

## RECENZJA

### ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANA MGR BARTOSZA GŁĄBA PT. „CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA I POTENCJALNE ZNACZENIE FIZJOLOGICZNE ACYLOTRANSFERAZ ACYLO-CoA:GLICEROLO-3- FOSFOCHOLINA”

Poszukiwania naturalnych wydajnych źródeł olejów i tłuszczów stałych do różnych celów praktycznych dostarczyły impetu badaniom biologicznym, biochemicznym i wysiłkom w biotechnologii roślin, w tym szczególnie roślin oleistych. Metabolizm energetyczny części zapasowych roślin, który wcześniej wydawał się w pełni wyjaśniony okazuje się nadal bardziej skomplikowany niż sądzono. Co pewien czas identyfikowane są nowe enzymy katalizujące reakcje, których wcześniej nie podejrzewano. Do tej grupy należy acylotransferaza przenosząca reszty kwasu tłuszczowego na glicerolo-3-fosfocholinę (GPCAT). Oceniana praca opisuje właśnie tę aktywność i katalizujący przemianę niedawno sklonowany enzym kodowany w genomie drożdży piekarniczych i obecny w roślinach, w tym oleistych.

Praca mgr Bartosza Głęba pt. „CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA I POTENCJALNE ZNACZENIE FIZJOLOGICZNE ACYLOTRANSFERAZ ACYLO-CoA:GLICEROLO-3-FOSFOCHOLINA” zawiera 150 ponumerowanych stron, w tym 53 rysunki, 9 tabel, 140 pozycji cytowanego piśmiennictwa i 1 adres cytowanej strony *www*. Układ pracy jest tradycyjny dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk przyrodniczych. Dołączono jeden rozdział obejmujący wykaz stosowanych skrótów i streszczenie w języku polskim. Hierarchiczny podział głównych rozdziałów rozprawy jest prawidłowy. Pod względem metodologii prezentacji rozprawa nie budzi zastrzeżeń.

Wstęp dysertacji, nazwany wprowadzeniem, jest adekwatny merytorycznie do opisu prowadzonych badań Autora ale według mnie stanowczo za długi i nazbyt szczegółowy a narracja prowadzona jest *ab ovo* co w pracach doktorskich jest raczej mankamentem. Rozdział ten mógłby zaczynać się od podrozdziału 4.4 ale i dalej pomijać te podrozdziały opisujące części metabolizmu, którymi Autor w ogóle się nie zajmował. Brakuje natomiast w podsumowaniu wstępu odniesienia do znaczenia metabolicznego nowej reakcji, obiektu badań Autora czyli enzymu GPCAT (acylotransferazy glicerolo-3-fosfocholinowej) na planie

ogólnym. Szczegółowe badania tej aktywności w drożdżach piekarniczych i w roślinach pozostają bowiem w słabym związku z fizjologicznymi aspektami drożdży i roślin. Rozdział „Błony biologiczne i ich homeostaza” wiąże co prawda skład lipidowy błon z różnymi ich właściwościami ale jaka jest relacja różnych dróg syntezy lipidów z ostatecznym wynikiem nie zostało nawet zasugerowane. Po głębszym przemyśleniu tego rodzaju hipotetyczna relacja mogłaby się stać hipotezą roboczą.

Autor brał kluczowy udział w sklonowaniu GPCAT z drożdży i roślin i to osiągnięcie całego zespołu ma również wpływ na jego ocenę. Nie było to jednak jej głównym celem pracy a są nimi raczej dalsze etapy tego dużego projektu wykonywanego w kooperacji szwedzko-polskiej. Cele pracy doktorskiej zostały sformułowane jako: dokonanie charakterystyki biochemicznej GPCAT i dalej analiza specyficzności substratowej enzymu z wyjaśnieniem pewnego szczegółowego aspektu tejże specyficzności oraz sprawdzenie roli fizjologicznej enzymu poprzez alternatywne badania wpływu wyłączenia i nadekspresji *GPC1* pochodzącego z drożdży piekarniczych w tych komórkach, również w roślinie modelowej – rzodkiewniku *Arabidopsis thaliana* a także w dwóch roślinach oleistych – rączniku pospolitym i w kapuście rzepek. Jak wspominałem brakuje mi tutaj sformułowania roboczej hipotezy, którą chciałbym usłyszeć od Doktoranta w trakcie obrony.

