

AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU
I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

dr Krzysztof Zienkiewicz

Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu



1. Imię i Nazwisko:

Krzysztof Zienkiewicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2007 – doktor nauk biologicznych – Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu; Tytuł rozprawy doktorskiej: „Wewnątrzkomórkowa lokalizacja elementów systemu splicingowego w różnicującym się ziarnie pyłkowym i rosnącej łagiewce pyłkowej *Hyacinthus orientalis* L.”. Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Bednarska-Kozakiewicz. Recenzenci: prof. dr hab. Maria Filek, prof. dr hab. Anna Majewska-Sawka.

2002 – magister biologii – Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, specjalizacja biologia molekularna; tytuł pracy magisterskiej: „Wewnątrzkomórkowa lokalizacja białek Sm w różnicującej się mikrosporze modrzewia *Larix decidua* Mill. Promotor: prof. dr hab. Alicja Górską-Brylass.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **01.07.2017 – obecnie** – Adiunkt Naukowy w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (urlop bezpłatny w związku z zagranicznym stażem podoktorskim).
- **15.05.2017 – obecnie** – Postdoctoral Research Associate, Department of Plant Biochemistry, Albrecht von Haller Institute for Plant Sciences, University of Göttingen, **Niemcy**.
- **15.05.2016-14.05.2017** – Stypendysta Marie Curie, Department of Plant Biochemistry, Albrecht von Haller Institute for Plant Sciences, University of Göttingen, **Niemcy**.
- **15.05.2014-14.05.2016** – Stypendysta Marie Curie, US Department of Energy Plant Research Laboratory, Michigan State University, East Lansing, **Stany Zjednoczone**.
- **01.11.2008-14.05.2014** – Postdoctoral Research Associate, Department of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology of Plants, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Agency, Granada, **Hiszpania**.

- **01.10.2008 – 30.06.2017** – Adiunkt w Zakładzie Biologii Komórki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (urlop bezpłatny w związku z zagranicznymi stażami podoktorskimi).
- **01.10.2003 – 30.09.2008** – Asystent w Zakładzie Biologii Komórki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.
- **01.10.2002 – 30.09.2003** – Doktorant w Zakładzie Biologii Komórki, Studium Doktoranckie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

**Mechanizmy i biotechnologiczne strategie zwiększania syntezy i akumulacji lipidów
w komórkach mikroglonów**

b) cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (publikacje zestawiono w kolejności omawiania ich w autoreferacie):

H-1 Zienkiewicz K, Du Z-Y, Ma, W, Vollheyde K, Benning C. (2016). Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae – Molecular, cellular and physiological insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861: 1269-1281.

- (IF₂₀₁₆: 5.547; punktacja MNiSW: 35)
- *Mój udział w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji artykułu, zebraniu i systematyzacji danych literaturowych, przygotowaniu rycin 1, 2 oraz 4 i tabeli 1, pisaniu, redagowaniu i ostatecznej korekcie manuskryptu. Mój wkład procentowy szacuję na 70%.*

H-2 Zulu NN*, **Zienkiewicz K***, Vollheyde K, Feussner I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research* 70: 1-16.

- (IF₂₀₁₇: 8.435; punktacja MNiSW: 50)

- *Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu i systematyzacji danych literaturowych, pisaniu, przygotowaniu figur 2 oraz 3, redagowaniu i ostatecznej korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy jest równy* z Zulu NN i szacuję go na 40%.*

H-3 Tsai CH, **Zienkiewicz K**, Amstutz CL, Brink BG, Warakanont J, Roston R, Benning C. (2015). Dynamics of protein and polar lipid recruitment during lipid droplet assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 83: 650-660.

- (IF₂₀₁₅: 5.468; punktacja MNiSW: 45)
- *Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji badań nad rolą białka MLDP (Major Lipid Droplet Protein) w biogenezie, stabilizacji i mobilizacji kropeł tłuszczu u jednokomórkowej zielenicy z gatunku *Chlamydomonas reinhardtii*, kolokalizacji białka MLDP z kroplami tłuszczu *in situ*, badaniach nad morfologią i organizacją strukturalną kropeł tłuszczu w komórkach *C. reinhardtii* z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko MLDP oraz po depolimeryzacji białka tubuliny (wyniki moich badań umieszczono na rycinach 1 oraz 4), interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu i udziale w korekcie wszystkich wersji manuskryptu. Mój wkład procentowy szacuję na 30%.*

H-4 Du ZY, Lucker BF, **Zienkiewicz K**, Miller TE, Zienkiewicz A, Sears BB, Kramer DM, Benning C. (2018). Galactoglycerolipid lipase PGD1 is involved in thylakoid membrane remodeling in response to adverse environmental conditions in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*. 30: 447-465.

- (IF₂₀₁₇: 8.228; punktacja MNiSW: 45).
- *Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji badań nad funkcjonalną charakterystyką lipazy PGD1 u *C. reinhardtii*, zebraniu, przygotowaniu i analizie prób przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz mikroskopu konfokalnego, pomiarach i analizie statystycznej błon chloroplastowych na uzyskanych elektronogramach, interpretacji uzyskanych wyników (wyniki moich badań zostały zamieszczone na rycinach 3, 5 oraz w tabeli nr 1). Ponadto pozyskałem współfinansowanie badań (Projekt AlgaeOilSynth Europejskiej Agencji Wykonawczej ds. Badań REA towarzyszący Stypendium Marie Skłodowskiej-Curie w ramach 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej, grant nr. 627266). Mój wkład procentowy szacuję na 20%.*

H-5 **Zienkiewicz K***, Benning U*, Siegler U, Feussner I. (2018). The type 2 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase family of the oleaginous microalga *Lobosphaera incisa*. *BMC Plant Biology* 18: 298.

- (IF₂₀₁₇: 3.930; punktacja MNiSW: 40).

- *Mój udział w powstanie tej pracy polegał na: współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań nad rodziną acylotransferaz diacylglicerolu (DGAT) kodowanych przez genom *Lobosphaera incisa*, zbiorze materiału roślinnego, mikroskopowej analizie nadekspresji genów DGAT z *L. incisa* w komórkach mutantu drożdżowego H1246 (konfokalny laserowy mikroskop skaningowy) (wyniki moich badań umieszczono na rycinach 1, 3, 5 oraz w danych dodatkowych S3, S5, S6), interpretacji uzyskanych wyników, pisaniu tekstu i redagowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy jest równy* z Benning U i szacuję go na 40%.*

H-6 Zienkiewicz K, Zienkiewicz A, Poliner E, Du Z-Y, Vollheyde K, Herrfurth C, Marmon S, Farré EM, Feussner I, Benning C. (2017). Nannochloropsis, a rich source of diacylglycerol acyltransferases for engineering of triacylglycerol content in different hosts. *Biotechnology for Biofuels* 10:8.

- *(IF₂₀₁₇: 5.497; punktacja MNiSW: 45)*
- *Mój udział w powstanie tej pracy polegał na: autorstwie koncepcji badań nad rodziną acylotransferaz diacylglicerolu (DGAT) kodowanych przez genom *Nannochloropsis oceanica*, zbiorze materiału roślinnego, analizie ekspresji genów kodujących enzymy DGAT podczas hodowli *N. oceanica* w medium optymalnym oraz pozbawionym azotu, mikroskopowej analizie nadekspresji acylotransferazy diacylglicerolu 5 (NoDGTT5) w komórkach *N. oceanica* (konfokalny laserowy mikroskop skaningowy), w komórkach mutantu drożdżowego H1226 (transmisyjny mikroskop elektronowy) oraz w liściach *Arabidopsis thaliana* i *Nicotiana benthamiana* (konfokalny laserowy mikroskop skaningowy), ilościowej i jakościowej analizie tłuszczu syntetyzowanych przez wymienione organizmy (chromatografia gazowa – spektrometria mas, GC-MS) (wyniki moich badań umieszczono na rycinach 1, 3, 4, 5, 6 oraz w danych dodatkowych S6, S7, S9 i S10), interpretacji uzyskanych wyników, pisaniu tekstu oraz znaczący udział w redagowaniu manuskryptu a także w pozyskaniu finansowania badań (Projekt *AlgaeOilSynth* Europejskiej Agencji Wykonawczej ds. Badań REA towarzyszący Stypendium Marie Skłodowskiej-Curie z 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej, grant nr. 627266). Mój wkład procentowy szacuję na 70%.*

H-7 Du ZY, Alvaro J, Hyden B, Zienkiewicz K, Benning N, Zienkiewicz A, Bonito G, Benning C. (2018). Enhancing oil production and harvest by combining the marine alga *Nannochloropsis oceanica* and the oleaginous fungus *Mortierella elongata*. *Biotechnology for Biofuels* 11:174.

- *(IF₂₀₁₇: 5.497; punktacja MNiSW: 45).*
- *Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: stworzeniu stabilnych transformantów *N. oceanica* z nadekspresją genu kodującego acylotransferazę diacylglicerolu NoDGTT5, zbiorze materiału roślinnego, udziale w interpretacji wyników współhodowli *N. oceanica* i *M. elongata* oraz pozyskaniu*

współfinansowania badań (Projekt AlgaeOilSynth Europejskiej Agencji Wykonawczej ds. Badań REA towarzyszący Stypendium Marie Skłodowskiej-Curie z 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej, grant nr. 627266). Mój udział procentowy szacuję na 10 %.

H-8 Poliner E, Pulman J, **Zienkiewicz K**, Childs K, Benning C, Farré EM. (2018). A toolkit for *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 enables gene stacking and genetic engineering of the eicosapentaenoic acid pathway for enhanced long-chain polyunsaturated fatty acid production. *Plant Biotechnology Journal* 16: 298-309.

- (IF₂₀₁₇: 6.305; punktacja MNiSW: 45)
- Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: analizie nadekspresji genów kodujących desaturazy w transformantach *N. oceanica* przy użyciu techniki Western-blott, zbiorze i przygotowaniu materiału do mikroskopowej analizy ekspresji konstruktów fuzyjnych kodujących enzym desaturazę i błękitne białko fluorescencyjne (z ang. cyan fluorescent protein - CFP) na poziomie mikroskopu konfokalnego (wyniki moich badań umieszczono na rycinie 6 i w danych dodatkowych S5), znacznym udziale w interpretacji uzyskanych wyników i przygotowaniu manuskryptu, udziale w korekcie późniejszych wersji pracy oraz na pozyskaniu współfinansowania badań (Projekt AlgaeOilSynth Europejskiej Agencji Wykonawczej ds. Badań REA towarzyszący Stypendium Marie Skłodowskiej-Curie z 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej, grant nr. 627266). Mój udział procentowy szacuję na 15 %.

