



nencki institute
of experimental biology

POLSKA AKADEMIA NAUK
INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
IM. M. NENCKIEGO

Pracownia Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Tel. (0 22) 589 22 61; Fax. (0 22) 822 53 42

E-mail: adobrzyn@nencki.gov.pl; <http://www.team.nencki.gov.pl>

Prof. nadzw. dr hab. Agnieszka Dobrzyń
Pracownia Sygnałów Komórkowych
i Zaburzeń Metabolicznych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Warszawa 25.03.2015

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”

Postęp technik biologii molekularnej ostatniego pięćdziesięciolecia pozwala na prowadzenie badań na poziomie subkomórkowych mechanizmów leżących u podstaw funkcji fizjologicznych oraz genetycznego uwarunkowania cech. Zrozumienie roli polimorfizmów genów w regulacji właściwości fizyko-chemicznych błon komórkowych oraz tempa metabolizmu, jest istotne dla wyjaśnienia mechanizmów prowadzących do powstawania zaburzeń, w tym dys-regulacji metabolizmu komórki. Badania ostatnich lat wykazały, że enzymy zaangażowane w metabolizm lipidów, zwłaszcza w syntezę *de novo* i desaturację długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, odgrywają istotną rolę w regulacji takich procesów jak: proliferacja i różnicowanie komórek, acylacja i sortowanie białek, procesy zapalne oraz aktywacja enzymów i receptorów błonowych. Zaburzenia w metabolizmie kwasów tłuszczowych, mogą prowadzić do zmiany wrażliwości komórki na czynniki zewnątrzkomórkowe (t.j. hormony, cytokiny), zaburzeń w syntezie białek oraz zmian w metabolizmie substratów energetycznych. Stąd, podjęcie przez **mgr Magdalenę Czajkowską** badań określających związek pomiędzy polimorfizmem w genach kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm lipidów i składem kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych oraz tempem metabolizmu, u myszy pochodzących z selekcyjnych linii różniących się tempem metabolizmu podstawowego, wydaje się pomysłem trafnym i bardzo aktualnym. Doktorantka postawiła sobie za cel: (1) weryfikację teorii metronomu błonowego na poziomie wewnątrzgatunkowym poprzez zidentyfikowanie polimorfizmów sekwencji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm lipidów oraz określenie wpływu genotypu na aktywność w/w enzymów, profil lipidowy, tempo metabolizmu podstawowego oraz przetestowanie czy geny lipogenne są pod wpływem selekcji prowadzonej w kierunku niskiego i wysokiego tempa metabolizmu podstawowego; (2) zweryfikowanie hipotezy, że bony komórkowe myszy z wysokim tempem metabolizmu podstawowego charakteryzują się większą płynnością i są bardziej podatne na peroksydację wywołaną stresem oksydacyjnym; oraz (3) określenie sił doboru naturalnego i dryftu genetycznego działających w sztucznie prowadzonej selekcji w kierunku niskiego i wysokiego tempa metabolizmu podstawowego u myszy laboratoryjnej. Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem wątroby myszy pochodzących z 2 linii selekcyonowanych na niskie (L-BMR) i wysokie (H-BMR) tempo metabolizmu podstawowego w 32 pokoleniu. Jako kontrolę, do analiz porównawczych, wykorzystano myszy pochodzące z 3 linii nieselekcyonowanych na żadną cechę, w pokoleniu 16.

Przedstawiona do oceny dysertacja stanowi obszerne, bo liczące 199 stron opracowanie, w którym Autorka przedstawiła wyniki swoich badań wykonanych w Zakładzie Zoologii Kręgowców, Instytutu Biologii, Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem Prof. dr hab. Mirosława Ratkiewicza. Praca podzielona jest na następujące rozdziały: 1) Streszczenie w języku polskim i angielskim (11 stron), 2) Wstęp (22 strony), 3) Cele pracy (2 strony), 4) Materiał i metody (30 stron), 5) Wyniki (23 strony), 6) Dyskusja (24 strony), 7) Podsumowanie (3 strony), 8) Spis piśmiennictwa (13 stron), 9) Tabele (19 stron), 10) Wykresy (23 strony), 11) Ryciny (7 stron), 12) Suplement (14 stron). Pod względem redakcyjnym praca ma klasyczny układ dla dysertacji doktorskich.

