

WYDZIAŁ BIOLOGII UNIWERSYTETU GDAŃSKIEGO

Katedra Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin

dr hab. Anna Aksmann, prof UG

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Saldat

pt. „Biotechnological potential of diacylglycerol acyltransferases from *Nannochloropsis oceanica* for boosting lipid production in diverse hosts”.

Promotor: Pan dr hab. Krzysztof Zienkiewicz, prof. UMK

Promotor pomocniczy: Pan prof. Zhi-Yan (Rock) Du

Niniejsza recenzja sporządzona została w związku z powołaniem mnie przez Radę Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, 20.03.2026 roku, na Recenzenta w postępowaniu o nadanie stopnia doktora Pani mgr Marcie Saldat. Doktoranka przedstawiła pracę pt. „Biotechnological potential of diacylglycerol acyltransferases from *Nannochloropsis oceanica* for boosting lipid production in diverse hosts” w postaci monografii.

Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pani mgr Marty Saldat pt. „Biotechnological potential of diacylglycerol acyltransferases from *Nannochloropsis oceanica* for boosting lipid production in diverse hosts” wykonana została pod opieką promotorską Pana dr hab. Krzysztofa Zienkiewicza, prof. NCU. Promotorem pomocniczym jest Pan prof. Zhi-Yan (Rock) Du. Rozprawa ma formę monografii, składającej się ze streszczenia, wstępu, części metodycznej, opisu wyników, dyskusji i wniosków oraz spisu literatury. Zawiera również oświadczenie Doktorantki o jej udziale w powstawaniu tej pracy oraz deklarację o oryginalności zawartych w rozprawie treści. Rozprawa zawiera 49 rycin, 27 tabel (w tym jedną stanowiącą suplement) oraz spis skrótów stosowanych w pracy i spis treści. Całość rozprawy zawarta jest na 149 stronach maszynopisu.

Rozprawa jest napisana zwięzłym, klarownym językiem charakterystycznym dla prac naukowych, z zachowaniem nomenklatury właściwej dla tematyki badań opisanych przez Doktorantkę. Wstęp, którego integralną częścią jest publikacja przeglądowa, której Doktorantka jest współautorką, stanowi obszerne i szczegółowe wprowadzenie w tematykę rozprawy doktorskiej. Część ta kończy się wyjaśnieniem celów rozprawy doktorskiej oraz przedstawieniem jej podstawowych założeń, sformułowanych jasno i precyzyjnie. Część metodyczna pracy zawiera

szczegółowy opis materiału biologicznego wykorzystywanego w badaniach, stosowanych procedur, metod i technik badawczych. Zawarte w tym rozdziale informacje są kompletne i wystarczające, aby ocenić poprawność metodyczną prowadzonych eksperymentów i trafność doboru metod badawczych do zakładanych celów oraz poprawność interpretacji wyników. W części zawierającej opis wyników udokumentowane są prowadzone przez doktorantkę eksperymenty. Rezultaty badań przedstawione zostały w postaci zdjęć, schematów i danych liczbowych, opatrzonych komentarzami tekstowymi. Wyniki opisane zostały niezwykle skrupulatnie, a jednocześnie w sposób zwięzły i klarowny. Graficzne ich przedstawienie uważam za cenną część tego rozdziału pracy, pozwalającą dogłębnie przeanalizować dokonania Doktorantki.

Następującym po opisie wyników rozdziałem pracy jest dyskusja, podzielona na tematyczne podrozdziały, skupione kolejno na specjalizacji funkcjonalnej analizowanych enzymów, biosyntezie triacylogliceroli, znaczenia tych substancji dla funkcjonowania komórki fotoautotroficznej oraz znaczenia badań doktorantki dla szeroko rozumianej biotechnologii roślin i glonów. Dyskusja, zakończona jasno sformułowanymi wnioskami, jest oparta o dobrze dobraną, aktualną literaturę przedmiotu, której spis stanowi uzupełnienie pracy.

Od strony redakcyjnej praca jest przygotowana bardzo starannie, schematy, wykresy i tabele są czytelne i dobrze ilustrują uzyskane w pracy wyniki. Tekst jest przejrzysty i skonstruowany według zasad obowiązujących w pracach naukowych.

