

Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG i GUMed

Gdańsk, 31.08.2018

dr hab. inż. Aleksandra Królicka, prof. UG
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Abrahama 58
80-307 Gdańsk

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kamila Demskiego,
pt.: „Udział acylotransferaz typu DGAT (acyl-CoA:diacyloglicerol acylotransferaza)
i acylotransferaz typu PDAT (fosfolipid:diacyloglicerol acylotransferaza)
w akumulacji triacylogliceroli w nasionach wybranych roślin oleistych”**

Pan mgr Kamil Demski realizował swoją pracę doktorską w ramach projektu PRELUDIUM 7 finansowanego z funduszu Narodowego Centrum Nauki w Pracowni Biochemii Roślin pod opieką prof. dr hab. Antoniego Banasia, którego zainteresowania badawcze skupione są głównie na biochemii i biotechnologii lipidów roślinnych. Praca doktorska pana mgr Kamila Demskiego również doskonale wpisuje się w nurt dotyczący lipidów roślinnych, bo dotyczy triacyloglicerolów (TAG, estrów glicerolu i 3 kwasów tłuszczowych), które stanowią materiał zapasowy większości roślin. Przedmiotem pracy była analiza aktywności enzymów typu acylotransferaza fosfolipid:diacyloglicerol (PDAT) przenoszący grupę acylową do pozycji sn-3 diacyloglicerolu (DAG) z fosfolipidu w ostatnim etapie syntezy TAG w szlaku Kennedy'ego. Do badań wykorzystano nasiona 3 gatunków roślin oleistych: soi warzywnej, rącznika zwyczajnego i dwóch odmian kapusty rzepek (niskoerukowa odmiana MONOLIT i wysokoerukowa odmiana MAPLUS). W związku z powyższym, że w projekcie PRELUDIUM 7 zaplanowano jeszcze analizę dwóch innych gatunków roślin oleistych: *Cuphea viscosissima* i *Crepis palaestina* mam pytanie – **Dlaczego w pracy doktorskiej nie ma wzmianki o tych dwóch gatunkach roślin?** Doktorant przeprowadził również analizę zmian ekspresji czterech izoform DGAT1 i tyleż samo z DGAT2 w nasionach rzepek. W ramach pracy doktorskiej pan mgr Kamil Demski sklonował geny kodujące wyżej wymienione izoformy DGAT1 i DGAT2 w systemie drożdżowym z wykorzystaniem *Saccharomyces cerevisiae* H1246 posiadającego delecję czterech głównych genów

odpowiedzialnych za syntezę triacylogliceroli (TAG). Dzięki temu pozwoliło to na określenie specyficzności substratowej względem acylo-CoA. Biorąc pod uwagę fakt, iż enzymy typu DGAT i PDAT katalizują ostatni etap syntezy TAG i są kluczowymi enzymami biorącymi udział w biosyntezie głównych tłuszczów zapasowych w nasionach roślin, temat podjęty przez Doktoranta wydaje się niezmiernie ważny nie tylko z punktu widzenia poznawczego, a wyniki badań mogą w przyszłości pozwolić na uzyskanie transgenicznych roślin o zwiększonej ilości olejów lub też o zmienionym składzie poszczególnych kwasów tłuszczowych, co wiąże się z dużym potencjałem aplikacyjnym. Roślinne kwasy tłuszczowe mają wielorakie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu (np. do produkcji farb, mydeł, biopaliw itd.), ale również w przemyśle spożywczym. Przykładem niech będzie olej rzepakowy, który wpływa bardzo korzystnie na dietę człowieka ze względu na wysoką zawartość kwasu oleinowego oraz niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) takich jak kwas linolowy (n-6) i linolenowy (n-3). Kwasy omega-6 i omega-3 pełnią ważną rolę w profilaktyce i leczeniu wielu przewlekłych chorób: układu krążenia, udaru mózgu, nadciśnienia tętniczego oraz nawet niektórych nowotworów takich jak rak jelita grubego, piersi, czy prostaty.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pana mgr Kamila Demskiego jest oryginalnym opracowaniem liczącym 162 strony maszynopisu i ma układ przyjęty dla tego typu opracowań.

Streszczenie – w języku polskim i angielskim zawiera zwięzłe podsumowanie pracy.