Wstęp stanowi konsekwentne wprowadzenie do części eksperymentalnej. W tej części rozprawy Autorka bardzo szeroko i w sposób świadczący o znajomości tematu przedstawia istotne informacje, które są pomocne w zrozumieniu zagadnień poruszanych w następnych częściach pracy oraz w analizie uzyskanych wyników badań. Znajdują się tu informacje dotyczące podstaw genetycznego uwarunkowania cech, tempa metabolizmu podstawowego oraz eksperymentów selekcyjnych wykorzystywanych w badaniach zmienności organizmów. Obszerłą część wstępu Doktorantka poświęca omówieniu teorii metronomu błonowego oraz charakterystyce enzymów biorących udział w regulacji metabolizmu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Układ tych podrozdziałów jest logiczny i podporządkowany przedstawionemu celowi pracy oraz jest szerokim i przekonującym uzasadnieniem podjęcia badań. Wszystkie zawarte w nim zagadnienia omówione są z dużą swobodą, co wzbudza uznanie dla szerokiej wiedzy Doktorantki.

Część doświadczalna pracy doktorskiej opisana jest bardzo szczegółowo. Uwagę zwraca różnicowany warsztat metodyczny oraz dokładne opisy przeprowadzonych procedur eksperymentalnych. Ten szczegółowy opis metod z pewnością stanowić będzie kompendium metodyczne dla następnych doktorantów. Pokazuje on, że doktorantka opanowała szereg bardzo trudnych i czasochłonnych metod analitycznych, zarówno z zakresu biologii molekularnej (tj. izolacja DNA i RNA, projektowanie starterów do reakcji PCR, amplifikacja analizowanych genów przy użyciu PCR, sekwencjonowanie, identyfikacja polimorfizmów, analiza ekspresji genów, analiza loci mikrosatelitarnego DNA) oraz metod z zakresu biochemii (analiza tempa metabolizmu podstawowego, analiza kwasów tłuszczowych w lipidach całkowitych i fosfolipidach błonowych przy użyciu GC, analiza aktywności pompy sodowo-potasowej). Do tego dochodzi bardzo dobrze dobrana i wykonana analiza statystyczna otrzymanych wyników. Wszystko to potwierdza duży potencjał naukowy Doktorantki.

Rozdział **Wyniki** jest niewątpliwie najważniejszą i najbardziej interesującą częścią rozprawy. Do najciekawszych rezultatów otrzymanych przez Doktorantkę należy wykazanie, że myszy o odmiennych genotypach polimorficznych w genach *Scd1* i *Fads2*, różnią się tempem metabolizmu podstawowego. W genie *Scd1* wykazano istnienie 2 mutacji: (1) guanina zastąpiona została adeniną (w kodonie kodującym treoninę) oraz (2) adenina zastąpiona tyminą (w kodonie kodującym alaninę). Interesujące jest to, że mimo iż obie te mutacje są mutacjami milczącymi, miały one istotny wpływ na fenotyp zwierząt: zarówno na skład kwasów tłuszczowych, indeks aktywności desaturazy stearoilo-CoA (SCD) jak i tempo metabolizmu podstawowego. Podobnie, w przypadku genu *Fads2* wykazano istnienie 2 polimorfizmów, z których jeden ma charakter zmiany sensu. Badania te pozwoliły na wykazanie istnienia 2 alleli w genie *Fasd2*, odpowiadających dwóm wariantom białka desaturazy $\Delta 6$ (D6D). Współczynnik różnicowania genetycznego wykazał, że linie selekcyonowane na niskie i wysokie tempo metabolizmu podstawowego charakteryzowały się wysokim i istotnym różnicowaniem genetycznym w obu analizowanych genach. Warto także podkreślić, że oprócz analizy genów lipogennych, u każdego zwierzęcia wykonano także analizę 10 loci mikrosatelitarnego DNA (jako neutralne