Niewątpliwą zaletą rozpatrywanej rozprawy doktorskiej jest wyraźnie widoczna konsekwencja w realizacji kolejnych etapów badań, konstruowanych w oparciu o uzyskane wcześniej wyniki, w sposób systematyczny, przemyślany, prowadzący do coraz bardziej szczegółowej analizy badanych zjawisk. Według mnie świadczy to o rozwoju Doktorantki jako naukowca zdolnego do **prowadzenia samodzielnej pracy naukowej**. Nie można nie zwrócić również uwagi na wielowątkowość badań i szeroki wachlarz stosowanych technik i metod badawczych, których stosowanie, a przede wszystkim interpretacja uzyskiwanych za ich pomocą wyników, wymagają posiadania **ogólnej wiedzy w dziedzinie nauk biologicznych**. O tym, że Doktorantka wiedzę taką posiada, świadczy także wybór aktualnej, dobrze uzasadnionej tematyki badań z zakresu biotechnologii organizmów fotoautotroficznych oraz bardzo trafny wybór organizmów, na których prowadzono badania. Takie badania mają wartość nie tylko poznawczą, ale również aplikacyjną i służącą wypracowaniu metod zrównoważonego rozwoju, co w dobie rosnącego zapotrzebowania na żywność i surowce przemysłowe jest niewątpliwie jednym z priorytetów współczesnej nauki. Z tego względu przeprowadzone przez Doktorantkę badania są nie tylko elementem jej osobistego rozwoju naukowego, ale również stanowią znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne i tworzą spójne, **oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**.

Uwagi szczegółowe dotyczące rozprawy doktorskiej

Podczas realizacji swojej pracy doktorskiej Pani mgr Marta Saldat postawiła sobie za główny cel wykonanie funkcjonalnej charakterystyki wcześniej mało poznanych genów (NoDGTT7 - NoDGTT12) kodujących acylotransferazy diacyloglicerolu typu 2 (DGTT; często określane w literaturze jako DGAT2) i określenie ich znaczenia dla biosyntezy triacylogliceroli (TAG), a także weryfikacja, czy funkcjonalna hierarchia w obrębie rodziny DGTT ogranicza się wyłącznie do izoform indukowanych niedoborem azotu. W mojej opinii cel ten został osiągnięty, co możliwe było dzięki zastosowaniu kompleksowego, wieloaspektowego podejścia badawczego, obejmującego analizy bioinformatyczne, heterologiczną ekspresję w modelowym układzie drożdżowym, badania w organizmie macierzystym (glon jednokomórkowy) oraz organizmie modelowym należącym do roślin wyższych (rzodkiewnik). Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały istnienie wyraźnych różnic funkcjonalnych między badanymi izoformami enzymów oraz pozwoliły na ustalenie hierarchii ich aktywności. Według mnie szczególnie istotnym osiągnięciem Doktorantki jest identyfikacja izoformy NoDGTT12 jako najbardziej efektywnego enzymu syntezy TAG, co sugeruje, że wysoka wydajność katalityczna tego typu enzymów nie musi być ograniczona wyłącznie do izoform indukowanych stresem azotowym.

Pani mgr Saldat mogła osiągnąć nadrzędny cel pracy doktorskiej dzięki temu, że z powodzeniem realizowała kolejne szczegółowe cele badań, którymi były: (1) przeprowadzenie analizy porównawczej sekwencji i struktury genów NoDGTT7 - NoDGTT12 w celu zidentyfikowania konserwatywnych i różnicujących cech, które mogą leżeć u podstaw specjalizacji funkcjonalnej w obrębie grupy DGTT niewrażliwych na azot; (2) funkcjonalna charakterystyka tychże genów poprzez heterologiczną ekspresję w szczepie drożdży H1246 z zaburzoną syntezą TAG, co umożliwiło ilościową analizę ich zdolności do syntezy TAG; (3) zidentyfikowanie izoform DGTT o wysokiej wydajności i ich scharakteryzowanie pod kątem biochemicznym i lipidomicznym oraz ocena ich preferencji substratowych i wpływu na skład TAG; (4) zbadanie wpływu najwydajniejszej izoformy w organizmie macierzystym poprzez stabilną nadekspresję i analizę fenotypową komórek glonowych; (5) ocena najwydajniejszej izoformy pod kątem ewolucyjnym poprzez heterologiczną ekspresję w roślinie wyższej w celu sprawdzenia wydajności w organizmie odległym ewolucyjnie.

W odniesieniu do pierwszego celu szczegółowego należy zauważyć, że przeprowadzone analizy sekwencyjne i strukturalne umożliwiły wykazanie istotnej dywersyfikacji białek kodowanych przez poszczególne geny, obejmującej różnice w liczbie domen transbłonowych oraz organizacji strukturalnej, co jednoznacznie sugeruje ich funkcjonalną specjalizację. Cel ten został zatem zrealizowany w pełni i stanowi solidną podstawę do interpretacji kolejnych wyników.

Drugi cel szczegółowy, dotyczący charakterystyki funkcjonalnej badanych genów w układzie heterologicznym, również został osiągnięty. Pani mgr Marta Saldat wykazała, że poszczególne

izofromy DGTT różnią się znacząco zdolnością do indukowania syntezy TAG w szczepie drożdży pozbawionym tej funkcji, co umożliwiło bezpośrednie porównanie ich aktywności enzymatycznej.