H-9 Zulu NN, Popko J, **Zienkiewicz K**, Tarazona P, Herrfurth C, Feussner I. (2017). Heterologous co-expression of a yeast diacylglycerol acyltransferase (ScDGA1) and a plant oleosin (AtOLEO3) as an efficient tool for enhancing triacylglycerol accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnology for Biofuels* 10:187.

- (IF₂₀₁₇: 5.497; punktacja MNiSW: 45)
- Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji badań nad ekspresją drożdżowej acylotransferazy diacylglicerolu (ScDGA1) i roślinnej oleozyny (AtOLEO3) w komórkach modelowej okrzemki *Phaeodactylum tricornutum*, zbiorze i przygotowaniu materiału do mikroskopowej analizy ekspresji konstruktów fuzyjnych kodujących wymienione białka z GFP jako genem reporterowym, mikroskopowej i statystycznej analizie formowania kropeł tłuszczu w transgenicznym liniach *P. tricornutum* (wyniki moich badań umieszczono na rycinach 2, 4 oraz w danych dodatkowych S9), interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu i edycji manuskryptu oraz na pozyskaniu współfinansowania badań (Projekt AlgaeOilSynth Europejskiej Agencji Wykonawczej ds. Badań REA towarzyszący Stypendium Marie Skłodowskiej-Curie z 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej, grant nr. 627266). Mój udział procentowy szacuję na 20 %.

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdujących się w Załączniku 5 (Oświadczenia współautorów).

Sumaryczny Impact Factor* prac wchodzących w skład osiągnięcia	54,404
Suma punktów MNiSW prac wchodzących w skład osiągnięcia	395
Łączna liczba cytowań prac wchodzących w skład osiągnięcia	99** / 163***

*IF dla roku opublikowania

według Web of Science (bez autocytowań) / *według Google Scholar , (stan na dzień 01.03.2019)

c) Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Mechanizmy i biotechnologiczne strategie modyfikacji syntezy i akumulacji lipidów w komórkach mikroglonów.

Cytowania prac naukowych wchodzących w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego wyróżniono pogrubioną czcionką. Wszystkie pozostałe cytowania umieszczono w spisie literatury.

Motywacja do badań

Współczesny globalny trend ukierunkowany na pozyskiwanie i wykorzystywanie odnawialnych biopaliw jest efektem wielu różnorodnych czynników oddziałujących bezpośrednio na gospodarki krajów zarówno rozwijających się jak i rozwiniętych. Najważniejsze z nich to: 1) niestabilność cen ropy naftowej, 2) stopniowe wyczerpywanie globalnych zasobów paliw kopalnych, 3) chęć uniezależnienia się od często niestabilnych zewnętrznych źródeł ropy naftowej oraz 4) znaczny wzrost stężenia dwutlenku węgla w atmosferze i wynikające z tego niekorzystne zmiany klimatyczne (Radakovits i wsp. 2010). Biopaliwa mogą być zdefiniowane jako „paliwa płynne uzyskane z biomasy i wykorzystywane w transporcie lub do uzyskania energii cieplnej” (Dufey 2006). Do niedawna wyróżniano dwie kategorie biopaliw: 1) biopaliwa pierwszej generacji pochodzące bezpośrednio ze spalanej materii organicznej (drewno, węgiel, nawóz organiczny) oraz 2) biopaliwa drugiej generacji pochodzące z przetworzonej biomasy, głównie nasion oleistych. Do biopaliw drugiej generacji należą zarówno biodiesel jak i etanol, które wykorzystywane do napędzania pojazdów mechanicznych oraz w przemyśle. Jednakże produkcja pierwszej generacji biopaliw od dawna wzbudza wiele kontrowersji, głównie natury ekonomicznej i ekologicznej (np. konieczność dotowania przemysłu górniczego,

masowa wycinka drzew). Z kolei produkcja biopaliw drugiej generacji jest obecnie szeroko dyskutowana w kontekście konkurencji z globalną produkcją żywności oraz konieczności znacznych nakładów finansowych ograniczających jej opłacalność. Efektem powyższych kontrowersji był globalny trend poszukiwania alternatywnego źródła biopaliw. Owoce tych poszukiwań było powstanie trzeciej generacji biopaliw, otrzymywanych z mikroglonów (mikroalg, glonów jednokomórkowych¹) oraz cyjanobakterii (sinic). Główną zaletą tych organizmów jest naturalna zdolność do pobierania atmosferycznego dwutlenku węgla i przekształcania go w wysokoenergetyczne formy energii w postaci tłuszczu, głównie triacyloglicerolu (TAG²). Mikroglony, zdobyły znaczne zainteresowanie jako potencjalne źródło biopaliw, gdyż są w stanie dostarczyć taką samą ilość płynnych paliw jak rośliny lądowe, jednakże z wykorzystaniem nieporównywalnie mniejszego areálu uprawnego. Inne zalety wykorzystania mikroglonów do produkcji biopaliw to brak konieczności eksploatacji łąd oraz dobrych gatunkowo gleb oraz możliwość hodowli w wodach ściekowych i odpadowych. Cechy te są niezwykle istotne nie tylko w kontekście aktualnej polityki ekologicznej, ale także w kontekście zachodzących obecnie niekorzystnych zmian klimatycznych na Ziemi i związanej z nimi redukcją areálu uprawnego, ciągle rosnącą populacją człowieka i koniecznością wyboru pomiędzy produkcją energii i żywności na łądzie.

Wprowadzenie do tematu badawczego

Mikroglony są zróżnicowaną, polifiletyczną grupą taksonomiczną którą ogólnie opisuje się zazwyczaj jako jednokomórkowe fotoautotroficzne, wolnopływające organizmy o prostej morfologii (Archibald i wsp. 2002, Keeling i wsp. 2005). Wyróżnia się kilka głównych grup mikroglonów o różnym składzie biochemicznym, ultrastrukturze i cyklu życiowym. Reprodukacja tych organizmów zachodzi głównie poprzez wegetatywny podział komórki (cykl aseksualny), aczkolwiek cykl płciowy może występować u pewnych gatunków w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiskowe. Kluczową, z punktu widzenia produkcji biopaliw, cechą mikroglonów jest zdolność do syntezy i akumulacji znacznych ilości lipidów w odpowiedzi na stres abiotyczny. Najczęściej stosowany czynnik stresowy w warunkach laboratoryjnych to usunięcie azotu (N) lub fosforu (P) z medium hodowlanego. W takich warunkach najbardziej obiecujące gatunki mikroglonów oleistych są w stanie osiągnąć zawartość TAG na poziomie 20% - 60% suchej masy. Badania ostatniej dekady wykazały, iż mikroglony oleiste posiadają znacznie wyższą produktywność biomasy lipidowej aniżeli nasiona roślin oleistych (Rodolfi i wsp. 2009). Wśród innych aspektów biologii mikroglonów, cennych z punktu widzenia potencjalnego wykorzystania do produkcji biopaliw, należy wymienić: 1) ich wysoką produktywność w przeliczeniu na jednostkę powierzchni gruntów lub objętości hodowli płynnych, 2) możliwość hodowli na glebach nieurodzajnych, 3) możliwość hodowli w wodach różnego pochodzenia (słodkie, słone, odpadowe,

¹ Terminy te będą używane wymiennie w dalszej części niniejszego autoreferatu.

² Skrót ten będzie stale stosowany w dalszej części niniejszego autoreferatu dla określenia triacyloglicerolu.

ścieki), 4) potencjalne źródło zarówno biopaliw jak i innych cennych pół-produktów oraz 5) zdolność recyngingu CO₂ i innych gazów przemysłowych.

Pomimo niekwestionowanego postępu w biologii molekularnej mikroalg, obejmującego między innymi poznanie kompletnych sekwencji ich genomów oraz opracowanie technik rekombinacji genetycznej tych organizmów, nasza wiedza na temat tego jak syntetyzują one tłuszcze, jak regulują metabolizm lipidów i jakie mechanizmy rządzą akumulacją TAG na poziomie ich komórek jest nadal niewielka. Z uzyskanych dotychczas danych wynika, iż procesy te w większości przypadków kontrolowane są u mikroglonów inaczej aniżeli u roślin lądowych (Liu i Benning 2013). Co więcej, mikroglony to bardzo niejednorodna grupa organizmów o niezwykle zawiłej ewolucji, czego odzwierciedleniem jest bardzo często odmienna fizjologia, metabolizm oraz mechanizmy odpowiedzi na stres pomiędzy poszczególnymi gatunkami tej grupy. Tym bardziej niezbędne jest prowadzenie mechanistycznych badań nad syntezą i akumulacją lipidów u najbardziej obiecujących przedstawicieli mikroglonów oleistych o dużym potencjale do produkcji biopaliw. Zrozumienie mechanizmów tych procesów oraz możliwość ich kontroli dzięki metodom inżynierii genetycznej jest niezbędnym krokiem na drodze do rozwoju nowych strategii eksperymentalnych ukierunkowanych na zwiększenie globalnej produkcji biopaliw trzeciej generacji.

Cel badań

Cel i zagadnienia badawcze będące przedmiotem prezentowanego osiągnięcia naukowego mają charakter wielowątkowy. Z naukowego punktu widzenia moje badania zmierzały do poznania komórkowych i molekularnych mechanizmów syntezy, akumulacji i homeostazy lipidów w komórkach mikroglonów. Z kolei celem o znaczeniu aplikacyjnym było użycie tej wiedzy w mechanistycznych badaniach nakierowanych na rozwój nowych biotechnologicznych strategii zwiększenia produkcji lipidów zapasowych w komórkach mikroglonów oleistych używanych jako surowiec do produkcji biopaliw.