Opis użytych w projekcie materiałów i metod jest przedstawiony prawidłowo a pod względem ilościowym niemal wyczerpująco. Poza niedomogami redakcyjnymi, opisanymi dalej dla całej pracy, można uznać że poziom szczegółowości opisu pozwala na niezależne powtórzenie wyników z jednym zastrzeżeniem merytorycznym. Zauważam bowiem brak standaryzacji najczęściej używanych do oznaczeń aktywności enzymów preparatów mikrosomalnych. Wyniki są przedstawiane w postaci bezwzględnych ilości nieznakowanych i  $^{14}\text{C}$ -znakowanych produktów (w nanomolach) otrzymanych w określonym czasie. Jak Autor chciałby zagwarantować ich odtwarzalność jeżeli przykładowo będą reprodukowane w innym laboratorium z inaczej otrzymanymi mikrosomami?

Rozdział Wyniki rozpoczyna się od prezentacji zdjęć frakcji mikrosomalnej drożdży piekarniczych i z liści *Arabidopsis thaliana* uzyskanych w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Nie są one wysokiej jakości a identyfikowane struktury są na nich obecne raczej domyślnie. Sugerowałbym w miejsce fotografii mikroskopowej raczej oznaczenie biochemiczne znaczników molekularnych dla mikrosomów, mitochondriów, błon retikulum czy cytoplazmy. Badania aktywności określonych reakcji enzymatycznych przeprowadzone są natomiast fachowo a przedstawione, z zastrzeżeniem powyższej uwagi, czytelnie.

Wydaje się, że drożdżowy model badawczy którym posługiwał się Autor w swoich badaniach spełnił swoje zadanie. Pojedyncze delecje genów *Gpc1* albo *Ale1* oraz podwójna delecja genów *Ale1 Gpc1* pozwoliły bowiem stworzyć warunki eliminujące dziką transacylację glicerolo-3-fosfocholiny z udziałem acylo-CoA albo kwasu lizofosfatydowego. Transfekcja plazmidami zawierającymi natomiast sklonowany gen *GPC1* pod kontrolą promotora galaktozowego, pozwalając na jego nadekspresję, pozwoliła przypisać całą obserwowaną aktywność temu produktowi genu. Pojawienie się natomiast dwóch podstawowych produktów reakcji: kwasu fosfatydowego i kwasu lizofosfatydowego pozostawiło otwartą kwestię mechanizmu ich powstawania. Jest to zatem bardzo ciekawa sytuacja homeostazy metabolicznej, w której udział biorą co najmniej dwa enzymy przenoszące acyl na glicerolo-3-fosfocholiny z różnych donorów, enzymy przenoszące acyl na kwas lizofosfatydowy ale również enzymy hydrolizujące wiązanie estrowe z kwasami tłuszczowymi. Na ten złożony obraz nakłada się dodatkowo zróżnicowana zdolność panelu dostępnych acyli do przenoszenia pomiędzy donorami i akceptorami. W ustaleniu dynamicznych zmian tego układu niezbędna byłaby pełna analiza profili specyficzności i parametrów kinetycznych wszystkich działających w układzie enzymów a ostatecznie zastosowanie programu symulującego tę wypadkową kinetykę. Jestem bardzo ciekawy jakie podejście *in silico* proponowałby Autor dla rozwiązania tego problemu.

Z powyższego wywodu staje się widoczne że Autor podjął się bardzo złożonego zadania, w którym liczba zmiennych jest znaczna. Badania metabolizmu pośredniego zawsze były skomplikowane ale starano się układy doświadczalne *in vitro* maksymalnie upraszczać aby wnioski były wiarygodne choć nadal nie tożsame z sytuacją *in vivo*. Jest zrozumiałe że pełna rekonstrukcja prostego układu enzymatycznego ze zdefiniowanymi składnikami jest bardzo trudna gdyż badane enzymy mogą działać wyłącznie w interakcji z błoną mikrosomalną ale nie jest również niemożliwa. Autor nawiązuje do tego w Dyskusji co należy z uznaniem podkreślić.

W podsumowaniu i wnioskach na końcu pracy Doktorant wiarygodnie potwierdził, że jednoetapowa reakcja katalizowana przez produkt genu *GPC1* w acylacji glicerolo-3-fosfocholiny z udziałem aktywnych kwasów tłuszczowych jest dominująca w drożdżach piekarniczych. Dokonano przy tym charakterystyki enzymu głównie pod kątem specyficzności wobec różnych acylo-CoA. Tym niemniej udział lizofosfolipidów jako dawców kwasu tłuszczowego okazał się znaczący. Acylacja niezależna od acylo-CoA wykazana została również w nasionach niektórych roślin oleistych. Obecność homologicznych do drożdżowego *GPC1* genów Autor wykazał w *Arabidopsis thaliana*,

*Ricinus communis* i w *Brassica napus*. Pośrednio udowodnił również udział produktu genu w transacylacjach pomiędzy dwoma różnymi kwasami lizofosfatydowymi. Należy przy tym uznać zdolność Autora do krytycznej analizy wyników prowadzących do tego wniosku.