Realizacja kolejnego (3) celu znalazła potwierdzenie w identyfikacji izoform o najwyższej aktywności, a następnie w ich szczegółowej charakterystyce. Przede wszystkim wykazano preferencje substratowe NoDGTT12 oraz jego istotny wpływ na skład kwasów tłuszczowych w TAG, co świadczy o wysokim poziomie zaawansowania wykonanych analiz.

Kolejny zrealizowany z sukcesem cel obejmował analizę funkcji izofromy NoDGTT12 w organizmie macierzystym. Cel ten został zrealizowany poprzez uzyskanie linii transgenicznych *Nannochloropsis oceanica* nadekspresyjujących NoDGTT12. Doktorantka wykazała przy tym wzrost akumulacji TAG w komórkach glonów oraz istotne zmiany w profilu lipidowym, co potwierdziło znaczenie tej izofromy enzymu w regulacji metabolizmu lipidów w komórkach *N. oceanica*.

Ostatnim, niejako zamykającym badania (o ile możliwe jest zamknięcie jakiegokolwiek tematu naukowego) celem założonym w pracy było zbadanie jak NoDGTT12 funkcjonuje w odległym ewolucyjnie modelu roślinnym, rzodkiewniku (*Arabidopsis thaliana*). Ekspresja genu u mutantu pozbawionego aktywności DGAT doprowadziła do przywrócenia syntezy TAG oraz odbudowy kropli lipidowych, co silnie wskazuje na wysoką uniwersalność funkcjonalną badanego enzymu oraz jego potencjał biotechnologiczny.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa w sposób konsekwentny i przekonujący realizuje wszystkie założone cele badawcze. Na szczególne podkreślenie zasługuje nie tylko kompleksowość podejścia eksperymentalnego, lecz również fakt uzyskania nowych, istotnych poznawczo i aplikacyjnie wyników, które poszerzają dotychczasową wiedzę na temat organizacji funkcjonalnej rodziny DGTT oraz mechanizmów biosyntezy TAG w mikroglonach i jestem przekonana o jej wysokim poziomie naukowym. Tym niemniej, podczas jej czytania nasunęły mi się pewne spostrzeżenia i pytania, które chciałabym wyrazić z nadzieją, że będzie okazja do przedyskutowania ich podczas obrony rozprawy doktorskiej.

Po pierwsze, Doktorantka postawiła wyraźną hipotezę dotyczącą funkcjonalnej hierarchii w obrębie grupy enzymów DGTT, sugerując możliwość istnienia wysoko wydajnych enzymów wśród izoform nieindukowanych niedoborem azotu. Jednakże, choć wyniki jednoznacznie wskazują na dominującą rolę izofromy NoDGTT12, zabrakło mi jasno sformułowanego odniesienia do głównego celu badawczego, który był dla mnie sformułowany nieco na zasadzie rozróżnienia izofromy „nitrogen-responsive” vs. „non-nitrogen-responsive”. Trudno mi było znaleźć w dyskusji jednoznaczne podsumowanie, które jasno odnosi się do tej hipotezy. Liczę, że Doktorantka zechce odnieść się do tej kwestii podczas prezentacji swojej rozprawy doktorskiej podczas obrony.

Kwestia druga dotyczy realizacji celów szczegółowych rozprawy, a konkretnie celu pierwszego, odnoszącego się do analizy sekwencyjnej i strukturalnej wykonanej *in silico*. Analizy te stanowią świetne tło interpretacyjne, jednak liczyłabym, że ich bezpośrednie powiązanie z wynikami funkcjonalnymi będzie wyraźniej wyeksponowane w części dyskusyjnej. Gdyby związek między obserwowaną różnorodnością strukturalną a aktywnością enzymatyczną udałoby się jasno zaprezentować podczas obrony, byłby to świetny akcent podkreślający wartość badań.

Kolejna moja uwaga dotyczy celu 5 (ewolucyjnego). Pani mgr Marta Soldat przeprowadziła bardzo ambitne porównanie funkcjonalne badanych enzymów i ekspresji kodujących je genów pomiędzy organizmami o różnym stopniu organizacji i odległych ewolucyjnie, co jest niewątpliwie cenne. Jednak wnioski dotyczące konserwatywności funkcjonalnej mogłyby zostać bardziej ostrożnie sformułowane lub szerzej osadzone w kontekście literaturowym. Uwaga moja wynika ze znanych mi różnic w metabolizmie lipidów u roślin wyższych i mikroglonów, tym bardziej, że według mojej wiedzy *Nannochloropsis oceanica*, podobnie jak lepiej mi znany *Chlamydomonas reinhardtii*, posiada hybrydowy model szlaków metabolizmu lipidów, łączący cechy zarówno organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych.

Pragnę podkreślić, że powyższe uwagi mają jedynie uzupełniający charakter i nie podważają wysokiej wartości naukowej pracy.

