



Toruń, 26th of February 2026

city, date

Full name of doctoral student: Marta Saldat

Album no.: 503294

PESEL no.:

DOCTORAL DISSERTATION ABSTRACT

Scientific discipline: Biological sciences

Title of the doctoral dissertation: Biotechnological potential of diacylglycerol acyltransferases from *Nannochloropsis oceanica* for boosting lipid production in diverse hosts.

Doctoral dissertation abstract:

This doctoral dissertation focuses on the analysis of the functional properties of type 2 diacylglycerol acyltransferases (DGATs type 2, also referred to as DGTTs) using the model oleaginous microalga *N. oceanica* CCMP1779, whose genome encodes an exceptionally rich repertoire of DGTT genes. Triacylglycerols (TAGs) represent the major form of carbon and energy storage in eukaryotic cells and play a key role in microalgal stress responses and metabolic flexibility. Despite the crucial role of DGTT enzymes in TAG biosynthesis, the functional basis for the extensive expansion of DGTT gene families in microalgae remains poorly understood.

This dissertation presents a comprehensive functional analysis of selected DGTT genes encoded by the genome of *N. oceanica* CCMP1779 (*NoDGTTs*) and addresses significant knowledge gaps related to their functional properties, degree of specialization, and potential applications in metabolic engineering across diverse experimental systems.

An integrated approach was employed, combining *in silico* analyses, molecular biology techniques (including heterologous gene expression and overexpression), microscopy, and analytical biochemistry, enabling systematic characterization of individual *NoDGTT* genes. Bioinformatic analyses revealed substantial structural diversity among *NoDGTT* isoforms, suggesting functional differentiation and distinct



biotechnological potential in the context of sustainable lipid production. Functional characterization of individual NoDGTT enzymes was conducted using a genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* H1246 strain deficient in TAG synthesis, allowing direct comparison of their capacities to promote TAG accumulation, independently of endogenous regulatory mechanisms present in microalgal cells. The results demonstrated pronounced functional differences among individual DGTT isoforms of *N. oceanica* CCMP1779 and enabled the establishment of a functional hierarchy within this enzyme family. Among the enzymes analyzed, NoDGTT12 emerged as the most efficient TAG-producing isoform. Detailed characterization of NoDGTT12 revealed a strong capacity to induce TAG biosynthesis in H1246 yeast, *N. oceanica* CCMP1779, and the model land plant *Arabidopsis thaliana*. Results obtained across these diverse experimental systems confirm that the activity of NoDGTT12 is an intrinsic property of the protein and is maintained across different cellular environments.

In summary, this dissertation significantly advances the current understanding of the functional organization of the TAG biosynthetic machinery encoded by the genome of *N. oceanica* CCMP1779. The findings provide new insights into the molecular mechanisms underlying induced TAG accumulation and identify NoDGTT12 as a promising tool for the development of metabolic engineering strategies aimed at enhancing the production of high-energy lipids in eukaryotic cells.

Tytuł rozprawy doktorskiej: Biotechnologiczny potencjał acylotransferaz diacyloglicerolowych z *Nannochloropsis oceanica* w zwiększaniu produkcji lipidów w zróżnicowanych systemach biologicznych.

Streszczenie rozprawy doktorskiej:

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy analizy funkcjonalnej acylotransferaz diacyloglicerolu typu 2 (DGAT typ 2, określanych również jako DGTT) z wykorzystaniem modelowej mikroalgi oleistej *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779, której genom koduje wyjątkowo bogaty zestaw genów DGTT. Triacyloglicerol (TAG) stanowi główną formę magazynowania węgla i energii w komórkach eukariotycznych oraz odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi mikroglonów na stres i ich elastyczności metabolicznej. Pomimo kluczowej roli enzymów DGTT w biosyntezie TAG, funkcjonalne podstawy tak rozległej ekspansji rodzin genów DGTT u mikroglonów pozostają nadal słabo poznane.

Rozprawa przedstawia kompleksową analizę funkcjonalną wybranych genów DGTT kodowanych przez genom *N. oceanica* CCMP1779 (NoDGTT) oraz podejmuje próbę wypełnienia istotnych luk wiedzy dotyczących ich właściwości funkcjonalnych, stopnia specjalizacji oraz potencjału zastosowań w inżynierii metabolicznej w różnych systemach eksperymentalnych.

W niniejszej pracy zastosowano zintegrowane podejście obejmujące analizy *in silico*, techniki biologii molekularnej (w tym heterologiczną ekspresję genów oraz ich nadekspresję), mikroskopię oraz biochemię analityczną, co umożliwiło systematyczną charakterystykę poszczególnych genów NoDGTT. Analizy bioinformatyczne ujawniły znaczną różnorodność strukturalną izoform NoDGTT, sugerując ich funkcjonalne zróżnicowanie oraz odmienne możliwości zastosowań biotechnologicznych w kontekście



zrównoważonej produkcji lipidów. Funkcjonalną charakterystykę poszczególnych enzymów NoDGTT przeprowadzono z wykorzystaniem genetycznie zmodyfikowanego szczepu *Saccharomyces cerevisiae* H1246, pozbawionego zdolności syntezy TAG, co umożliwiło bezpośrednie porównanie ich zdolności do promowania akumulacji TAG, niezależnie od endogennych mechanizmów regulacyjnych obecnych w komórkach mikroglonów.

Uzyskane wyniki wykazały wyraźne różnice funkcjonalne pomiędzy poszczególnymi izoformami DGTT *N. oceanica* CCMP1779 oraz pozwoliły na ustalenie hierarchii funkcjonalnej w obrębie tej rodziny enzymów. Spośród analizowanych enzymów, NoDGTT12 wyłania się jako najbardziej efektywna izoforma produkująca TAG. Szczegółowa charakterystyka NoDGTT12 wykazała jego wysoką zdolność do indukowania biosyntezy TAG w drożdżach szczepu H1246, *N. oceanica* CCMP1779 oraz w modelowej roślinie lądowej *Arabidopsis thaliana*. Wyniki uzyskane w tak zróżnicowanych systemach eksperymentalnych potwierdzają, że aktywność NoDGTT12 jest właściwością wewnętrzną białka i pozostaje zachowana w odmiennych środowiskach komórkowych.

Podsumowując, niniejsza rozprawa istotnie pogłębia aktualny stan wiedzy na temat funkcjonalnej organizacji maszynerii biosyntezy TAG kodowanej przez genom *N. oceanica* CCMP1779. Uzyskane wyniki dostarczają nowych informacji na temat molekularnych mechanizmów leżących u podstaw indukowanej akumulacji TAG oraz identyfikują NoDGTT12 jako obiecujące narzędzie do rozwoju strategii inżynierii metabolicznej ukierunkowanych na zwiększenie produkcji wysokoenergetycznych lipidów w komórkach eukariotycznych.

Monika Szaldek

doctoral student's signature