

Białowieża, 24. kwietnia 2015 r.

Prof. dr hab. Jan M. Wójcik
Instytut Biologii Ssaków PAN
w Białowieży
e-mail: jwojcik@ibs.bialowieza.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Czajkowskiej
pt. „Polimorfizm genów szlaku przemian kwasów tłuszczowych a profil lipidowy błon
komórkowych i tempo metabolizmu podstawowego u myszy laboratoryjnej”**

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Czajkowskiej została wykonana w Instytucie Biologii na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem Pana prof. dr. hab. Mirosława Ratkiewicza.

Rozprawa została przedstawiona w formie manuskryptu o łącznej objętości 199 numerowanych stron, w tym: Streszczenie (w języku polskim i angielskim) zajmuje 11 stron, Wstęp - 22 strony, Materiał i metody - 32 strony, Wyniki - 23 strony, Dyskusja - 27 stron, Literatura - 13 stron (231 pozycji), oraz Suplement - 15 stron. Ponadto praca zawiera 18 tabel, 22 wykresy i 6 rycin. Całość została opracowana bardzo starannie, zarówno tekst jak i strona ilustracyjna.

W rozprawie Doktorantka podjęła próbę wyjaśnienia, czy teoria metronomu błonowego (ang. membrane pacemaker), zakładająca, że tempo metabolizmu podstawowego (BMR) zależy od składu lipidowego błon komórkowych, potwierdza się na poziomie wewnątrzgatunkowym. Obiektem badań były samce myszy laboratoryjnej (*Mus musculus*), pochodzące z eksperymentu selekcyjnego na niskie i wysokie BMR, prowadzonego przez 32 pokolenia w Zakładzie Ekologii Zwierząt Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku. Głównym celem rozprawy było ustalenie, czy obserwowane różnice w profilu lipidowym błon komórkowych oraz w BMR u myszy selekcyjonowanych na niskie i wysokie BMR są powodowane wpływem polimorfizmu i/lub zróżnicowaną ekspresją genów kodujących enzymy szlaku przemian kwasów tłuszczowych. Ponadto Doktorantka postanowiła sprawdzić, czy te różnice zmniejszają podatność błon komórkowych na peroksydację, przy jednoczesnym zachowaniu dużej płynności, niezbędnej do utrzymania wysokiego BMR.

Doktorantka dobrze poradziła sobie z trudnymi zagadnieniami badawczymi i uzyskała wartościowe wyniki. Wykonała wiele analiz laboratoryjnych, zarówno genetycznych, jak i biochemicznych. Analizowała sekwencje genów kodujących enzymy szlaku przemian kwasów tłuszczowych oraz oznaczyła stopień ich ekspresji. Oszacowała wskaźnik różnicowania genetycznego (F_{ST}) pomiędzy badanymi liniami myszy, w celu wyznaczenia poziomu dryfu genetycznego. Oznaczyła jakość i ilość kwasów tłuszczowych w hepatocytach, co pozwoliło ustalić skład lipidowy błon komórkowych. Wykonała także pomiary aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy) u badanych myszy. Uzyskane dane szczegółowo analizowała korzystając z różnych narzędzi statystycznych.

Doktorantka uzyskała kompletne sekwencje odcinków egzonowych 9. genów (trzech desaturaz - *Scd1*, *Fads1*, *Fads2*; pięciu elongaz - *Elovl1*, *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl5*, *Elovl6*, oraz genu białka regulatorowego SREBP-1c). Miejsca zmienne wykryła w jedynie dwóch genach desaturaz: *Scd1* $\Delta 9$ -desaturazy oraz *Fads2* $\Delta 6$ -desaturazy. Natomiast nie wykazała różnic w ekspresji wszystkich badanych genów zarówno w przypadku linii selekcyonowanych na niskie i wysokie BMR, jak i w porównaniach tych linii z liniami nieselekcyjnymi oraz u osobników posiadających różne warianty alleli w genach *Scd1* oraz *Fads2*.

W eksperymentach, w których prowadzi się sztuczną selekcję bardzo trudnym zadaniem jest stwierdzenie, czy obserwowana zmienność genetyczna jest wynikiem działania doboru czy przypadkowych zmian częstości alleli (dryfu genetycznego). W tej pracy Doktorantka postanowiła zmierzyć się z tym problemem. Dlatego oszacowała wskaźnik różnicowania genetycznego (F_{ST}) pomiędzy badanymi liniami myszy przy pomocy markerów mikrosatelitarnego DNA (10 loci). Wykazała, że różnicowanie genetyczne pomiędzy liniami selekcyonowanymi na niskie i wysokie BMR było istotnie większe w locus *Fads2* niż w przypadku każdego z 10 loci mikrosatelitarnych. Wynik ten może sugerować, że na to locus działa dobór, chociaż nie można całkowicie wykluczyć wpływu dryfu genetycznego. W przypadku polimorfizmu w genie *Scd1*, Doktorantka nie uzyskała podobnych wartości, dlatego uznała, że prawdopodobnie różnicowanie w tym locus jest wynikiem działania dryfu genetycznego. Analizując polimorfizmy w genach *Fads2* oraz *Scd1* Doktorantka stwierdziła, że prawdopodobnie mają one wpływ na tempo metabolizmu podstawowego u myszy selekcyonowanych na niskie i wysokie BMR, niezależnie od tego, czy różnicowanie to powstało w wyniku działania doboru czy dryfu genetycznego.