Podsumowując, w mojej opinii do najważniejszych osiągnięć Pani mgr Marty Soldat należy zaliczyć przede wszystkim kompleksową charakterystykę funkcjonalną niebadanych wcześniej genów NoDGTT7–NoDGTT12, co istotnie poszerza wiedzę o zróżnicowaniu enzymów kodowanych przez te geny. Na szczególne podkreślenie zasługuje identyfikacja izoformy NoDGTT12 jako enzymu o najwyższej wydajności syntezy TAG, co podważa często wyrażane w literaturze przekonanie o dominującej roli izoform indukowanych niedoborem azotu. Istotnym osiągnięciem jest również wykazanie istnienia funkcjonalnej hierarchii w obrębie badanej rodziny enzymów, opartej na bezpośrednich analizach porównawczych. Dużą wartością pracy jest zastosowanie wielomodelowego podejścia eksperymentalnego, obejmującego zarówno układy heterologiczne, jak i organizm macierzysty oraz model roślinny. Na uwagę zasługuje także pogłębiona charakterystyka wybranych izoform. Uzyskane wyniki mają znaczenie zarówno poznawcze, jak i potencjalnie aplikacyjne w kontekście biotechnologii lipidów.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Marty Soldat pt. „Biotechnological potential of diacylglycerol acyltransferases from *Nannochloropsis oceanica* for boosting lipid production in diverse hosts” wykonana pod opieką promotorską Pana dr hab. Krzysztofa Zienkiewicza, prof. NCU oraz Pana prof.

Zhi-Yan (Rock) Du spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2024.1571 ze zm.), tj.:

- stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego jakim jest wykonanie funkcjonalnej charakterystyki wcześniej mało poznanych genów (NoDGTT7 - NoDGTT12) kodujących acylotransferazy diacyloglicerolu typu 2 (DGTT; często określane w literaturze jako DGAT2) i określenie ich znaczenia dla biosyntezy triacylogliceroli (TAG) w kontekście poznawczym i aplikacyjnym,

- prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauki biologiczne i specjalistyczną w zakresie biologii molekularnej, fizjologii roślin i biotechnologii;

- świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej na wszystkich jej etapach, od formułowania hipotez i planowania badań, po interpretację wyników i wyciąganie wniosków.

Wobec powyższego wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Saldat i dopuszczenie jej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie, mając na uwadze wysoką wartość naukową przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej, **wnoszę o jej wyróżnienie**, a uzasadnienie tego wniosku załączam do niniejszej recenzji.



UZASADNIENIE WNIOSKU O WYRÓŻNIENIE**rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Saldat**

pt. „Biotechnological potential of diacylglycerol acyltransferases from *Nannochloropsis oceanica* for boosting lipid production in diverse hosts”, stanowiące załącznik do sporządzonej przeze mnie recenzji tejże pracy.

Promotor: Pan dr hab. Krzysztof Zienkiewicz, prof. UMK

Promotor pomocniczy: Pan prof. Zhi-Yan (Rock) Du

W mojej opinii rozprawę doktorską Pani mgr Marty Saldat cechuje **wyróżniający się poziom merytoryczny**. Już sam podjęty problem badawczy jest ważny i ciekawy, ponieważ dotyczy badań z zakresu biotechnologii organizmów fotoautotroficznych i ich potencjału aplikacyjnego, co może przyczynić się do wypracowania metod zrównoważonego rozwoju społecznego i gospodarczego wielu krajów. Zakres badań obejmuje niezwykle szeroką analizę molekularną, biochemiczną, cytologiczną i fizjologiczną, co świadczy o kompleksowym podejściu do tematu. Nieprzeciętnie szerokie jest spektrum stosowanych metod i technik badawczych. Co więcej, rozpatrywana rozprawa doktorska wyróżnia się pod względem **zastosowanych metod i narzędzi badawczych**. Zastosowany zestaw tych metod należy ocenić jako nowoczesny i adekwatny do postawionych celów. Szczególną wartością pracy jest umiejętna integracja analiz bioinformatycznych z badaniami eksperymentalnymi prowadzonymi w trzech układach modelowych, co znacząco wzmacnia wiarygodność uzyskanych wyników i pozwala na ich szeroką interpretację funkcjonalną.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Marty Saldat wyróżnia się kompleksowym podejściem do badań, łączącym różne obszary nauki, takie jak biologia molekularna, biochemia, cytologia. Ponadto, praca wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat funkcjonowania szlaków metabolizmu lipidów u różnych organizmów niezwierzęcych i ich potencjału biotechnologicznego. Mając na uwadze powyższe zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z prośbą o rozważenie możliwości wyróżnienia rozpatrywanej pracy i uhonorowania Doktorantki w sposób przyjęty w Uniwersytecie Mikołaja Kopernika.

