

Dr hab. Andrzej Podstolski, prof. UW i UKSW

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Miklaszewskiej, p.t. „Specyficzność substratowa wybranych reduktaz kwasów tłuszczowych i syntaz wosków”

Od wielu lat prowadzone są badania nad modyfikacją roślin bądź organizmów jednokomórkowych do produkcji roślinnych metabolitów wtórnych. Niektóre, jak w przypadku szikoniny zostały uwieńczone sukcesem, inne, jak na przykład prostego związku – waniliny, od prawie 30 lat ciągle są w fazie doświadczeń. Tym nie mniej metody biotechnologiczne coraz skuteczniej wkraczają do produkcji wielu związków o zastosowaniach farmaceutycznych, kosmetycznych czy spożywczych.

Woski, estry kwasów tłuszczowych i wyższych alkoholi znajdują powszechne zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu jako składniki farmaceutyków, kosmetyków, farb, emulsji czy smarów. Do ich produkcji wykorzystuje się zarówno kosztowne metody syntezy chemicznej jak i surowce pochodzenia roślinnego, jak tłuszcze zapasowe z nasion rośliny *Simmondsia chinensis*. Dlatego uważam za bardzo celowe podjęcie przez mgr Magdalenę Miklaszewską badań z wykorzystaniem metod biotechnologicznych do produkcji tych metabolitów w genetycznie modyfikowanych organizmach jednokomórkowych oraz transgenicznych roślinach. Nie bez znaczenia jest także perspektywa, jako jedna z możliwych konsekwencji tych badań, ograniczenia powierzchni upraw surowca roślinnego do produkcji wosków, co w przypadku innej przemysłowo ważnej rośliny, palmy olejowej, której powierzchnia upraw stale rośnie, doprowadziło do bardzo niekorzystnych skutków ekologicznych.

Rozprawa doktorska mgr M. Miklaszewskiej powstała jako fragment międzynarodowego projektu ICON (Industrial crops producing added value oils for novel chemicals) który dotyczył wprowadzenia genów z różnych organizmów, kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezie wosków do kilku gatunków roślin oleistych. Celem rozprawy było określenie specyficzności substratowej wyizolowanych reduktaz kwasów tłuszczowych i syntaz wosków w warunkach *in vitro* co będzie niezbędne do (cytat) „...zaprojektowania procesu biotechnologicznego produkcji wosków o strukturze chemicznej i właściwościach dopasowanych do ich planowanego wykorzystania przemysłowego z uwzględnieniem składu kwasów tłuszczowych obecnych w organizmach docelowych”. Trzeba zauważyć, że w literaturze są jedynie nieliczne dane odnośnie charakterystyk substratowych tych enzymów w warunkach *in vitro*.

Doktorantka przeprowadziła charakterystykę specyficzności substratowej reduktaz kwasów tłuszczowych z *Mus musculus*, *Simmondsia chinensis* i *Arabidopsis thaliana* oraz

syntaz wosków z *Mus musculus*, *Simmondsia chinensis* i *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* wyrażonych w drożdżowym systemie ekspresyjnym. Dotyczyła ona trzech aspektów :

- charakterystyki specyficzności substratowej *in vivo* - czyli analiz jakościowych i ilościowych alkoholi tłuszczowych i wosków gromadzonych w komórkach drożdży ekspresyjnych geny kodujące badane enzymy;
- optymalizacji warunków reakcji *in vitro* z użyciem frakcji mikrosomalnej z drożdży transformowanych genami kodującymi badane enzymy; -
- oznaczania specyficzności substratowej tych enzymów w warunkach *in vitro* wobec znakowanych ¹⁴C substratów;

Ten trzeci, ostatni etap, który doktorantka określiła jako główny cel swojej rozprawy, to - analiza specyficzności substratowej badanych reduktaz kwasów tłuszczowych wobec kilkunastu acylo-CoA oraz syntaz wosków w ponad 200 kombinacjach acylo-CoA z alkoholami tłuszczowymi.

