjologiczne dla roślin hodowanych w tego typu warunkach”. Nie doszukałem się opracowania istotności statystycznej różnic zawartości kwasów tłuszczowych obecnych w poszczególnych klasach lipidów liści lnicznika hodowanego na podłożu stałym i płynnym, pokazanych w tab. 9, co bardziej wiarygodnie uzupełniałoby dane zaprezentowane na Rys. 13.

Kolejną grupę przeprowadzonych przez Doktorantkę badań umiejscowiłbym na płaszczyźnie biochemicznej. Obejmowała ona analizy prowadzone na frakcji mikrosomalnej pozyskiwanej zarówno z różnych organów roślin z hodowli *in vivo* i *in vitro*, jak również z otrzymanych w ramach prowadzonych badań transgenicznych linii drożdży. W ramach tych badań najpierw doprecyzowano optymalizację warunków reakcji katalizowanych przez LPCAT, LPEAT, LPAAT, a następnie analizowano aktywność i specyficzność substratową tych enzymów w katalizowaniu reakcji przenoszenia reszt acylowych na lizofosfolipidy (określane w pracy jako „do przodu”) i z fosfolipidów na koenzym A (określane w pracy jako „do tyłu”). Bardzo doceniam ogrom wykonanych analiz, fakt wyboru rzeczywiście istotnych parametrów, które nie tylko pozwalały na optymalizację warunków reakcji do dalszych badań, ale też dostarczały istotnych informacji dobrze charakteryzujących badane enzymy, co z resztą zostało ładnie omówiono w rozdziale Dyskusja z uwzględnieniem wnikliwej analizy porównawczej uzyskanych wyników. Bardzo podoba mi się zastosowany w pracy model do badania reakcji „do tyłu”. Niestety, dał o sobie znać brak cytacji odnoszących się do stosowanych w pracy metod. Mimo długich poszukiwań, szczególnie ze względu na obszerność pracy, nie znalazłem ani w rozdziale poświęconym metodyce, ani tym poświęconym wynikom, ani też w dyskusji informacji, skąd pochodzi ten sposób analizy reakcji „do tyłu”. Brak wskazania źródła stosowanej w tych badaniach metody staje się szczególnie dotkliwy w perspektywie istotności uzyskanych tą metodą wyników. Podobnie jak Autorka pracy dostrzegam ich ogromny potencjał poznawczy, a że nie zostały jeszcze opublikowane, czułem się wyróżniony, mogąc się z tak istotnymi wynikami zapoznać (mam tu na myśli szczególnie te dyskusowane w ostatnim akapicie na str. 217).

Kolejną grupę eksperymentów, które chciałbym wyróżnić, ze względu na wysoką, moim zdaniem, istotność poznawczą uzyskanych wyników, są analizy wpływu temperatury na aktywność i specyficzność substratową enzymów LPCAT i LPEAT. Pokazują one, że znajdujące się w tkankach roślinnych enzymy LPEAT, ale nie LPCAT, mogą reagować na zmiany temperatury poprzez modyfikację swojej aktywności oraz specyficzności substratowej. Rezultaty tych badań mogą odegrać bardzo ważną rolę w zrozumieniu mechanizmu aklimatyzacji błon do zmiennych warunków termicznych, co nabiera jeszcze większego znaczenia w aspekcie obserwowanych zmian klimatu i po uwzględnieniu specyfiki i potencjału gospodarczego lnicznika. Warto podkreślić, że charakterystyka enzymów LPEAT obejmowała różne warianty dwóch izoenzymów LPEAT, w pracy określanych jako izoformy, i dlatego ponawiam prośbę o wyjaśnienie tej sprawy podczas publicznej obrony.

Wykorzystano tu narzędzia stosowane przez Doktorantkę w ramach eksperymentów, które umieściłbym na trzeciej płaszczyźnie badań, a mianowicie płaszczyźnie genetycznej.

Realizowane w ramach niej działania to w znacznej mierze liczne prace pozwalające na dopełnienie stosowanego modelu badawczego tak, aby pozwolił na możliwość analiz dostępnych wariantów dwóch form LPEAT. Trzeba docenić gotowość Doktorantki do rozpoczęcia badań tego rodzaju, tym bardziej, że wyniki, które otrzymała we wcześniejszych etapach swojej pracy były na tyle znaczące i liczne, że prawdopodobnie wystarczyłyby do otrzymania stopnia doktora. Mimo to Pani mgr Sylwia Klińska dowodząc, w moim odczuciu, postawy dojrzałego naukowca, w konsekwencji otworzyła kolejny rozdział eksperymentalny, dzięki któremu dowiadujemy się o różnych aspektach doświadczeń z zastosowaniem systemu drożdżowego w badaniach wariantów LPEAT1 i LPEAT2, nawet jeśli otrzymane wyniki pokazują, że przeprowadzone badania mają charakter wstępny, i tak jak wskazuje sama Autorka: „muszą (...) być traktowane z ostrożnością”. Bardzo doceniam wszystkie działania Doktorantki w obrębie płaszczyzny genetycznej, począwszy od analizy bioinformatycznej, poprzez otrzymanie transgenicznych linii drożdży, aż po analizę ekspresji genów kodujących LPEAT w poszczególnych organach lnicznika.