Omówienie uzyskanych wyników

1) Charakterystyka komórkowych mechanizmów syntezy i akumulacji TAG w komórkach mikroglonów

Zdecydowana większość naszej dotychczasowej wiedzy na temat genetycznych i molekularnych aspektów regulacji metabolizmu lipidów w komórkach mikroglonów opiera się na wynikach uzyskanych w badaniach roślin lądowych, a głównie ich nasion, które reprezentują organy najbardziej bogate w lipidy. Znacznie mniej badań prowadzono bezpośrednio na komórkach mikroglonów, a proponowane modele szlaków metabolizmu tłuszczu u tych organizmów opierały się w dużej mierze na podobieństwach pomiędzy sekwencjami genomowymi roślin lądowych i mikroglonów. Większość badań z wykorzystaniem glonów jednokomórkowych w kontekście metabolizmu lipidów koncentruje się na dwóch głównych grupach taksonomicznych –

zielenicach (mikroalgach zielonych, *Chlorophyta*) oraz okrzemkach. W tym pierwszym przypadku główne modelowe organizmy to *Chlamydomonas reinhardtii* oraz mikroglony oleiste takie jak gatunki z rodzaju *Nannochloropsis*, *Chlorella*, *Ostreococcus* czy słodkowodna *Lobosphaera incisa*. Z kolei główne modele badawcze reprezentujące okrzemki to bogate w cenne tłuszcze *Phaeodactylum tricornutum* oraz *Thalassiosira pseudonana*. W publikacjach **H-1** oraz **H-2** zawarłem kompleksową i zaktualizowaną kompilację dotychczasowych danych literaturowych na temat fizjologicznych i molekularnych aspektów syntezy i metabolizmu lipidów u, odpowiednio, mikroalg zielonych oraz okrzemek. Informacje zawarte w obu tych publikacjach posłużą jako tło do opisu prac eksperymentalnych wchodzących w skład niniejszego osiągnięcia w związku z czym będą cytowane wielokrotnie w dalszej części mojego autoreferatu.

Poprzez analogię do komórek roślinnych, zaproponowano, iż u fotosyntetyzujących mikroglonów synteza lipidów ma swój początek w chloroplastcie, gdzie powstają kwasy tłuszczowe. Związki te są następnie

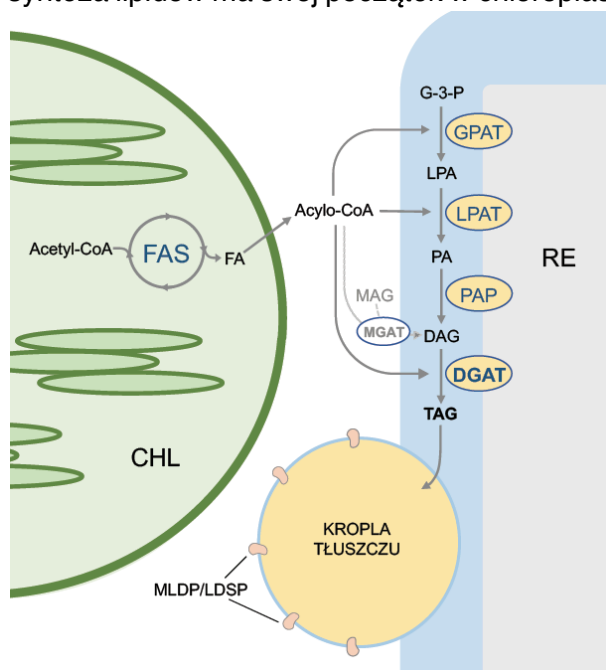


Figura 1. Uproszczony schemat syntezy TAG w komórkach mikroglonów. CHL; chloroplast, DAG; diacylglicerol, DGAT; acetylotransferaza diacylglicerolu, RE; retikulum endoplazmatyczne, FA; kwas tłuszczowy, FAS; syntaza kwasów tłuszczowych, GPAT; acetylotransferaza 3-fosfoglicerolowa, G-3-P; 3-fosfoglicerol, LPA; kwas lizofosfatydowy, LPAT; acetylotransferaza lizofosfatydowa, MAG; 2-monoacylglicerol, MGAT; acetylotransferaza monoacylglicerolu MLDP/LDSP; integralne białko kropli tłuszczu, PA; kwas fosfatydowy, PAP; fosfataza kwasu fosfatydowego, TAG; triacylglicerol.

wykorzystywane jako substraty w komórkowych szlakach syntezy fosfolipidów lub TAG, zależnie od aktualnego stanu metabolicznego komórki (**H-1**). Nierzadko kwasy tłuszczowe przed wejściem w kompleksowe szlaki metaboliczne podlegają modyfikacjom, takim jak desaturacja czy elongacja. W tym pierwszym przypadku, enzymy określane jako desaturazy katalizują powstawanie podwójnych wiązań w ściśle określonych miejscach długiego łańcucha węglowego kwasów tłuszczowych i generują tzw. nienasycone kwasy tłuszczowe. Z kolei elongazy, poprzez sukcesywne dodawanie atomów węgla do już istniejącego łańcucha kwasu tłuszczowego przyczyniają się do powstania bardzo długich wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (z *ang.* very long chain polyunsaturated fatty acids, VLC PUFAs). Aktualny model przedstawiony w publikacji **H-2** zakłada, iż w komórkach mikroglonów procesy desaturacji i elongacji kwasów tłuszczowych, podobnie jak w komórkach roślin lądowych, mają miejsce w zarówno w chloroplastcie jak i w retikulum endoplazmatycznym, gdzie potwierdzono obecność zarówno desaturaz jak i elongaz. Z punktu

widzenia biotechnologicznego enzymy te są szczególnie istotnym elementem maszynierii modyfikacji lipidów u okrzemek, gdyż w odróżnieniu od większości mikroalg zielonych, organizmy te charakteryzują się wyjątkowo wysoką zawartością dwóch cennych VLC PUFAs – kwasu arachidonowego (ARA) oraz kwasu

eikozapentaenowego (EPA). Kwasy te wykorzystywane są jako cenny składnik w przemyśle farmaceutycznym (**H-2**).

Niezależnie od stopnia modyfikacji, kwasy tłuszczowe mogą pozostać na terenie chloroplastu, gdzie stanowią substraty do syntezy fosfolipidów błon chloroplastowych, takich jak monogalaktozydylodicyloglicerol (MGDG) czy digalaktozydylodicyloglicerol (DGDG). Z kolei w przypadku eksportu do cytozolu, kwasy tłuszczowe, zwykle jako koniugaty z koenzymem A (acylo-CoA) używane są jako komórkowa forma magazynowania węgla i energii w formie TAG. Ponieważ to właśnie ten ostatni aspekt metabolizmu lipidów jest głównym obiektem prezentowanego osiągnięcia naukowego, w dalszej części niniejszej prezentacji przedstawiona będzie jego bardziej szczegółowa charakterystyka.

Jak opisano w publikacji **H-1**, synteza TAG w komórkach eukariotycznych, w tym także w komórkach glonów jednokomórkowych, zachodzi dzięki enzymom związanym z błoną retikulum endoplazmatycznego. Opierając się na ortologii genów zidentyfikowanych dotychczas w genomach jednokomórkowych glonów, wykazano, że podobnie jak u roślin lądowych, organizmy te syntetyzują TAG poprzez dwa główne szlaki: (1) 3-fosfoglicerolu, zwanego także szlakiem Kennedy'ego, oraz (2) monoacylglicerolu (Figura 1). W pierwszym przypadku 3-fosfoglicerol (G-3-P) podlega sukcesywnym estryfikacjom z łańcuchem acylowym kwasów tłuszczowych związanych z koenzymem A (acylo-CoA). Reakcje te zachodzą w ściśle określonej kolejności i katalizowane są przez specyficzne acyltransferazy związane z błoną retikulum endoplazmatycznego. W pierwszej reakcji, katalizowanej przez acetylotransferazę 3-fosfoglicerolową (GPAT), wyniku połączenia cząsteczek acylo-CoA z 3-fosfoglicerolem powstaje kwas lizofosfatydowy (LPA). Po reakcji z kolejną cząsteczką acylo-CoA kwas lizofosfatydowy przekształcany jest w kwas fosfatydowy (PA). Reakcja ta katalizowana jest przez acetylotransferazę lizofosfatydową (LPAT). Kwas fosfatydowy może służyć jako substrat do syntezy fosfolipidów lub TAG. W tym drugim przypadku usunięcie grupy fosforanowej z kwasu fosfatydowego przez fosfatazę kwasu fosfatydowego (PAP) prowadzi do powstania diacyloglicerolu (DAG). Związek ten może również powstać w wyniku aktywności drugiego z wyżej wymienionych szlaków, gdzie 2-monoacylglicerol (MAG) podlega estryfikacji z cząsteczką acylo-CoA do DAG, w wyniku aktywności acetylotransferazy monoacylglicerolu (MGAT). Niezależnie od drogi syntezy, DAG podlega następnie konwersji do TAG. Reakcja ta katalizowana jest przez acetylotransferazę diacylglicerolu (z *ang.* acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase, DGAT³) i stanowi decydujący etap syntezy TAG w komórkach eukariotycznych.

Cząsteczki TAG syntetyzowane w błonie retikulum endoplazmatycznego deponowane są następnie w sferycznych organellach komórkowych określanych w literaturze jako krople tłuszczu (z *ang.* lipid droplets, LDs), ciała tłuszczowe bądź olejowe (z *ang.* lipid bodies lub oil bodies), które po całkowitym uformowaniu przy błonie retikulum endoplazmatycznego odseparowują się i lokalizują w cytoplazmie (Hu i wsp. 2008). Według

³ Skrót ten będzie stale stosowany w dalszej części niniejszego autoreferatu dla określenia enzymów z aktywnością acetylotransferazy diacylglicerolu.