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Miklaszewskiej jest dość obszerna - liczy 175 stron. Jest podzielona na 11 głównych części: streszczenie, wykaz stosowanych skrótów, krótkie wprowadzenie, obszerny przegląd literatury (36 stron) w istocie wstęp, w którym doktorantka w oparciu o piśmiennictwo omawia budowę, występowanie i funkcje wosków; biosyntezę wosków i ich składników; enzymy zaangażowane w biosyntezę alkoholi tłuszczowych i wosków; zastosowania wosków i alkoholi tłuszczowych w przemyśle. Dalsze części to zwięzłe uzasadnienie i sformułowanie celu pracy; materiał i metody (19 stron); wyniki (69 stron); dyskusja (18 stron), krótkie podsumowanie i wnioski; piśmiennictwo (148 pozycji) oraz 8 stronicowy aneks z tabelami szczegółowych wyników badanych reduktaz alkoholi tłuszczowych i syntaz wosków. Uważam, że praca jest bardzo dobrze napisana i proporcje poszczególnych jej części są właściwe. Rozdział „Przegląd literatury” a w istocie wstęp, jest bogatym źródłem aktualnej wiedzy o woskach i ich biosyntezie poczynając od bakterii i organizmów jednokomórkowych poprzez rośliny, bezkręgowce do ptaków i ssaków. Daje dobrą podstawę do sformułowania i uzasadnienia celu pracy. Doktorantka ma niewątpliwy dar zwięzłego pisania dobrą polszczyzną (z nielicznymi wyjątkami) o bardzo specyficznych zagadnieniach. Uważam, że tak przygotowany przegląd literatury po drobnych rearanżacjach mógłby się ukazać jako artykuł przeglądowy.

Rozdział materiał i metody zawiera komplet informacji dotyczących przeprowadzanych doświadczeń. Doktorantka szczegółowo i klarownie opisała szerokie spektrum stosowanych w tej pracy metod - biochemicznych, mikrobiologicznych, biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, syntezy chemicznej oraz kilku rodzajów chromatografii . Czytelnik ma pełną wiedzę co do producentów poszczególnych odczynników, preparatów, źródeł stosowanych metodyk, pochodzenia użytych wektorów i starterów . Uzyskane wyniki były poddawane analizie statystycznej a istotność różnic pomiędzy wynikami była szacowana za pomocą testu t-Studenta. Różnorodność stosowanych nowoczesnych metod i sprawne posługiwanie się nimi świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu doktorantki do

przeprowadzania trudnych i metodycznie i intelektualnie doświadczeń. W rozdziale tym pojawia się niestety kilkakrotnie żargon laboratoryjny. Zamiast polskiego słowa „mieszano” doktorantka używa anglicyzmu „worteksowano”. Z czym trudno mi się zgodzić, choć oddaje on nieźle istotę czynności.

Rozdział „Wyniki” podzielony został na dwie główne części, poświęcone charakterystyce specyficzności substratowej reduktaz kwasów tłuszczowych (FAR) z *M.musculus*, *Simondsia chinensis* oraz *Arabidopsis thaliana* w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* a następnie charakterystyce specyficzności substratowej syntaz wosków z *M.musculus*, *S.chinensis* oraz *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* również w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Materiałem badawczym w przypadku reduktaz były szczepy drożdży BY4742 oraz H1246 transformowane genami reduktaz kwasów tłuszczowych z wymienionych organizmów. Badania nad syntazami wosków prowadzono na transformowanym odpowiednio szczepie drożdży H1246. Szczep ten ma wyłączone geny syntezy triacylogliceroli i estrów steroli i przez to stanowi dobry punkt odniesienia do sprawdzenia jak wyłączenie drogi biosyntezy triacylogliceroli i estrów wpływa na aktywność i specyficzność reduktaz kwasów tłuszczowych. W przypadku badania reduktaz wosków brak obydwu tych metabolitów w szczepie H1246 umożliwia lepszy rozdział wosków od triacylogliceroli i estrów steroli stosowaną przez doktorantkę metodą chromatografii cienkowsarstwowej. Chciałbym podkreślić, że jeden z trzech plazmidów niosących geny syntazy wosków (WS) - a mianowicie niosący gen *SchWS* doktorantka zsyntetyzowała w ramach tej rozprawy doktorskiej.