Wprowadzenie i cel pracy – w tym rozdziale pracy mgr Kamil Demski po krótkim wprowadzeniu w jasny sposób sformułował cel ocenianej rozprawy, jakim było poszerzenie dotychczasowej wiedzy dotyczącej udziału acylotransferaz DGAT i PDAT uczestniczących w biosyntezie triacylogliceroli w nasionach soi warzywnej, rącznika zwyczajnego i dwóch odmian kapusty rzepak.

Wstęp – przegląd literatury – rozdział ten stanowi 24-o stronicowe wprowadzenie do problematyki pracy i składa się z trzech podrozdziałów. W pierwszym z nich Autor przedstawił charakterystykę 3 gatunków roślin oleistych badanych w pracy doktorskiej na tle innych roślin oleistych oraz ich znaczenie w diecie ludzkiej i wykorzystanie w różnych gałęziach przemysłu. W kolejnym podrozdziale doktorant szczegółowo scharakteryzował szlaki syntezy triacylogliceroli oraz kwasów tłuszczowych. W tym podrozdziale Doktorant po raz pierwszy i ostatni zamieścił wyjaśnienia skrótów kwasów tłuszczowych (Tabela 2). W tejże tabeli Doktorant

umieścił w tabeli informację, że skrót 18:1 odnosi się do kwasu oleinowego. Jednakże w wynikach używał oznaczenia 18:1Δ9 czyli dokładniejszego zapisu, który dodatkowo oznacza jeszcze pozycję wiązania podwójnego. Wprowadza to jednak w błąd czytelnika.

Na Rysunku 4 Doktorant przedstawił schemat syntezy kwasów tłuszczowych w komórce roślinnej, ale nie umieścił wyjaśnień użytych skrótów, przez co śledzenie tej syntezy z manuskrypcem jest uciążliwe, bo wyjaśnienia skrótów są przedstawione kilka stron wcześniej. Ta sama uwaga dotyczy Rysunku 5, który ukazuje schemat syntezy triacylogliceroli w retikulum endoplazmatycznym komórki roślinnej. Ostatni rozdział wstępu opisuje enzymy typu DGAT i PDAT, które biorą udział w ostatnim etapie szlaku syntezy triacylogliceroli. We wstępie znalazło się kilka nieścisłości dotyczącej cytowania literatury przez Doktoranta np.: cytowana jest publikacja Erhan i in. 1992, a w spisie literatury jest podany rok 1995; Heldt i Piechulla 2011, a w spisie literatury jest rok 2010; Berg i in. 2012, a w spisie literatury jest rok 2015; Leonard i in. 2003, a w spisie literatury jest rok 2004; Harwood i in. 2016, a w spisie literatury jest rok 2013; Banaś i in. 2000, a w spisie literatury jest rok 2013; cytowana jest publikacja Pietruszyński 1949, ale nie ma jej z kolei w spisie literatury; czy powinno być cytowanie Anoh i Min, 2002 czy Akoh i Min, 2002?

Materiały i Metody. Rozdziały obejmują spis aparatury i odczynników chemicznych wykorzystanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Brak numeracji dotyczącej poszczególnych odczynników stosowanych w kolejnych krokach powoduje lekki zamęt, ponieważ w metodach nie ma do nich odnośników, co w przyszłości może utrudnić powtórzenie eksperymentów. Skoro Doktorant pisze, że wykorzystywał wzorce frakcji lipidowych i kwasów tłuszczowych to powinny się one pojawić w spisie odczynników. Sekcja opisana jako Odczynniki stosowane do reakcji *in vitro* jest bardzo nieinformatywna. *Jakie reakcje miał na myśli Doktorant?*

Nie pisze się, że „plazmid posiada odporność na kanamycynę” (str. 42 i 43), ale plazmid niesie oporność na antybiotyki, albo ją warunkuje. W opisie warunków hodowli roślin brakuje parametrów oświetlenia. *Z ilu nasion Doktorant prowadził ekstrakcję lipidów z nasion*, bo informacja od 1 do 10 budzi wątpliwości (str. 47). Podobnie w przypadku izolacji frakcji mikrosomalnej z nasion (od 10 do 100 nasion). Mam pytanie do Doktoranta dotyczące metody izolacji RNA z nasion rzepaku. *Czy metoda ta była wcześniej gdzieś opisana? Co według Doktoranta w metodzie opisanej przez niego jest odpowiednikiem izotiocyjanianu guanidyny (soli chaotropowej) wykorzystywanego w metodzie z TRIAZOLEM?*