obecnego trendu w literaturze termin „krople tłuszczu” używany jest zazwyczaj w odniesieniu do mikroorganizmów (np. glonów jednokomórkowych), z kolei termin „ciała olejowe” jest częściej używany do opisu tych organelli w komórkach roślin wyższych i zwierząt. Bez względu jednak na terminologię, omawiane struktury zidentyfikowano w komórkach licznych organizmów, wliczając ssaki, nicienie, grzyby, glony, bakterie oraz rośliny niższe i wyższe, co wskazuje na ich niezwykle konserwowaną rolę w metabolizmie komórkowym. Do niedawna organellom tym przypisywano głównie rolę w magazynowaniu TAG, dopiero badania ostatnich dwóch dekad wykazały, iż są to wysoce dynamiczne struktury komórkowe, aktywnie zaangażowane w różnorodne procesy fizjologiczne, regulację homeostazy energetycznej komórki, remodelowanie błon komórkowych czy sygnałowanie komórkowe (Pyc i wsp. 2017). Ogólnie przyjęty model budowy kropli tłuszczu zakłada, iż 94-98% jej masy stanowi hydrofobowy rdzeń utworzony przez lipidy neutralne (głównie TAG), otoczony pojedynczą błoną złożoną z fosfolipidów, w której zakotwiczone są specyficzne białka. Te ostatnie molekuly uznaje się za kluczowe dla biogenezy, stabilizacji oraz mobilizacji tych organelli, w zależności od aktualnego stanu metabolicznego i fizjologicznego komórki (Huang 2018). U roślin lądowych zestaw białek strukturalnych kropli tłuszczu jest tkankowo specyficzny i na przykład w nasionach i ziarnach pyłkowych obejmuje zwykle stały zestaw złożony z oleozyny, kaleozyny oraz steroleozyny (Zienkiewicz i wsp. 2010, Huang 2018). Z kolei w komórkach liści wymienione białka są zazwyczaj nieobecne a ich rolę pełni białka LDAPs (z ang. Lipid Droplet-Associated Proteins) (Gidda i wsp. 2016). W komórkach glonów jednokomórkowych w błonie LD obecny jest zwykle jeden rodzaj białek, aczkolwiek często odmienny filogenetycznie i molekularnie u poszczególnych gatunków (**H-1**, **H-2**). U modelowej jednokomórkowej zielenicy *C. reinhardtii* główne białko strukturalne kropli tłuszczu to MLDP (z ang. Major Lipid Droplet Protein), którego ortologi obecne są także u innych gatunków zielonych mikroglonów, aczkolwiek nie u okrzemek (Goold i wsp. 2015). Celem badań opisanych w publikacji **H-3** było zbadanie jak MLDP rekrutowane jest na powierzchnię formujących się kropli tłuszczu oraz jaka jest rola tego białka w komórkowej organizacji tych organelli u *C. reinhardtii*. Procesy formowania i degradacji kropli tłuszczu w tych badaniach inicjowane były poprzez, odpowiednio, usunięcie i uzupełnienie hodowli azotem (w postaci KNO_3 lub NH_4Cl). Uzyskane wyniki wykazały, iż MLDP formuje proteinowy płaszcz na powierzchni kropli tłuszczu, a jego poziom pozytywnie koreluje z akumulacją TAG podczas deprywacji azotu w medium. Przez wyciszenie ekspresji genu kodującego MLDP metodą interferencyjnego RNA (iRNA) wykazano, iż obniżony poziom tego białka wpływa na rozmiar oraz liczbę formowanych kropli tłuszczu, w porównaniu do linii rodzicielskiej *C. reinhardtii*. W komórkach z niedoborem MLDP, krople tłuszczu powstające w odpowiedzi na deprywację azotu w medium były znacznie większe i mniej liczne, jednakże sama zawartość TAG nie uległa zmianie w porównaniu do komórek linii rodzicielskiej. Przeprowadzone przez mnie obserwacje mikroskopowe sugerują, że w komórkach z obniżonym poziomem MLDP powstające krople tłuszczu ulegają niekontrolowanej fuzji co wskazuje, że białko MLDP stabilizuje te organelle na poziomie strukturalnym. Poza rolą w fizycznej stabilizacji

kropel tłuszczu powstałych pod w odpowiedzi na deprivację azotu, w publikacji **H-3** wykazano również, że białko MLDP jest kluczowe dla mobilizacji tych organelli w odpowiedzi na przywrócenie optymalnych warunków hodowli poprzez uzupełnienie medium azotem. Linie *C. reinhardtii* z obniżonym poziomem białka MLDP wykazywały bowiem znaczne opóźnienie procesu degradacji kropel tłuszczu w porównaniu z linią rodzicielską. Podobne wyniki uzyskano także u mutantów *A. thaliana* z deficytem białek zasocjowanych z kroplami tłuszczu w nasionach (Huang 2018), co wskazuje na niezwykle uniwersalną funkcję tej rodziny białek w komórkach eukariotycznych. Aby wyjaśnić molekularne mechanizmy funkcjonowania MLDP w komórkach *C. reinhardtii*, w badaniach opisanych w publikacji **H-3** wykorzystano metody z zakresu proteomiki i wykazano, że zależnie od warunków hodowli (stresowe lub optymalne) MLDP formuje kompleksy z innymi białkami, w tym szczególnie z α -tubuliną. Co interesujące, depolimeryzacja mikrotubul poprzez traktowanie komórek *C. reinhardtii* kolchicyną powodowała zniesienie asocjacji MLDP z kroplami tłuszczu, co wskazuje, iż interakcja pomiędzy MLDP i tubuliną ma istotne znaczenie dla funkcjonowania tego cytoskieletowego białka w metabolizmie kropli tłuszczu u *C. reinhardtii*.

Jak wspomniano powyżej, inicjacja syntezy i akumulacji TAG w komórkach mikroglonów następuje przede wszystkim w warunkach stresowych, przy czym deprivacja azotu lub fosforu to najczęściej stosowane strategie stresowe w warunkach laboratoryjnych. Oprócz formowania licznych kropel tłuszczu, odpowiedź jednokomórkowych glonów na ten czynnik stresowy obejmuje także stopniową degradację chloroplastu a w konsekwencji także zahamowanie aktywności fotosyntetycznej (**H-1**). Aby pogłębić dotychczasową wiedzę na temat związku pomiędzy tymi dwoma zjawiskami brałem udział w badaniach nakierowanych na wyjaśnienie roli błon chloroplastowych w procesie syntezy i akumulacji TAG w komórkach *C. reinhardtii*, które opisano w publikacji **H-4**. Praca ta stanowi kontynuację badań nad poprzednio zidentyfikowanym mutantem *C. reinhardtii* *pgd1* z defektem genu kodującego lipazę PGD1 (z *ang.* Plastid Galactoglycerolipid Degradation 1), specyficzną względem jednego z fosfolipidów błon chloroplastowych - monogalaktozydylacylglycerolu (MGDG). Co interesujące, mutant ten wykazuje o około 40% mniejszą produkcję TAG w odpowiedzi na deprivację azotu w porównaniu do linii rodzicielskiej *C. reinhardtii* (Li i wsp. 2012). W pracy **H-4** wykazano, że mutacja *pgd1* objawiająca się wzrostem zawartości MGDG w błonach chloroplastowych prowadzi do zniesienia optymalnej proporcji pomiędzy poszczególnymi fosfolipidami błonowymi, tj. digalaktozydylacylglycerolem (DGDG), diacylgliceryltrimetylhomoseryną (DGTS), fosfatydyloetanolaminą (PE), fosfatydyloglicerolem (PG) oraz fosfatydyloinozytolem (PI). Na poziomie komórkowym wykazałem ponadto, że zaburzeniom tej homeostazy towarzyszą z kolei zmiany w ultrastrukturze chloroplastów, a dokładniej obecność gran o znacznie zwiększonej liczbie i znacznie grubszych tylakoidów. Na poziomie biochemicznym zmiany te objawiały się także zaburzoną aktywnością fotosyntetyczną, najprawdopodobniej w skutek dysproporcji ilościowej pomiędzy fotosystemem I (PSI) oraz fotosystemem II (PSII). Dodatkowo, oprócz zmniejszonej akumulacji TAG w komórkach mutantu *pgd1* wykazano zwiększone nagromadzenie

skrobi, która obok TAG stanowi drugą podstawową formę magazynowania węgla w komórkach *C. reinhardtii*. Obserwacja ta sugeruje, iż nawet w przypadku zaburzonego krążenia komórkowej puli węgla pomiędzy lipidami błonowymi i TAG, jak ma to miejsce u badanego mutantu, komórki *C. reinhardtii* intensyfikują inne szlaki obiegu tego pierwiastka, aby zminimalizować ewentualne zaburzenia jego homeostazy, które mogłyby z kolei negatywnie wpłynąć na gospodarkę energetyczną komórki. Podsumowując, w publikacji **H-4** przedstawiono kolejne dowody na istotną rolę lipazy PGD1 w komórkowym obrocie resztami acylowymi pomiędzy błonami tylakoidów i TAG w odpowiedzi na deprywację azotu. Dodatkowo wykazano, iż badana lipaza kontroluje homeostazę lipidową komórek *C. reinhardtii* poprzez regulację kompozycji i struktury błon chloroplastowych w warunkach stresu.

Jak opisano powyżej, ostatni etap syntezy TAG w komórkach eukariotycznych katalizowany jest przez enzymy z klasy DGAT. W genomach większości roślin oraz zwierząt zidentyfikowano dwa główne typów tych enzymów, określane jako DGAT typu 1 (DGAT1) oraz DGAT typu 2 (określany w literaturze także jako DGAT2 lub DGTT). Opisywane typy wyróżniono z uwagi na fakt, iż białka DGAT typu 1 oraz typu 2 wyewoluowały niezależnie i nie wykazują podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasowej, jednakże pełnią podobne funkcje w komórce, co jest najprawdopodobniej efekt tzw. ewolucji konwergencyjnej (Turchetto-Zolet i wsp. 2011). Stosunkowo niedawno w komórkach nasion oleistych zidentyfikowano także trzeci typ w obrębie rodziny enzymów DGAT, określane jako DGAT3. Z dotychczasowych badań wynika, iż białka DGAT3, w odróżnieniu do DGAT1 oraz DGAT2 nie są związane z błoną RE (brak transmembranowej domeny MBOAT), lokalizują się w głównie cytozolu, a ich udział w całościowej syntezie TAG jest stosunkowo niewielki i indukowany w odpowiedzi na specyficzne warunki metaboliczne komórki (Saha i wsp. 2006, Hernandez i wsp. 2012). Jak dotąd wiedza na temat enzymów DGAT typu 3, w porównaniu do DGAT1 oraz DGAT2, jest bardzo niewielka i ograniczona jedynie do komórek nasion oleistych.