Kolejnym atutem pracy jest bogactwo i różnorodność zastosowanych metod, znakomicie dobranych do realizacji stawianych celów. Podziwiam pracowitość i zaangażowanie Doktorantki w realizację badań. W moim odczuciu Pani mgr Sylwia Klińska może być wzorem wspomnianych cech. Słabszą stroną rozdziału poświęconego metodyce jest zasadniczy brak odniesień wskazujących, kto jest twórcą opisywanych procedur. W ten sposób nie wiadomo na przykład, co zdecydowało o przyjętych warunkach hodowli lnicznika, o wyborze sposobu sterylizacji jego nasion czy metodzie transmetylacji kwasów tłuszczowych. W sumie na 27 stronach opisu metodyki doliczyłem się tylko pięciu odwołań do literatury. W szczególności interesuje mnie, czy opisana na str. 88 procedura wizualizacji lipidów po rozdzieleniu metodą TLC (inkubacja z parami jodu lub spryskiwanie roztworem prymuliny z ekspozycją na światło UV) została zweryfikowana pod względem braku wpływu na wyniki oznaczeń kwasów tłuszczowych tych lipidów metodą chromatografii gazowej. Bardzo proszę o wyjaśnienie tej sprawy w czasie obrony pracy doktorskiej.

Strona edytorska pracy doktorskiej także nie budzi większych zastrzeżeń. Monografia posiada układ spełniający wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Występujące miejscami błędy nie utrudniają zrozumienia przesłania pracy, choć natura tych błędów jest różna – od edytorskich, poprzez stylistyczne, logiczne, aż czasami po merytoryczne. Nie bardzo rozumiem na przykład, skąd pochodzi informacja umieszczona na str. 22, że sfingozyna może mieć od dwóch do trzech reszt wodorotlenowych.

W pracy znajduje się wykaz skrótów, jednakże wskazane jest zamieszczenie pełnych nazw wszystkich skrótów stosowanych po raz pierwszy w tekście, w tym szczególnie w Streszczeniu, które kierowane



jest do szerokiego grona odbiorców, a nie jedynie specjalistów, dobrze zorientowanych w terminologii.

Wstęp stanowi dobre wprowadzenie w tematykę badawczą, jasno uzasadnia cel i znaczenie podjętych badań i stanowi poprawny przegląd literatury tematu. Wyniki są opisane i prezentowane przejrzysto. Dyskusja jest dojrzała, czyta się ją z zainteresowaniem, świadczy o bardzo dobrej i szerokiej wiedzy Doktorantki. Ogromnie doceniam krytyczne podejście do własnych wyników, ostrożność, ale jednocześnie umiejętność wskazania wyników najistotniejszych i jednocześnie dobrze zweryfikowanych. Słabą stroną dyskusji jest chyba całkowity brak odwołania do tabel i rysunków z rozdziału Wyniki – szkoda, bo bardzo ułatwiłoby to czytanie pracy.

#### **4. Wniosek końcowy**

Rozprawa Pani mgr Sylwii Klińskiej zatytułowana: „Charakterystyka biochemiczna oraz określenie roli w remodelowaniu fosfolipidów wybranych acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid” 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 nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej;
- jej przedmiotem jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego polegającego na szeroko rozumianej charakterystyce biochemicznej i określeniu roli w remodelowaniu fosfolipidów wybranych acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid Inicznika pospolitego.

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

#### **5. Wniosek o wyróżnienie pracy wraz z uzasadnieniem**

Biorąc pod uwagę istotny wkład pracy doktorskiej we współczesną biochemię lipidów, zdobycie finansowania na przeprowadzenie części badań, znaczący dorobek naukowy Doktorantki, a także spełnione inne wymogi wyszczególnione we wspomnianej wyżej ustawie i Regulaminie wyróżniania rozpraw doktorskich przez Radę Dyscypliny Nauki biologiczne UG, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy Pani mgr Sylwii Klińskiej.

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, w tym z zastosowaniem rośliny, której wymagania uprawowe i walory biochemiczne niosą znaczny potencjał użytkowej oleistej rośliny uprawnej;
3. znaczeniu uzyskanych wyników.

O znaczeniu uzyskanych wyników najlepiej świadczy fakt, że zostały one opublikowane w czterech bardzo dobrych czasopismach naukowych, a Doktorantka jest pierwszym autorem każdej z tych prac. Ponadto część wyników, które nie zostały jeszcze opublikowane, dostarcza bardzo cennych informacji o biochemii lipidów, w tym tych użytkowych i z pewnością zostanie opublikowana w wysokiej klasy czasopismach naukowych. Przykładem takich wyników są np. te, które pozwalają przypuszczać, że rodzaj acylokoenzymów A obecnych w środowisku reakcji enzymów LPCAT oraz LPAAT może w różny sposób wpływać na aktywność tych enzymów w katalizowaniu przenoszenia reszt acylowych z fosfolipidów na koenzym A. Drugą grupą wyników są wyniki badań nad charakterystyką wariantów LPEAT1 i LPEAT2. Choć nie są one na tyle jednoznaczne, aby publikować je bez dodatkowych weryfikacji, to warsztat metodyczny opracowany przez Doktorantkę, w tym uzyskane linie transgeniczne drożdży i cały wachlarz przetestowanych parametrów, daje duże szanse na szybką finalizację tych badań i publikację ich wyników, które zresztą już teraz mają charakter nowatorski.

Nie wykluczam także, że wyniki opisanych w pracy badań na poziomie genetycznym mogą zostać uznane przez recenzentów dobrych czasopism za warte opublikowania.

Ponadto uważam, że praca stanowi bardzo dobry przegląd literatury, który czyni ją cennym źródłem informacji na temat biochemii lipidów i lnicznika pospolitego. 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.

*Dariusz Latowski*