Wyniki. W 67 stronicowym rozdziale „Wyniki” Autor po kolei omówił wyniki badań dla trzech gatunków roślin które badał (dodatkowo jeszcze oddzielnie dla rzepaku odmiana MONOLIT i MAPLUS) i pokazał: stadia rozwojowe nasion, analizę zawartości acylolipidów w nasionach, optymalizację warunków reakcji enzymatycznej *in vitro* dla DGAT oraz aktywność tego enzymu na poszczególnych etapach rozwojowych nasion w stosunku do różnych acylo-CoA, jak również aktywność PDAT na różnych etapach rozwojowych nasion. Ta część wyników sprawia trudność w ich śledzeniu, ponieważ ma się wrażenie że czyta się w zasadzie to samo, tylko zmieniają się ilości kwasów, nazwy roślin itp. Na pewno większą korzyścią byłoby przeanalizowanie wyników porównując między sobą poszczególne gatunki roślin w kolejnych podrozdziałach. Czytelnik szybciej byłby w stanie wyłapać różnice bądź podobieństwa. Do tej części wyników mam pytanie: *Dlaczego Doktorant w przypadku nasion soi wyróżnił 3 stadia rozwojowe nasion (bez fazy nasiona dojrzałe), a w przypadku pozostałych dwóch gatunków roślin wyróżnił 4 stadia? Czy mogło to mieć jakieś znaczenie do uzyskanych wyników (np. dla całkowitej zawartości acylolipidów)? Dlaczego nie określono ile dni po zakwitnięciu (DAF) analizowano nasiona rącznika?*

Na Rysunku 9 przedstawiającym procentową zawartość kwasów tłuszczowych w acylolipidach nasion soi jest chaos wynikający z użycia kolorów, które na wydruku ciężko porównać (uwaga dotyczy kwadratów niebieskich odnoszących się do kwasów mirystynowego i wakcenowego). Kwasy powinny być opisane w legendzie tym bardziej, że opis kwasów był w Tabeli 2 na 20 stronie. Te same uwagi odnoszą się do Rysunków 15, 16, 22, 24 i 39. Wracając do Rysunku 9 - na stronie 74 Doktorant pisze, że kwas linolenowy (18:3) jest dominującym kwasem triacylogliceroli nasion soi, ale z Rysunku 9 wynika, że dominuje kwas linolowy (18:2). Podobna sytuacja jest w przypadku rącznika (strona 78 i 79). W przypadku opisu optymalizacji warunków reakcji enzymatycznej *in vitro* dla Bna.DGAT z frakcji mikrosomalnych rzepaku Pan mgr Demski pisze, że stężenie frakcji mikrosomalnych, rodzaj buforu inkubacyjnego i objętość mieszaniny inkubacyjnej zostały zaadoptowane z badań wcześniejszych, ale nie cytuje skąd (publikacja, badania własne wykonane przez pracowników Pracowni Biochemii Roślin?).

W kolejnych etapach badań, Doktorant skupił się na analizie 4 izoform Bna.DGAT1 i 4 izoform Bna.DGAT2, które sklonował do systemu drożdżowego w celu określenia ich specyficzności substratowej względem różnych acylo-CoA. Tą część pracy uważam za najciekawszą, bo brak jest danych literaturowych na temat specyficzności substratowej Bna.DGAT2. Cenne w tym wypadku było zaprezentowanie przez Doktoranta na Rysunku 44 mapy względnej ekspresji izoform Bna.DGAT1 i Bna.DGAT2 w poszczególnych stadiach rozwojowych nasion rzepaku odmian MONOLIT i MAPLUS. Pozwoliło to na zebranie wielu

danych uzyskanych przez mgr Kamila Demskiego w jedną całość. W związku z powyższym mam do Doktoranta pytanie: *Jaka może być przyczyna, że nie odnotowano ekspresji izoformy BnaA.DGAT1.b w przypadku odmiany MONOLIT, a ekspresję tej izoformy odnotowano w przypadku wysokoerukowej odmiany MONOLIT w trzecim stadium rozwojowym nasion?*

Doktorant przedstawił wyniki swojej pracy w postaci 38 rysunków (na 44 w całej pracy) oraz 5 tabel (na 10 w całej pracy). Świadczy to o dużej pracy włożonej przez pana mgr Kamila Demskiego zarówno jeśli chodzi o prace laboratoryjną jak również edytorską.