Główną cechą odróżniającą glony jednokomórkowe od roślin lądowych oraz zwierząt jest obecność wielokrotnych kopii genów kodujących enzymy DGAT. O ile u większości z nich zidentyfikowano jedną kopię DGAT1 o tyle geny kodujące DGAT2 (DGTT) występują u tych organizmów w licznych kopiach, których liczba waha się od 2 do nawet 12, jak ma to miejsce u gatunku *Nannochloropsis*. Przypuszcza się, iż ta niezwykle wysoka liczba kopii genów kodujących DGAT2 może być wynikiem zawitej ewolucji jednokomórkowych, a zwłaszcza gatunków należących do infrakrólestwa *Heterokonta* (**H-1**). Analiza filogenetyczna przedstawiona w publikacji **H-1** wykazała, iż na poziomie sekwencji aminokwasowej białka DGAT1 mikroalg są spokrewnione w niewielkim stopniu z ich zwierzęcymi i roślinnymi odpowiednikami i formują odrębne grupy w obrębie drzewa filogenetycznego. Podobnie, w przypadku białek DGAT2 (DGTT) u glonów jednokomórkowych wykazano, iż nie grupują one pod względem filogenetycznym ze swoimi roślinnymi, zwierzęcymi czy grzybowymi odpowiednikami. Co interesujące, w tej samej pracy wykazano, iż 12 białek DGAT2 (DGTT) kodowanych przez genom zielonej mikroalgi *Nannochloropsis oceanica*, okazało się różnić także względem siebie na

poziomie sekwencji aminokwasowej, na co wskazuje ich dystrybucja na obszarze całego drzewa filogenetycznego, bez grupowania w konkretnych jego obszarach. Jednocześnie wiele białek DGAT2 z *N. oceanica* wykazuje podobieństwo do enzymów DGAT2 (DGTT) kodowanych przez genomy innych mikroglonów. Przetawione związki filogenetyczne pomiędzy białkami DGAT są niewątpliwie odzwierciedleniem skomplikowanej i wielokierunkowej ewolucji mikroglonów. Bez względu jednak na ich pochodzenie to właśnie obecność tak licznych genów z rodziny DGAT stoi za wyjątkowym potencjałem glonów jednokomórkowych dla syntezy TAG. oraz najprawdopodobniej za bardziej zaawansowanymi mechanizmami regulacji tego procesu u tych organizmów, w porównaniu z roślinami lądowymi czy zwierzętami.

W związku z powyższym moje dalsze badania koncentrowały się na komórkowej, molekularnej i funkcjonalnej charakterystyce enzymów z rodziny DGAT u modelowych mikroglonów oleistych. W publikacji **H-5** scharakteryzowałem cztery enzymy z klasy DGAT kodowane przez genom *Lobosphaera incisa* (dawniej *Myrmecia incisa* lub *Parietochloris incisa*). Ta słodkowodna mikroalga w odpowiedzi na stres (deprywacja azotu) produkuje znaczne ilości TAG bogatego w cenny kwas arachidonowy (ARA). W związku z tym wiedza na temat enzymów DGAT u tego gatunku jest kluczowa dla rozwoju efektywnych strategii produkcji wspomnianych lipidów w celach przemysłowych. W genomie *L. incisa* zidentyfikowano poprzednio trzy geny kodujące domniemane białka z aktywnością DGAT, w tym jeden kodujący białko DGAT typu 1 (*LiDGAT1*) oraz dwa kodujące białka DGAT typu 2 (*LiDGAT2.1* oraz *LiDGAT2.2*) (Chen i wsp. 2015). Przeprowadzona przeze mnie analiza *in silico* wykazała, iż w genomie *L. incisa* koduje także trzecią, do tej pory nieznaną, izoformę DGAT2, określoną jako *LiDGAT2.3* a także domniemane białko DGAT3. Analiza filogenetyczna wszystkich zidentyfikowanych białek *LiDGAT* opisana w publikacji **H-5** sugeruje ich odmienne pochodzenie ewolucyjne, za wyjątkiem *LiDGAT2.1* oraz *LiDGAT2.2*, które wydają się być najbardziej spokrewnione ze sobą filogenetycznie. Wyniki te po raz kolejny potwierdzają zawiłą i wielokierunkową ewolucję genów kodujących enzymy DGAT u mikroglonów oleistych. Analiza ekspresji pięciu genów DGAT kodowanych przez genom *L. incisa* wykazała, iż za wyjątkiem *LiDGAT3*, wszystkie ulegają zwiększonej ekspresji w odpowiedzi na deprywację azotu w medium hodowlanym. Pozytywna korelacja pomiędzy opisanym wzorcem ekspresji i rosnącą liczbą kropeł tłuszczu w komórkach *L. incisa* hodowanych w warunkach stresowych sugeruje także ich bezpośredni udział w syntezie TAG u tej mikroalgi. Celem funkcjonalnej charakterystyki, wszystkie opisane geny kodujące DGAT1 oraz DGAT2 u badanego glonu sklonowano i poddano ekspresji jako pojedyncze lub w tandemach w komórkach drożdżowego mutantu H1246. Szczep ten jest niezdolny do syntezy TAG na skutek mutacji wszystkich genów DGAT (Sandager i wsp. 2002). Uzyskane wyniki wykazały, iż wszystkie białka *LiDGAT* są zdolne do przywrócenia syntezy TAG u mutantu H1246, jednakże z bardzo różną wydajnością. O ile ekspresji wszystkich konstruków kodujących białko *LiDGAT1* towarzyszył najwyższy wzrost syntezy TAG (do około 30 µg/mg suchej masy), o tyle w przypadku ekspresji wyłącznie genów DGAT

typu 2 zawartość TAG nigdy nie przekraczała 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ suchej masy. Opisane różnice w syntezie TAG widoczne były również *in situ* na poziomie komórkowym w postaci zróżnicowanej liczby kropli tłuszczu. W komórkach drożdżowych z ekspresją białka LiDGAT1 były one większe i bardziej liczne aniżeli w komórkach syntetyzujących białka z rodziny LiDGAT2. W kolejnym etapie badań analizowano preferencje substratowe wszystkich badanych enzymów DGAT, ponownie wykorzystując wyżej opisany system ekspresji w komórkach mutanta drożdżowego H1246. W tym celu do medium hodowlanego dodawano wyselekcjonowane substraty enzymów DGAT w postaci kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha węglowego i liczbie wiązań podwójnych, a następnie analizowano kompozycję nowo syntetyzowanego TAG w celu zidentyfikowania najbardziej preferencyjnie inkorporowanych kwasów tłuszczowych przez poszczególne białka LiDGAT. Wykazano, że LiDGAT1 nie wykazuje szczególnej preferencji względem analizowanych kwasów tłuszczowych, podczas gdy enzymy LiDGAT typu 2 cechują się pewnym stopniem preferencji. Pośród nich, najbardziej interesujący z przemysłowego punktu widzenia okazał się enzym LiDGAT2.2, o najwyższej ze wszystkich badanych białek preferencji względem kwasu arachidonowego (ARA). Publikacja **H-5** jako pierwsza dostarczyła także informacji na temat subkomórkowej lokalizacji enzymów LiDGAT typu 1 oraz 2. Wykorzystując komórki drożdży H1246 z ko-ekspresją konstruktów fuzyjnych kodujących enzymy LiDGAT1 oraz LiDGAT2.2 z peptydami markerowymi, odpowiednio FLAG i Myc, analizowałem ich lokalizację przy użyciu technik immunofluorescencyjnych. Szczegółowa analiza z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego wykazała preferencyjną oraz intensywną asocjację LiDGAT1 z obszarami retikulum endoplazmatycznego w bezpośrednim sąsiedztwie formujących się kropli tłuszczu. Z kolei sygnał korespondujący do LiDGAT2.2 obserwowany był na znacznie mniejszym obszarze retikulum endoplazmatycznego, głównie w postaci punktowej i bez wyraźnej preferencji względem formujących się kropli tłuszczu. Wyniki opisane w publikacji **H-5** wskazują na odmienną naturę molekularną, funkcjonalną i komórkową enzymów DGAT typu 1 i 2 kodowanych przez genom *L. incisa*. Zaproponowany przeze mnie model zakłada, że LiDGAT1 jest głównym enzymem syntetyzującym TAG, podczas gdy białka DGAT typu 2 są najprawdopodobniej odpowiedzialne za inkorporowanie specyficznych kwasów tłuszczowych do jego cząsteczek, przez co regulują skład komórkowej puli tej klasy lipidów. Opisane enzymy te stanowią zatem obiecujący przedmiot dalszych badań nakierowanych na rozwój biotechnologicznych strategii zwiększenia produkcji TAG bogatego w VLC-PUFAs (np. ARA) w mikroalgach słodkowodnych o istotnym znaczeniu nie tylko dla przemysłu biopaliw, ale także spożywczego i farmaceutycznego.

W przeciwieństwie do jednokomórkowych glonów słodkowodnych, zdecydowana większość potencjalnych producentów TAG celem wykorzystania do produkcji biopaliw reprezentowana jest przez mikroglony morskie. Wśród nich szczególne miejsce zajmują gatunki z rodzaju *Nannochloropsis*, a zwłaszcza *Nannochloropsis oceanica*, który w odpowiedzi na niedobór azotu produkuje bardzo duże ilości TAG, sięgające nawet 60% suchej masy komórki (**H-1**). Niewykluczone, iż jest to konsekwencja obecności wspomnianych już 13 genów

kodujących domniemane enzymy z klasy DGAT, co jest ewenementem w świecie żywym (Vieler i wsp. 2012a). Co interesujące, tylko 1 gen w tym zestawie reprezentowany jest przez DGAT typu 1, podczas gdy cała reszta należy do domniemanych enzymów DGAT typu 2 (DGTT). Moje badania na tym gatunku miały na celu wyjaśnienie biologicznego sensu obecności tak licznych genów kodujących enzymy DGAT u *N. oceanica*. Realizacja tego celu zawarta jest w publikacji **H-6** i objęła selekcję oraz funkcjonalną charakterystykę najbardziej obiecujących genów DGAT zaangażowanych w syntezę TAG. Aby wyselekcjonować geny DGAT bezpośrednio zaangażowane w syntezę TAG u *N. oceanica* przeanalizowałem i porównałem profile ekspresji wszystkich 13 genów kodujących domniemane enzymy z rodziny DGAT w optymalnych i stresowych warunkach hodowli. Na podstawie uzyskanych wyników spośród 13 analizowanych genów wyodrębniłem ich dwie główne grupy. Pierwsza z nich zawierała siedem genów DGAT, których profile ekspresji nie ulegały zmianie pod wpływem usunięcia azotu z medium hodowlanego i najprawdopodobniej nie są zaangażowane w syntezę TAG w warunkach stresu. Grupa druga obejmowała z kolei pozostałe 6 genów, określonych jako NoDGTT1-NoDGTT6, których transkrypty pojawiały się licznie w odpowiedzi na deprivację azotu w medium. Pozytywna korelacja pomiędzy opisanym wzorcem ekspresji oraz intensywną akumulacją kropeł tłuszczu w komórkach *N. oceanica* wystawionych na stres przemawia za bezpośrednim udziałem enzymów DGAT z tej grupy w syntezę TAG. Z pośród genów *NoDGAT* tej grupy najszybsza i najbardziej znacząca zmiana w poziomie ekspresji pomiędzy warunkami optymalnymi (czas 0 h) i stresowymi (12 godzin deprivacji azotu) obserwowana była dla genu *NoDGTT5*. Celem funkcjonalnej analizy, wszystkie sześć genów grupy drugiej sklonowano i poddano ekspresji w komórkach drożdżowego mutantu H1266, niezdolnego do syntezy TAG na skutek mutacji trzech z czterech genów kodujących enzymy DGAT (Sandager i wsp. 2002). Jak wykazały badania biochemiczne oraz *in situ*, spośród wszystkich przeanalizowanych genów *NoDGTT*, mutant z ekspresją *NoDGTT5* akumulował najwięcej TAG i charakteryzował się obecnością największych kropeł tłuszczu (**H-6**). Opierając się na tych obserwacjach, to właśnie *NoDGTT5* został wyselekcjonowany jako główne narzędzie molekularne do zwiększenia produkcji TAG zarówno u *N. oceanica* jak i w innych typach komórek metodami biotechnologicznymi, przedstawione w dalszej części niniejszego autoreferatu.