tło genetyczne), co świadczy o dużej dociekliwości naukowej Doktorantki, a także dobrej znajomości zasad stosowanych w analizach genetycznych. Dane uzyskane przez Doktorantkę zostały przedstawione w postaci 22 wykresów, 6 rycin, 18 tabel. Materiały uzupełniające zostały umieszczone w suplemencie, który składa się z 6 rycin oraz informacji o sekwencjach analizowanych w pracy genów.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka omówiła uzyskane przez siebie wyniki w oparciu o najnowsze obserwacje opublikowane w piśmiennictwie światowym. Duża część cytowanych prac została opublikowana w ostatnich latach. Cała dyskusja dowodzi, że Pani mgr Magdalena Czajkowska bardzo łatwo porusza się w trudnych zagadnieniach związanych z genetycznym uwarunkowaniem cech oraz określeniem sił doboru naturalnego i dryftu genetycznego działających w sztucznie prowadzonej selekcji. Zaskakuje jedynie krytyczne podejście Doktorantki do uzyskanych przez Nią wyników pokazujących, że polimorfizm w genie *Scd1* może być bezpośrednio związany z regulacją tempa metabolizmu podstawowego, zwłaszcza, że wyniki te są zgodne z danymi pochodzącymi z modeli zwierzęcych z nokautem (myszy *Scd1^{-/-}*) lub mutacją (myszy *asebia*) genu *Scd1* oraz z danymi opisującymi polimorfizmy genu *SCD1* u ludzi (Warensjo et al. 2007, Boberg et al. 2014). Zwięzłe podsumowanie wyników badań i ich naukowego komentarza zawartego w Dyskusji Doktorantka zawarła w ostatnim rozdziale pracy, który dobrze podsumowuje prezentowane badania i zwięzłe odpowiada na stawiane w pracy cele.

Chociaż w całości rozprawa nie budzi zastrzeżeń w zakresie oryginalności tematyki badawczej, zastosowanej metodyki badań, czy interpretacji wyników, pragnę – z obowiązku recenzenta – zwrócić uwagę Doktorantki na pewne drobne uchybienia interpretacyjne, redakcyjne, nazewnicze itp., które wzbudziły moje wątpliwości:

(1) Pewne zastrzeżenia wzbudza zastosowana kontrola (3 linie nieselekcjonowane na żadną cechę, US1-3), ponieważ Doktorantka nie wykazała różnic w tempie metabolizmu podstawowego między tymi 'kontrolnymi' liniami i grupą H-BMR (Wykres 1). W liniach US1-3 stwierdzono także dużą zmienność w polimorfizmach genu *Scd1* i w indeksie aktywności SCD. Wyniki te pokazują, że wybrane linie US1-3, nie są najlepszą kontrolą do eksperymentu selekcyjnego analizowanego przez Doktorantkę. W moim przekonaniu, nie obniża to wartości pracy, ponieważ w przeprowadzonych badaniach najważniejsze było porównanie linii selekcjonowanych L-BMR i H-BMR. W przypadku tych linii, nie ma wątpliwości co do doboru i sposobu wykonania selekcji – jak wykazała wartość współczynnika inbredu - zastosowany system kojarzeń jest dobrany prawidłowo, a myszy w obrębie linii w danym pokoleniu były krzyżowane z minimalną wsobnością. Jedynie sugerowałabym, by podczas przygotowywania tych wyników do publikacji nie nazywać linii nieselekcjonowanych na żadną cechę, grupą 'kontrolą', bo to wprowadza niepotrzebną konsternację.

(2) Nie jest też jasne dlaczego indeks saturacji błon komórkowych nie uwzględnia zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych? (liczba nasyconych kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych mówi o sztywności błon i jest kluczowa dla ich funkcji!). Poza tym, wszelkie indeksy mówiące o saturacji, nienasyceciu czy peroksydacji błon komórkowych powinny być liczone tylko na podstawie zawartości kwasów tłuszczowych w fosfolipidach, a nie zawartości kwasów w lipidach całkowitych, ponieważ w wątrobie jest bardzo duża zawartość triacylogliceroli i wliczanie ich do 'indeksów bonowych' jest obarczone dużym błędem, co widać w Tabeli 14 (i na co Doktorantka sama zwróciła uwagę w Dyskusji).

(3) Biorąc pod uwagę fakt, że kwas linolowy (18:2) dostarczany jest z dietą, wątpliwości wzbudza zastosowana metoda analizy indeksu aktywności D6D. Czy myszy z niskim i wysokim tempem metabolizmu podstawowego jadły tyle samo? (spodziewam się, że myszy z wysokim tempem metabolizmu jedzą dużo więcej, co też wynika z pracy Książek i in.