Dyskusja. Ostatni rozdział pracy „Dyskusja” składa się z 15 stron i zawiera omówienie uzyskanych wyników w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych, których Doktorant zacytował w tym rozdziale 22 pozycje na 138 wszystkich cytowanych w rozprawie doktorskiej. Stosunkowo niewielka liczba cytowanych publikacji może się wiązać ze stosunkowo ograniczoną wiedzą na temat zagadnień poruszanych w ramach pracy doktorskiej. Zagadnienie specyficzności substratowej DGAT w stosunku do różnych acylo-CoA jest wielce złożone i jak wykazują nieliczne badania (w tym również badania prowadzone przez mgr Kamila Demskiego), nie zawsze są skorelowane z akumulowanymi w triacyloglicerolach kwasami tłuszczowymi. Ponad to duże znaczenie ma również stadium rozwojowe nasion i badany gatunek rośliny. W związku z powyższym mam pytanie do Doktoranta - *Czy na podstawie swoich badań i danych literaturowych można pokusić się o jakieś zależności pomiędzy produkowanymi przez rośliny kwasami tłuszczowymi (w znacznych ilościach), a specyficznością substratową DGAT w stosunku do różnych acylo Co-A?* W pracy doktorskiej mgr Kamil Demski badał izoformy Bna.DGAT w związku z powyższym mam pytanie do Doktoranta - *Czy planowane były bądź są planowane badania dotyczące określenia zmian ekspresji izoform Bna.DGAT w odpowiedzi na stres środowiskowy (np. po zaaplikowaniu dorminy)? Jakie warunki stresowe byłyby według Doktoranta najodpowiedniejsze do tego typu badań?* Kolejne pytanie do mgr Kamila Demskiego związane jest z drugim badanym przez niego enzymem katalizującym ostatni etap biosyntezy TAG - enzymu PDAT. *Co Doktorant miał na myśli pisząc w pracy, że RcPDAT wzrasta na jeszcze późniejszym niebadanym w pracy etapie rozwoju nasion rącznika, skoro Doktorant badał 4 stadia rozwojowe nasion (łącznie z dojrzałymi nasionami)?* W swojej pracy doktorskiej mgr Kamil Demski badał trzy gatunki roślin oleistych i we wnioskach napisał, że badania zaprezentowane w pracy mogą w przyszłości być wykorzystane do tworzenia roślin GMO o zmienionym składzie bądź ilości kwasów tłuszczowych w związku z powyższym mam pytanie do Doktoranta - *Co by zmienił (ilościowo/jakościowo) w badanych przez siebie trzech gatunkach roślin oleistych?*

Prezentowana do recenzji praca doktorska napisana jest poprawnym językiem. W pracy znalazły się drobne błędy interpunkcyjne. W rozdziale literatura w pozycji 22 i 29 brak jest tytułu pracy. Nie znalazłam w tekście ujętych w rozdziale piśmiennictwo pozycji literaturowych nr 9, 34, 38, 44, 63, 73 i 134. Z kolei Doktorant zacytował w pracy autorów: Banaś i in. 2000, Chu i Shanklin 2016, Misra i in. 2013, Pietruszyński 1949, Stahl i in. 2004, a nie umieścił ich w rozdziale piśmiennictwo. Jednak powyższe niedociągnięcia redakcyjne nie umniejszają oceny rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, przedstawione wyniki badań prowadzonych przez Pana mgr Kamila Demskiego stanowią ważny wkład w poszerzenie wiedzy dotyczącej końcowego etapu biosyntezy głównych tłuszczu zapasowych ze szczególnym uwzględnieniem dwóch odmian rzepaku niskoerukowej (MONOLIT) i wysokoerukowej (MAPLUS). Pan mgr Kamil Demski wykazał się umiejętnym planowaniem eksperymentów i zdolnością wykorzystania technik biochemicznych i biologii molekularnej.

Recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim (określone w Art. 13 punkt 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 i test jednolity Dz. U. 2016, pozycja 882, 1311), stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w dyscyplinie naukowej, w związku z powyższym, zwracam się do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana magistra Kamila Demskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