2) Biotechnologiczne strategie zwiększania zawartości TAG i modyfikacji metabolizmu lipidów w komórkach mikroglonów oleistych

Znaczący postęp metod biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej w ciągu ostatnich dwóch dekad pozwolił nie tylko na efektywną modyfikację ekspresji specyficznych genów w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych, ale także na transfer genów pomiędzy różnymi typami komórek celem manipulacji określonych szlaków metabolicznych. W przypadku glonów jednokomórkowych zoptymalizowane metody transformacji genetycznej celem nadekspresji wybranych genów czy też wprowadzania genów z innych typów komórek otworzyły nowy rozdział w biotechnologii tych organizmów i zaowocowały otrzymaniem nowych linii

transgenicznych o pożądanym cechach fenotypowych (**H-1**, **H-2**). Co więcej, dzięki tym metodom możliwe jest także wykorzystanie genów mikroalg do genetycznej modyfikacji metabolizmu lipidów w komórkach roślin lądowych (Vieler i wsp. 2012b, Sanjaya i wsp. 2013). Postęp ten jest szczególnie istotny z przemysłowego punktu widzenia, a zwłaszcza w kontekście produkcji biomasy lipidowej, gdyż zarówno mikroglony jak i rośliny oleiste to główni producenci tego surowca.

Jak opisano w publikacji **H-6**, zaprojektowałem i stworzyłem efektywne strategie modyfikacji zawartości TAG w komórkach *N. oceanica* jak również w tkankach wegetatywnych dwóch modelowych roślin lądowych – tytoniu (*Nicotiana benthamiana*) oraz rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) z wykorzystaniem metod modyfikacji genetycznej. Zoptymalizowany system transformacji oraz ekspresji konstruktów pod konstytutywnym promotorem endogennego czynnika elongacyjnego (EF) w wektorze pNOC-OX pozwolił na uzyskanie linii *N. oceanica* z nadekspresją wspomnianego powyżej genu kodującego NoDGTT5. Linie te, podczas hodowli w optymalnych warunkach, charakteryzowały się syntezą i akumulacją TAG na poziomie normalnie obserwowanym podczas hodowli w warunkach stresowych. Opisany fenotyp *N. oceanica* potwierdzono zarówno metodami biochemicznymi (analiza ilościowa i jakościowa TAG metodami spektrometrii masowej w połączeniu z chromatografią gazową), jak i cytologicznymi, które wykazały obecność wydających cytoplazmatycznych kropli tłuszczu, w odróżnieniu od komórek transformowanych wektorem kontrolnym. Jednakże, wszystkie analizowane linie transgeniczne z nadekspresją NoDGTT5 charakteryzowały się obniżoną o blisko połowę produkcją biomasy w warunkach optymalnych, w porównaniu do linii kontrolnych *N. oceanica*.

Funkcjonalna charakterystyka genu *NoDGTT5* z *N. oceanica* opisana w publikacji **H-6** obejmowała także jego ekspresję w komórkach modelowych roślin lądowych – *Arabidopsis thaliana* oraz *Nicotiana benthamiana* pod promotorem 35S wirusa mozaiki kalafiora. Konstytutywnej ekspresji *NoDGTT5* w liściach tytoniu i rzodkiewnika pospolitego towarzyszyło, odpowiednio, blisko dwu- i trzykrotne zwiększenie zawartości TAG w tych organach w porównaniu do roślin transformowanych wektorem kontrolnym oraz do roślin typu dzikiego. Co więcej, podobny efekt obserwowano w także nasionach *A. thaliana*, gdzie ekspresji genu *NoDGTT5* towarzyszył wzrost zawartości TAG do ponad 6 µg w przeliczeniu na nasiono, w porównaniu do nasion roślin kontrolnych, gdzie zawartość TAG oscylowała w granicach 4 µg w przeliczeniu na nasiono. Obiecującym wynikiem moich badań było także przywrócenie dzikiego fenotypu zawartości TAG w nasionach mutantu *A. thaliana tag1-1* dzięki ekspresji genu *NoDGTT5* pochodzącego z *N. oceanica*. Mutant ten, na skutek silnie zredukowanego poziomu białka DGAT typu 1 (*AtDGAT1*), charakteryzuje się obniżoną o blisko połowę zawartością TAG w nasionach, w porównaniu do roślin typu dzikiego (Zou i wsp. 1999). Ekspresji genu *NoDGTT5* u tych roślin towarzyszył wzrost zawartości TAG w nasionach z około 2 µg do około 4 µg w przeliczeniu na nasienie, co stanowi wartości normalnie obserwowane u roślin *A. thaliana* typu dzikiego.

Stworzone przeze mnie transgeniczne linie *N. oceanica* z nadekspresją genu NoDGTT5 zostały wykorzystane także w kolejnych badaniach nakierowanych na zwiększenie produkcji TAG u tej jednokomórkowej algi. Wyniki przedstawione w publikacji **H-7** wykazały, iż współhodowla *N. oceanica* z grzybnią oleistego grzyba *Mortierella elongata* w płynnym medium o optymalnym składzie prowadzi do bio-flokulacji obu gatunków i zwiększenia produkcji TAG zarówno u *N. oceanica* jak i *M. elongata* o, odpowiednio, około 15 % i 22 % suchej masy w porównaniu z zawartością TAG u tych organizmów rosnących oddzielnie. Co więcej, w odpowiedzi na współhodowlę z *N. oceanica*, grzybnia *M. elongata* wykazuje zwiększoną zawartość cennych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych PUFA, takich jak kwas arachidonowy (ARA) czy dokozaheksaenowy (DHA) w całościowej puli TAG. Modyfikacja opisywanej współhodowli poprzez wymianę dzikiego typu *N. oceanica* na transgeniczne linie tej mikroalgi z nadekspresją genu NoDGTT5 skutkowało dalszym zwiększeniem zawartości TAG w opisywanych agregatach grzybowo-glonowych o dodatkowe ~ 4 % suchej masy, bez konieczności stosowania deprivacji azotu. Publikacja **H-7** jest pierwszą, która opisuje efektywną strategię współhodowli oleistego grzyba i oleistego mikroglonu celem zwiększania zawartości TAG u obu tych organizmów. Z uwagi na fakt, iż zarówno genom *N. oceanica* jak i *M. elongata* zostały zsekwencjonowane i dla obu gatunków dostępne są efektywne narzędzia inżynierii genetycznej wyniki te otwierają nowe możliwości wykorzystania ich współhodowli do przemysłowej produkcji TAG o wysokiej zawartości cennych kwasów tłuszczowych, takich jak ARA czy DHA.

W związku z tym, iż opisany powyżej system nadekspresji genu NoDGTT5 pod kontrolą promotora czynnika elongacyjnego w wektorze pNOC-OX (**H-6**) okazał się bardzo skutecznym narzędziem zwiększania zawartości TAG u *N. oceanica*, moje kolejne badania koncentrowały się na rozwoju nowych, bardziej wydajnych systemów nadekspresji genów u tej mikroalgi. W publikacji **H-8** zawarto wyniki badań nad nową strategią wprowadzania i jednoczesnej nadekspresji kilku genów kodujących enzymy desaturazy do komórek *N. oceanica* przy użyciu pojedynczego wektora. O wyborze genów kodujących desaturazy jako kandydatów do nadekspresji zdecydował fakt, iż poza intensywną akumulacją TAG, mikroglony z rodzaju *Nannochloropsis* charakteryzują się także wysoką zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3, a zwłaszcza kwasu eikozapentaenowego (EPA) (Krienitz i Wirth, 2006; Spolaore i wsp. 2006). Genom *N. oceanica* koduje cztery desaturazy kwasów tłuszczowych (z *ang.* fatty acid desaturase, FAD), określanymi symbolami $\Delta 12$, $\Delta 6$, $\Delta 5$ oraz $\omega 3$. Na drodze ekspresji w komórkach drożdżowych (*Saccharomyces cerevisiae*), dla produktów białkowych wszystkich wymienionych genów potwierdzono aktywność desaturazową. W celu jednoczesnej nadekspresji kilku genów kodujących FAD w komórkach *N. oceanica* zastosowano nowatorską dla tego gatunku strategię tzw. upakowywania genów (z *ang.* gene stacking). Do tego celu wykorzystano zoptymalizowany wektor *pNOC-stacked*, zawierający promotor dwukierunkowy (*Ribi*), który endogennie kontroluje syntezę białkowych komponentów rybosomalnych S12 oraz S15. Ponadto, wektor ten zawierał sekwencję peptydową 2A umożliwiającą ekspresję kilku różnych

produktów białkowych przez pojedynczy transkrypt oraz gen odporności na hygromycynę, zastosowany w poprzednio omówionych badaniach jako marker selekcji (**H-6**). Badania opisane w publikacji **H-8** obejmowały analizę ilościową i jakościową PUFA syntetyzowanych w wyniku nadekspresji desaturaz $\Delta 12$, $\Delta 6$, $\Delta 5$ w wariantach pojedynczym (1 gen), podwójnym (jednoczesna ekspresja 2 genów) oraz potrójnym (jednoczesna ekspresja 3 genów). W przypadku ekspresji pojedynczych genów obserwowano 25 % wzrost zawartości EPA w komórkach *N. oceanica*, natomiast jednoczesna ekspresja dwóch lub trzech analizowanych białek FAD nie wpływała znacząco na zwiększenie poziomu tego kwasu tłuszczowego. Ponieważ nadekspresji desaturaz $\Delta 12$, $\Delta 6$ oraz $\Delta 5$ w komórkach *N. oceanica* towarzyszyło uszczuplenie całościowej puli kwasów tłuszczowych nie jest wykluczone, iż istnieje pewien limit zawartości PUFA u tych organizmów, powyżej którego dochodzi do zmian fizjologicznych błon komórkowych mogących stanowić czynnik stresowy na poziomie komórki. Brak efektu zwielokrotnienia zawartości PUFA w transgenicznym liniach *N. oceanica* może być zatem konsekwencją aktywacji mechanizmów antystresowych w celu utrzymania homeostazy lipidowej. Pomijając aspekt fenotypu transgenicznych linii *N. oceanica*, opisana strategia nadekspresji kilku genów jednocześnie przy użyciu pojedynczego wektora okazała się u tych organizmów skuteczna pod względem biotechnologicznym. W analizowanych komórkach wykazałem bowiem obecność produktów białkowych wszystkich docelowych genów desaturaz, wraz z peptydami markerowymi kodowanymi przez wektor *pNOC-stacked*, co wskazuje, że może on służyć jako bardzo efektywne narzędzie molekularne do biotechnologicznych modyfikacji *N. oceanica*.