Nie osiągnięto natomiast celu powiązania specyficzności substratowej i typu kinetyk enzymu GPCAT ze jego znaczeniem fizjologicznym. Nie jest to jednak proste co potwierdzam na podstawie własnych badań nad innymi enzymami również odkrytymi w nowych źródłach.

Podsumowując opis wyników, należy podkreślić że gros celów postawionych przed przystąpieniem do projektu został osiągnięty, co jest Doktoranta jak i jego współpracowników wielką zasługą. Nie ma żadnych zastrzeżeń do poprawności postępowania doświadczalnego, wybranej metodologii dla każdego etapu i ostatecznych wyników.

Dyskusja potwierdza dojrzałość Autora jako osoby potrafiącej spojrzeć na swoje dokonania w kontekście innych podobnych badań i perspektyw dla uzyskanych przez siebie tak interesujących nowych enzymów.

Podsumowując całą część doświadczalną należy potwierdzić wyróżniającą się jakość pracy, bardzo wysoki poziom dokładności laboratoryjnej i jej zakres w znaczeniu ilościowym znacznie przekraczający średnią ilość wyników prezentowanych w doktoratach z tej dziedziny.

Z obowiązku recenzenckiego chciałbym też zaznaczyć kilka istotnych mankamentów w opracowaniu i prezentacji wyników.

1. Rysunki 12, 13, 14 oraz 20 zawierają przebiegi funkcji kinetycznych i wysycenia substratem bez punktów przecięcia z osiami wykresu lub bez wyprowadzenia z początku wykresu (0,0). Nie jest to prawidłowa prezentacja a w przypadku wykresu Lineweavera-Burk'a wręcz błędna gdyż to właśnie z punktów przecięcia tej zależności z osiami oznacza się wartości parametrów  $K_M$  i  $V_{max}$ .

2. Wiele histogramów ze słupkami wartości zróżnicowanych tylko odcieniami szarości jest trudno czytelnych a niektóre (przykładowo Rys. 25) są zupełnie niezrozumiałe.

3. Przynajmniej w dwóch miejscach mylony jest 3-fosfoglicerol z kwasem 3-fosfoglicerynowym (str. 21, 2 linia od góry i str. 65, linia 12 od dołu).

4. We wstępie i w pozostałych rozważaniach nad ogólnym metabolizmem lipidów tłuszczowych przydałoby się użycie czytelnych schematów. Są one obecne w pracy ale rozdrobnione na poszczególne rozdziały. Połączenie rysunków 4, 5 i 7 i dodanie do nich elementów opisanych trudnym do śledzenia tekstem na stronie 26 w jeden schemat znacznie ułatwiłoby zrozumienie zagadnienia.

5. Tabela skrótów (rozdział 3 na stronie 9) jest niekompletna (przykład LPA, 18:0, 18:1 etc.) i nie powinna zawierać innych skrótów po stronie odkodowanej (przykładowo GPCAT).

6. Pomimo logicznej prawidłowości użycia słowa „poszlaka” w Dyskusji, zastąpienie tego prawniczego terminu słowami „dowód pośredni” lub „dowód z okoliczności” jest w nauce o wiele częstsze.

Pewna ograniczona ilość błędów drukarskich, ortograficznych, interpunkcyjnych i leksykalnych nie zmniejsza wartości estetycznej pracy.

Powyższe uwagi nie obniżają również zasadniczej wartości naukowej recenzowanej pracy, która zawiera bardzo poważny element nowości naukowej w objętości bezwzględnie wystarczającej dla uzyskania stopnia naukowego doktora. W podsumowaniu uważam, że dysertacja pana mgr Bartosza Głaba pt. „CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA I POTENCJALNE ZNACZENIE FIZJOLOGICZNE ACYLOTRANSFERAZ ACYLO-CoA:GLICEROLO-3-FOSFOCHOLINA” odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z 14 marca 2003 r. (Dz. Ust. Nr 65/2003, poz. 595, z późn. zm.) dla rozpraw na stopień doktora i uznaję, że pan mgr Bartosz Głab **może być dopuszczony do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Prof. dr hab. n.med. Andrzej Cezary Składanowski, prof. zw. GUMed

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed

Gdańsk, 9 lutego 2018 r.