Wyniki dotyczące FAR doktorantka przedstawiła w dobrze opisanych 7 tabelach i na 23 rysunkach a dotyczące WS w trzech tabelach i na 27 rysunkach (uwzględniających wartości odchylenia standardowego). Opis uzyskanych wyników w przypadku FAR obejmuje doświadczenia poczynając od wyboru kolonii *S.cerevisiae* o najwyższej aktywności badanych enzymów do analizy lipidów w pożywkach w warunkach *in vivo*, w hodowlach płynnych transgenicznych drożdży transformowanych *MmFAR1*, *SchFAR* *AtFAR5*. W kolejnym etapie doktorantka badała specyficzność substratową *in vitro* i tu doświadczenia dotyczyły optymalizacji warunków reakcji *in vitro* oraz specyficzności substratowej mikrosomalnych preparatów FAR z drożdży transformowanych *MmFAR1*, *SchFAR* oraz *AtFAR5*.

Podobny schemat postępowania został zastosowany w przypadku syntaz wosków. A więc wybór kolonii drożdży o najwyższej aktywności WS, charakterystyka specyficzności substratowej w warunkach *in vivo* - analiza składu wosków w hodowlach płynnych. Następnie optymalizacja warunków reakcji *in vitro* i badanie specyficzności substratowej mikrosomalnych preparatów z transformantów *MmWS*, *SchWS* oraz *MhWS2* także w warunkach *in vitro*. Mikrosomalne preparaty syntaz wosków doktorantka przebadła również pod kątem zdolności do syntezy triacylogliceroli oraz aktywności acylotransferazy monoacyloglicerolu (MGAT) oraz acylotransfrazy cholesterolu (ACAT).

Rozdział „Dyskusja” jest wyraźnie podzielony na dwie części z których pierwsza, krótka (podrozdziały 8.1. i 8.2.) w istocie stanowi rozszerzenie rozdziału „Przegląd literatury” oraz wzmocnienie tez stawianych w rozdziale „Uzasadnienie celu pracy”. Dlatego uważam, że ich zawartość powinna raczej się znaleźć w tamtych rozdziałach. Ale to może być dyskusyjne. W kolejnych podrozdziałach doktorantka omawia uzyskane własne wyniki odnośnie reduktaz kwasów tłuszczowych i syntaz wosków w drożdżowym systemie ekspresyjnym na tle wyników publikowanych w literaturze światowej. Dyskutuje zagadnienia akumulacji i wydzielania alkoholi tłuszczowych do pożywki przez transformowane drożdże oraz specyficzności substratowej reduktaz kwasów tłuszczowych z *M.musculus*, *S.chinensis* i *A.thaliana* wobec 14 różnych ¹⁴C acylo-CoA o długości 10C – 20C i różnym stopniu nasycenia. Bardzo ciekawie wyglądają wyniki dla szczepu H1246 w którym wyłączone są cztery geny uczestniczące w syntezie estrów steroli i triacylogliceroli. Transformowane komórki tego szczepu (zawierające SchFAR i AtFAR5) akumulują kwasy tłuszczowe jedynie do określonego poziomu a cały nadmiar wydzielają do pożywki. Z punktu widzenia biotechnologa jest to bardzo korzystna cecha.