Poza omawianą do tej pory transformacją mikroglonów dodatkową kopią „własnych” genów, inną ze strategii modyfikacji metabolizmu lipidów w ich komórkach jest transformacja genami pochodzącymi z innych organizmów. W publikacji **H-9** przedstawiono wyniki badań na modelowej okrzemce *Phaeodactylum tricornutum*, nakierowanych na zwiększenie akumulacji TAG poprzez transformację genami pochodzącymi z drożdży *S. cerevisiae* oraz rzodkiewnika pospolitego (*A. thaliana*). Wykorzystane geny to drożdżowy enzym DGAT (ScDGA1), katalizujący ostatni etap syntezy TAG oraz gen kodujący białko oleozynę u *A. thaliana* (AtOLEO3). Oleozyna, wraz z kaleozyną i steroleozyną, stanowią główne białka zasocjowane z kroplami tłuszczu w komórkach nasion roślin lądowych i odgrywają fundamentalną rolę w stabilizacji oraz fizjologii tych organelli (Zienkiewicz i wsp. 2010, Chapman i wsp. 2012). Wymienione geny wprowadzono do komórek *P. tricornutum* zarówno osobno jak i w tandemie za pomocą strzelby genowej a następnie przeprowadzono ilościową i jakościową analizę TAG w liniach transgenicznych, w odniesieniu do komórek typu dzikiego. Uzyskane wyniki wykazały, że indywidualna ekspresja ScDGA1 i AtOLEO3 w komórkach *P. tricornutum* prowadzi do wzrostu zawartości TAG o, odpowiednio, 2.3 oraz 1.4 raza w porównaniu do typu dzikiego. Z kolei ko-ekspresji obu tych genów towarzyszył wzrost zawartości TAG o 3.6 raza oraz obecność bardziej licznych i większych kropeł tłuszczu niżeli w komórkach kontrolnych lub transformowanych pojedynczymi genami ScDGA1 i AtOLEO3. Przyniesione wyniki dotyczą hodowli *P. tricornutum* w optymalnych warunkach

podczas gdy usunięcie azotu z medium hodowlanego powodowało dodatkowo dwukrotny wzrost zawartości TAG w liniach transgenicznym z ekspresją obu opisywanych genów. Co interesujące, wzrost akumulacji TAG w wyniku opisanej strategii nie objawiał się zmianami jego kompozycji, zwłaszcza w kontekście cennych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych o długości łańcucha węglowego dłuższej niż 16 atomów. Relatywnie niski poziom tych molekuł w puli TAG po transformacji sugeruje, że są one preferencyjnie kierowane do lipidów błonowych aniżeli do nowo syntetyzowanego TAG. Podobnie jak w przypadku *N. oceanica*, także u *P. tricornutum* zwiększonej akumulacji TAG na skutek deprywacji azotu bądź manipulacji genetycznych towarzyszyło obniżenie tempa wzrostu hodowli w porównaniu do komórek typu dzikiego hodowanych w warunkach optymalnych.

Najważniejsze osiągnięcia prezentowanych badań

Przeprowadzone przeze mnie badania na modelowych mikroalgach o różnym pochodzeniu ewolucyjnym i biologii, przyczyniły się do nie tylko do wyjaśnienia kilku kluczowych aspektów metabolizmu lipidów u tych organizmów, ale również zaowocowały stworzeniem wydajnych strategii biotechnologicznych nakierowanych na zwiększenie biomasy lipidowej produkowanej przez glony jednokomórkowe o wysokim potencjale do produkcji biopaliw.

W szczególności wykazano, że:

- 1) Mikroglony różnią się od komórek roślin wyższych i zwierząt wyjątkową plastycznością metabolizmu lipidów w odpowiedzi na czynniki środowiskowe. O ile w optymalnych warunkach hodowli produkują one relatywnie małe ilości TAG, aktywnie fotosyntetyzują i dzielą się, o tyle zmiana warunków środowiskowych na stresowe, objawia się bardzo szybką (liczoną w godzinach) inicjacją syntezy i akumulacji TAG, degradacją chloroplastu, zahamowaniem aktywności fotosyntetycznej oraz prawie kompletnym zatrzymaniem podziałów komórkowych. Co interesujące, przywrócenie optymalnych warunków środowiskowych inicjuje dokładnie odwrotne procesy, tj. bardzo szybką mobilizację TAG zmagazynowanych w kroplach tłuszczu, odtworzenie chloroplastu oraz przywrócenie regularnych podziałów komórkowych. Opisana plastyczność metaboliczna mikrogolonów nie występuje u roślin naczyniowych i zwierząt i stanowi zapewne część strategii pozwalającej glonom jednokomórkowym przetrwanie niekorzystnych warunków środowiskowych. Jednocześnie właściwość ta jest podstawą wykorzystania mikroalg jako surowca do produkcji biomasy lipidowej.
- 2) Podobnie jak w innych typach komórek eukariotycznych, także w komórkach mikroglonów nowo zsyntetyzowany TAG deponowany jest w cytoplazmatycznych kroplach tłuszczu. Pomimo faktu, iż białka zasocjowane z tymi organellami u mikroglonów są ewolucyjnie i molekularnie odmienne od swoich odpowiedników w komórkach roślin naczyniowych czy zwierząt, funkcja tych molekuł wydaje się

być silnie konserwowana w całym świecie żywym i polega zarówno na stabilizowaniu kropeł tłuszczu jak i na molekularnej mediacji pomiędzy tymi organellami i środowiskiem komórkowym.

- 3) Rezerwuarem kwasów tłuszczowych niezbędnych do syntezy TAG w komórkach mikroglonów są błony chloroplastowe, a wszelkie zaburzenia w przepływie tych molekuł pomiędzy błonami tylakoidów i szlakami syntezy TAG objawiają się zachwianiem homeostazy lipidowej komórki, obniżoną akumulacją TAG oraz stresem komórkowym.
- 4) Genomy mikroglonów kodują bardzo liczne kopie genów bezpośrednio związanych z syntezą TAG, jak opisałem to na przykładzie genów kodujących enzymy z rodziny DGAT. Jest to ewenement w świecie żywym i bez wątplenia odpowiada za wyjątkowy potencjał tych organizmów do syntezy i akumulacji tłuszczu. Przypuszcza się, iż zwielokrotnienie kopii analizowanych genów może być wynikiem zawilej ewolucji jednokomórkowych glonów należących infrakrólestwa *Heterokonta*, która według najbardziej aktualnej teorii polegała na, między innymi, na wielokrotnych zjawiskach endosymbiozy pomiędzy heterotroficznym pra-gospodarzem oraz zielonymi lub czerwonymi autotroficznymi algami.
- 5) Nie wszystkie z licznych genów DGAT kodowane przez jeden genom podlegają ekspresji i są jednakowo zaangażowane w syntezę TAG w komórkach glonów jednokomórkowych w odpowiedzi na ten sam czynnik stresowy (np. deprywacja azotu w medium). Fakt ten wskazuje, iż pewne geny DGAT mogą być aktywowane w odpowiedzi na specyficzny rodzaj stresu lub też katalizować syntezę TAG w warunkach innych niż stresowe. Funkcjonalna specjalizacja genów DGAT w komórkach mikroglonów widoczna jest nie tylko na poziomie ich ekspresji, ale także na poziomie ich specyficzności substratowej oraz odmiennej lokalizacji w obrębie domen retikulum endoplazmatycznego.
- 6) Dzięki wykorzystaniu metod biotechnologicznych, takich jak transformacja i nadekspresja specyficznych genów, możliwe jest zarówno zwiększenie poziomu (np. geny kodujące DGAT) jak i kompozycji (np. geny kodujące FAD) TAG w komórkach mikroglonów, bez konieczności wystawiania hodowli na stres. Co więcej, ta sama strategia pozwala na wykorzystanie genów DGAT z komórek mikroalg do zwiększenia akumulacji TAG w innych typach komórek, takich jak drożdże czy komórki nasion oraz liści roślin lądowych.
- 7) Odwrotna wersja powyższej strategii, polegająca na wprowadzaniu obcych (tj. np. roślinnych lub drożdżowych) genów do komórek mikroglonów również okazała się skuteczna pod względem biotechnologicznym. W przypadku modelowej okrzemki *P. tricornutum*, jednoczesna ekspresja genu kodującego drożdżowy enzym DGAT (ScDGA1) oraz roślinne białko strukturalne zasocjowane z ciałami olejowymi – oleozynę (AtOLEO3), pozwoliła na uzyskanie linii transgenicznych o zwiększonej zawartości TAG, który deponowany był w bardziej stabilnych fizjologicznie kroplach tłuszczu, zarówno w optymalnych jak i stresowych warunkach hodowli.