[2009]). To pytanie jest o tyle zasadne, że przeprowadzona przez Doktorantkę analiza regresji (Wykres 21 i 22) wykazała, że zwierzęta z wyższym indeksem aktywności D6D charakteryzowały się mniejszą zawartością PUFA we frakcji lipidów całkowitych oraz brakiem różnic w zawartości PUFA w fosfolipidach. Być może więc stosunek kwasów 18:3/18:2 nie odzwierciedla faktycznej aktywności enzymatycznej D6D? Ten sam błąd pojawia się na Rycinie 1, gdzie kwas 18:2 jest wpisany w szlak syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych i zaznaczony jako produkt reakcji katalizowanej przez D6D i jest to niepoprawne, ponieważ kwas 18:2 jest jednym z tych kwasów, które nie mogą być syntetyzowane w komórkach ssaczych i muszą być dostarczane z pożywieniem.

Nieistotne merytorycznie uwagi edytorskie dotyczą:

- W pracy zostało wprowadzonych bardzo dużo skrótów, których Doktorantka nie używa, za każdym razem (przez całą pracę) pisząc zarówno pełną nazwę jak i skrót, co jest niepoprawne. Raz wprowadzony skrót powinien być stosowany konsekwentnie przez całą długość pracy. Być może dodanie do dysertacji rozdziału 'Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń', ułatwiłoby redakcję tekstu.

- Część nazw białek jest niezgodna z polską nomenklaturą (np. SREBP – to białko wiążące sterolowy element regulatorowy, a nie 'białko wiążące sekwencję odpowiedzi na sterole'), nie wiadomo jak należy rozumieć określenie '...szlak metabolizmu kwasu tłuszczowego...' czy '...szczytywanie krzywej topnienia...' itp., nie jasne jest też co Doktorantka ma na myśli pisząc gen *Scd1c*. Poza tym, w polskiej nomenklaturze naukowej używa się słowa 'błony biologiczne' nie 'membrany biologiczne', 'aktywność enzymów' nie '...wydajność enzymów...', 'amplifikacja/powielanie DNA' nie 'namnażanie DNA', 'siateczka śródplazmatyczna' nie 'retikulum endoplazmatyczne', 'omega-7' nie 'omeg-7' itd., również określenia typu '...gen kandydat na selekcję...' czy 'poziom organizmalny' (w odniesieniu do cechy pojawiającej się na poziomie organizmu) są raczej niefortunne.

- Przedstawienie tych samych wyników na wykresach i w tabelach (np. Ryc. 1A i Tab. 6; ryciny S1-S6 i tabele 15-16) wprowadza pewną dezorientację i jest zupełnie zbędnym powtórzeniem. Wydaje się też, że wstawienie rycin i wykresów do tekstu w rozdziałach Wstęp oraz Wyniki, zamiast na końcu rozprawy, znacznie ułatwiłoby czytelnikowi percepcję treści.

- Analiza kwasów tłuszczowych była przeprowadzona w wątrobie. W skład wątroby wchodzi różne komórki i mimo, że hepatocyty stanowią ponad 80% masy tego organu, interpretacja, że wszystkie opisane zmiany dotyczyły hepatocytów jest nieprawidłowa.

- Zwracam także uwagę, że pomiar indeksów desaturacji nie jest tożsamy z analizą aktywności enzymatycznej SCD czy D6D i nie może być w ten sposób określany (p. Materiały i Metody oraz Wyniki).

Podsumowując, niezależnie od wymienionych w recenzji drobnych uwag krytycznych, przedstawioną pracę oceniam wysoko. Autorka postawiła przed sobą interesujące cele, które osiągnęła przy użyciu nowoczesnych technik badawczych. Doktorantka wykazała umiejętność samodzielnego rozwiązywania problemów naukowych i badawczych wykazując potrzebną do tego wiedzę, jak i przygotowanie teoretyczne. Wnioski płynące z jej badań są bardzo istotne dla poznania roli polimorfizmów w genach *Scd1* i *Fads2* w regulacji właściwości fizyko-chemicznych błon komórkowych i tempa metabolizmu podstawowego. Przedstawiona do oceny praca spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65. poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego, Uniwersytetu w Białymstoku, o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Czajkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agnieszka Dolnyś