Ważnym wynikiem rozprawy doktorskiej Pani mgr Czajkowskiej było stwierdzenie polimorfizmu w genie *Fads2* $\Delta 6$ -desaturazy. Polimorfizm ten jest odpowiedzialny za

powstawanie odmiennych wariantów białka, które wykazują zróżnicowanie w wartościach indeksu aktywności enzymów kodowanych przez ten gen. Różnice w aktywności tych enzymów prowadzą do re-aranżacji składu błon komórkowych hepatocytów, co mogło wpływać na poziom BMR badanych myszy.

Oceniana rozprawa doktorska nie dostarczyła dowodu na to, że teoria metronomu błonowego ma zastosowanie również na poziomie wewnątrzgatunkowym. Co prawda, występowało zróżnicowanie indeksu saturacji (proporcji jednonienasyconych do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych) u badanych myszy, ale niezgodne z założeniami teorii metronomu błonowego. Mianowicie Doktorantka stwierdziła, że myszy selekcyjonowane na niskie BMR charakteryzowały się istotnie mniejszym udziałem jednonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz istotnie większym udziałem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów, w porównaniu do myszy selekcyjonowanych na wysokie BMR. Natomiast osobniki o wysokim BMR charakteryzowały się wyższą wartością indeksu saturacji błon komórkowych, podczas gdy indeksy nienasyceń oraz peroksydacji nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy tymi dwoma liniami selekcyjnymi. Dlatego Doktorantka uznała, że błony komórkowe myszy z obu linii selekcyjnych były w równym stopniu chronione przed szkodliwym działaniem wolnych rodników. Ponadto Doktorantka nie znalazła istotnych różnic w poziomie aktywności pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATPazy) u myszy selekcyjonowanych na niskie i wysokie BMR oraz u osobników posiadających różne genotypy w genach *Scd1* oraz *Fads2*.

Moim zdaniem Doktorantka trafnie podsumowała wyniki swoich badań. Stwierdziła bowiem, że w porównaniach zwierząt należących do jednego gatunku, zróżnicowanie BMR może wynikać z kompensowania przeciwstawnych mechanizmów, tj. utrzymywania błon o większym stopniu saturacji, a jednocześnie tej samej płynności. Zapewnia to ochronę przed swoistą pułapką ewolucyjną w postaci podatności błon komórkowych na peroksydację. Doktorantka stwierdziła również, że badania te podkreślają rolę desaturacji w szlaku metabolicznych przemian kwasów tłuszczowych i jej wpływ na tempo metabolizmu podstawowego oraz sugerują, że pozostaje ona pod kontrolą badanych genów.

Chciałbym podkreślić, że pod względem metodycznym i merytorycznym badania przeprowadzone przez Panią mgr Czajkowską nie budzą zastrzeżeń. Tekst rozprawy jest napisany przejrzystym i poprawnym językiem, a tabele, ryciny i załączniki (Suplement) zostały przygotowane bardzo starannie. Dyskusja została przeprowadzona z dużą znajomością zagadnień badawczych poruszanych w rozprawie. Mam jednak pewne

zastrzeżenia do sposobu przeprowadzenia dyskusji. Długie fragmenty zawierają prezentację i omówienie (dyskusję) wyników uzyskanych przez innych autorów, bez wyraźnego odniesienia się do wyników tej rozprawy. Fragmenty te są bardziej podobne do wstępu niż do dyskusji. Niemniej jednak, rozdział Dyskusja, jako całość prezentuje się bardzo solidnie.

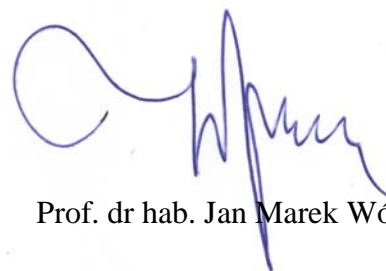
Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Czajkowskiej zasługuje na wysoką ocenę. Doktorantka wykazała się gruntowną wiedzą w podejmowanym temacie, potwierdzając to znajomością literatury. Recenzowana praca doktorska jest oryginalna i nowatorska. Eksperymenty naukowe zaplanowano i przeprowadzono bardzo rzetelnie z wykorzystaniem nowoczesnych technik i metod badawczych. Uzyskane dane analizowano z użyciem odpowiednich narzędzi statystycznych. Zapewne wyniki tej rozprawy doktorskiej będą dostrzeżone i z zainteresowaniem przyjęte przez innych badaczy.

Wniosek końcowy

Konkludując, stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Polimorfizm genów szlaku przemian kwasów tłuszczowych a profil lipidowy błon komórkowych i tempo metabolizmu podstawowego u myszy laboratoryjnej” spełnia warunki, 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; ze zm. w Dz. U. z 2011 r. nr 84, poz. 455).

Zwracam się zatem do Rady Naukowej Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Czajkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową rozprawy doktorskiej, uważam, że zasługuje ona na wyróżnienie stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Jan Marek Wójcik