Doktorantka przeprowadziła rozległą charakterystykę specyficzności substratowej syntaz wosków z *M.musculus*, *S.chinensis* oraz *M.hydrocarbonoclasticus* w warunkach *in vitro* wobec 14 znakowanych ¹⁴C Acylo-CoA w kombinacji z 17 alkoholami tłuszczowymi co daje łącznie 238 kombinacji. Wyniki dyskutuje osobno dla poszczególnych syntaz z trzech wybranych organizmów, kompetentnie polemizując z autorami wyników badań opisanych w literaturze. Lektura tego rozdziału umacnia mnie w przekonaniu, że mgr Magdalena Miklaszewska posiada bardzo rozległą wiedzę w zakresie tematu swojej rozprawy doktorskiej. Wykorzystując tę wiedzę potrafi stawiać ważne hipotezy badawcze, dowodzić ich eksperymentalnie i prezentować w postaci dojrzałej pracy naukowej. Swoje najważniejsze osiągnięcia zawarła w syntetycznym 8 punktowym rozdziale „Podsumowanie i wnioski”. Doktorantka wykazała, że:

- *S. cerevisiae* są dobrym systemem ekspresyjnym do analizy aktywności reduktaz kwasów tłuszczowych i syntaz wosków w warunkach *in vivo* i *in vitro* przy czym duże znaczenie ma wybór szczepu drożdży; drożdże transformowane genami kodującymi FAR mogą wydelać nawet 70% produkowanych FA do pożywki. Uważam, że jest to poważne osiągnięcie rzutujące na możliwość wykorzystywania takich systemów do produkcji alkoholi tłuszczowych;
- reduktazy kwasów tłuszczowych z *M.musculus*, *S.chinensis* i *A.thaliana* różnią się znacznie specyficznością substratową co pozwala na sterowanie biosyntezą alkoholi tłuszczowych o określonej liczbie węgli a w połączeniu z syntazami wosków – biosyntezą wosków o z góry określonym składzie.
- różnice w specyficzności substratowej syntaz wosków pochodzących z *M.musculus*, *S.chinensis* oraz *M.hydrocarbonoclasticus* stwarzają możliwość syntetyzowania wosków o

przewidywalnym składzie z różnych kombinacji ester CoA- kwas tłuszczowy/ alkohol tłuszczowy.

- określenie specyficzności substratowej *in vitro* reduktaz kwasów tłuszczowych oraz syntaz wosków z frakcji mikrosomalnej transformowanych drożdży, przebadanych w ramach rozprawy doktorskiej, pozwala na trafną prognozę składu wosków w transgenicznym roślinach ekspresyjnym geny kodujące te enzymy.

Wnioski końcowe recenzenta :

1. Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Miklaszewskiej dotyczy ważnej problematyki naukowej o znacznym potencjale zastosowań praktycznych. Jest bardzo dobrze napisana, praktycznie bezbłędnie z nielicznymi tylko uchybieniami językowymi („worteksomano”) bądź pominięciami w indeksie niektórych skrótów (np. Ric-CoA). Elegancka od strony edytorskiej.

2. Doktorantka wykazała się umiejętnością formułowania problemu badawczego, bardzo dobrą znajomością i posługiwaniem się wieloma nowoczesnymi technikami biochemii, biologii molekularnej, inżynierii genetycznej i mikrobiologii. W pełni zrealizowała zaplanowane cele badawcze.

3. Ma rozległą wiedzę w zakresie uprawianej problematyki, o czym świadczy bardzo kompetentna dyskusja uzyskanych wyników na tle literatury przedmiotu.

4. Potrafi realizować cele badawcze pracując w ramach zespołu naukowego rozwiązującego szerszy temat badawczy, co dobrze rokuje wykorzystaniu, bądź praktycznemu wdrożeniu uzyskanych przez nią wyników.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Miklaszewskiej spełnia wymagania określone w Ustawie z dn. 18 marca 2011 o stopniach i tytułach naukowych i stawiam wniosek do Wysockiej Rady Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie mgr Magdaleny Miklaszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu nadania jej stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

Ponadto, biorąc pod uwagę, że część wyników przedstawionych w rozprawie została już opublikowana (Acta Biochim Pol 22013, 60, 209-215) wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.


Dr hab. Andrzej Podstolski, prof. UW i UKSW

Warszawa, dnia 11 listopada 2015 r