Możliwe zastosowania praktyczne uzyskanych wyników

Poza znaczeniem poznawczym, moje badania mają także duże znaczenie dla rozwoju nowych metod inżynierii genetycznej mikroglonów oraz mogą służyć jako cenne źródło informacji dla sektora przemysłowego nakierowanego na produkcję biomasy lipidowej zarówno z mikroglonów jak i roślin oleistych, ponieważ:

- 1) Po raz pierwszy zidentyfikowałem bowiem enzym DGAT (NoDGTT5) kodowany przez genom *N. oceanica*, który okazał się być doskonałym narzędziem molekularnym do zwiększanie zawartości TAG nie tylko w komórkach tego mikroglonu ale także w nasionach i tkankach zielonych roślin kwitnących. Ten ostatni aspekt jest szczególnie istotny, gdyż umożliwiłby zwiększenie produkcji biomasy lipidowej także z tkanek wegetatywnych roślin gospodarczych a nie z ich nasion. Osiągnięcie tego celu zminimalizowałoby konieczność wyboru pomiędzy produkcją nasion z przeznaczeniem na biopaliwa a żywnością dla zwierząt i człowieka. Jest to tym bardziej istotne, gdyż niekorzystne zjawiska ekologiczno-gospodarcze ostatnich lat, takie jak wzrost CO₂ w atmosferze, wyczerpywanie się zasobów paliw kopalnych, negatywne zmiany klimatyczne i związana z nimi redukcja areалу uprawnego oraz znaczny wzrost globalnej populacji człowieka, co raz częściej wymuszają konieczność takiego wyboru.
- 2) Optymalizacja transformacji i ekspresji docelowych genów w komórkach mikroglonów w której brałem udział otwiera możliwość jednoczesnej ekspresji wielu genów przy użyciu pojedynczego wektora i stwarza nowe możliwości inżynierii genetycznej tych organizmów. Jak opisano to na przykładzie *N. oceanica*, akumulacja kilku genów docelowych na jednym wektorze jest bardziej efektywną strategią ko-ekspresji aniżeli transformacja mieszaniną kilku wektorów zawierających pojedynczy gen. Opisany system pozwala nie tylko na możliwość manipulacji kilku szlaków metabolicznych jednocześnie, ale także na lepszą kontrolę procesu transformacji i ekspresji transgenów. Opisany system jest obecnie testowany w celu optymalizacji edycji genomu glonów jednokomórkowych przy użyciu technologii CRISPR/Cas9.
- 3) Poza biotechnologicznymi strategiami modyfikacji zawartości TAG w komórkach mikroalg, wyniki przedstawione w ramach niniejszego osiągnięcia wskazują także na metodę bio-flokulacji dwóch oleistych organizmów - grzyba (*M. elongata*) oraz mikroalgi (*N. oceanica*), jako naturalną alternatywę dla zwiększania zawartości TAG u obu partnerów takiej hodowli. Opisana strategia stanowi pierwszy krok na drodze do komercjalizacji metod pozyskiwania biopaliw oraz biomasy z grzybowo-glonowych agregatów na skalę przemysłową.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

a) Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Podczas realizacji zarówno pracy magisterskiej jak i doktorskiej moja praca naukowo-badawcza koncentrowała się wokół molekularnych, cytologicznych oraz fizjologicznych podstaw procesu rozmnażania płciowego roślin wyższych, ze szczególnym uwzględnieniem przestrzenno-funkcjonalnej organizacji ekspresji genów w różnicujących się komórkach ziarna pyłku.

Ziarno pyłku jest męskim gametofitem i stanowi generatywną fazę w cyklu życiowym roślin wyższych. Na jego rozwój składają się dwa procesy: mikrosporogeneza oraz mikrogametogeneza. Mikrosporogeneza obejmuje mejozę zachodzącą w komórkach macierzystych mikrospor (mikrosporocytach), w wyniku której powstaje tetrada haploidalnych mikrospor. Po uwolnieniu z tetrady, mikrospory różnicują się następnie w ziarna pyłku. Mikrospora jest jednym z najbardziej aktywnych metabolicznie stadiów rozwoju generatywnego roślin wyższych. Aktywność ta obejmuje także intensywną syntezę i składanie nowopowstających molekuł mRNA, które służą jako matryce do syntezy licznych białek zaangażowanych w różnorodne procesy metaboliczne. Wysoki poziom aktywności transkrypcyjnej oraz dojrzewania nowopowstałych transkryptów bezpośrednio przekłada się na przestrzenno-funkcjonalną organizację jądra komórkowego mikrospory, przez co stanowi ona dogodny model do badań organizacji ekspresji genów na poziomie komórkowym.

We wszystkich komórkach eukariotycznych główne etapy ekspresji genów zachodzące na terenie jądra komórkowego to transkrypcja oraz dojrzewanie pierwotnego transkryptu. Wynikiem aktywności kompleksu polimerazy II RNA jest pierwotny transkrypt (pre-mRNA), który podlega przekształceniu w dojrzałą cząsteczkę mRNA podczas procesu dojrzewania. Proces dojrzewania pre-mRNA (tzw. splicingu) zachodzi w dużych kompleksach rybonukleoproteinowych określanych mianem spliceosomów. Główne elementy spliceosomu to małe jądrowe rybonukleoproteiny (snRNPs) oraz liczne białkowe czynniki splicingowe. Każda molekula snRNP wchodząca w skład spliceosomu składa się z krótkiego łańcucha małych jądrowych RNA (snRNA) i kompleksu białek Sm, który stabilnie wiąże się do cząsteczki snRNA podczas biogenezy splicingowych snRNP (Staněk 2017).

W różnych typach komórek eukariotycznych wykazano, iż molekuly bezpośrednio zaangażowane w proces syntezy i dojrzewania mRNA nie są przypadkowo rozmieszczone na terenie jądra komórkowego, lecz rezydują w określonych jego rejonach, określanych mianem tzw. domen jądrowych. Cechą charakterystyczną domen jądrowych jest ich funkcjonalna specjalizacja, obejmująca m.in. specyficzną lokalizację molekuł zaangażowanych w określone etapy ekspresji genów. Istotnie, zarówno polimeraza RNA II jak i małe jądrowe RNA (snRNA) okazały się zajmować określone miejsca w jądrze komórkowym komórek zwierzęcych, sugerując specjalizację funkcjonalną poszczególnych obszarów jądra komórkowego (Spector 2001).

W trakcie realizacji **pracy magisterskiej** pod kierunkiem prof. dr hab. Alicji Górskiej-Brylass prowadziłem badania nad lokalizacją białek Sm, w jądrze mikrospory modrzewia *Larix decidua* Mill. Wysoka aktywność metaboliczna tych komórek oraz dobrze poznana ultrastruktura jądra komórkowego sprawia, że są one bardzo dogodnym modelem w badaniach przestrzenno-funkcjonalnej organizacji ekspresji genów. Głównym celem mojej pracy magisterskiej było zbadanie lokalizacji białek Sm w różnicującej się mikrosporze modrzewia przy zastosowaniu technik immunocytochemicznych na poziomie laserowego mikroskopu konfokalnego oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Podczas realizacji niniejszej pracy opanowałem techniki immunofluorescencyjne oraz immunozłotowe, ponadto nabyłem umiejętność obsługi laserowego mikroskopu konfokalnego oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego. W aspekcie poznawczym, przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że białka Sm w jądrze mikrospory modrzewia zlokalizowane są w sposób nieprzypadkowy i oprócz określonych obszarów nukleoplazmy, akumulują się także w ciałach jądrowych typu kłębuszkowatego (tzw. ciałach Cajala). Ponadto wykazałem, że liczba i rozmiar tych struktur jest pozytywnie skorelowana z aktywnością transkrypcyjną jądra mikrospory. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że w jądrze mikrospory modrzewia, podobnie jak w jądrach komórek zwierzęcych, molekuly zaangażowane w dojrzewanie pre-mRNA zlokalizowane są w określonych domenach jądra komórkowego i że lokalizacja ta zmienia się w zależności od nasilenia procesów transkrypcji oraz dojrzewania pre-mRNA.

Od 2003 roku, już jako asystent w Zakładzie Biologii Komórki UMK w Toruniu, kontynuowałem moje badania nad przestrzenno-funkcjonalną organizacją ekspresji genów w komórkach gametofitu roślin wyższych. Ponieważ w literaturze naukowej nie odnalazłem praktycznie żadnych doniesień na temat komórkowej organizacji molekuł zaangażowanych w dojrzewanie pre-mRNA w ziarnach pyłkowych roślin okrytonasiennych, celem mojej **rozprawy doktorskiej** realizowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Bednarskiej-Kozakiewicz, było zbadanie organizacji systemu slippingowego w różnicującym się i kielkującym ziarnie pyłkowym hiacynta (*Hyacinthus orientalis* L). Komórki pyłkowe roślin okrytonasiennych różnią się pod względem morfologicznym i fizjologicznym. Duża komórka wegetatywna, która zajmuje większość objętości ziarna pyłku, jest przez cały okres jego rozwoju zdecydowanie bardziej aktywna transkrypcyjnie aniżeli mała komórka generatywna. Ta ostatnia da początek komórkom plemnikowym w wyniku II podziału mitotycznego, który może miejsce w ostatniej fazie rozwoju ziarna pyłkowego w pylniku (u roślin z tzw. trójkomórkowymi ziarnami pyłkowymi) lub dopiero podczas wzrostu łagiewki pyłkowej (w przypadku roślin z tzw. dwukomórkowymi ziarnami pyłku). Przed uwolnieniem dojrzałych ziaren pyłku z pylników następuje ich odwodnienie, któremu towarzyszy hamowanie aktywności transkrypcyjnej komórek pyłkowych. W odpowiednich warunkach fizjologicznych ziarno pyłkowe kielkuje a wyrastająca z apertury łagiewka pyłkowa jest najszybciej rosnącą komórką roślinną, która służy do przeniesienia męskich gamet do woreczka zalążkowego. Wymienione cechy czynią zatem ziarno pyłkowe roślin okrytonasiennych idealnym modelem

do badań przestrzenno-funkcjonalnej organizacji ekspresji genów, gdyż w jednej strukturze biologicznej istnieje możliwość obserwacji docelowo trzech, różnych strukturalnie i biologicznie, typów jąder komórkowych: wegetatywnego, generatywnego oraz plemnikowego.

Aby poznać dystrybucję elementów maszynerii splicingowej na tle aktywności transkrypcyjnej i poziomu dojrzałego mRNA w komórkach ziarna pyłkowego oraz łagiewki pyłkowej hiacynta badałem: 1) ogólną aktywność transkrypcyjną różnicujących się komórek pyłkowych, 2) lokalizację i poziom poli(A) RNA, 3) wewnątrzkomórkową dystrybucję molekuł zaangażowanych w proces składania pre-mRNA, w tym snRNA, białek Sm oraz białkowego czynnika splicingowego SC35. W powyższych badaniach wykorzystałem metody immunofluorescencyjne, immunozłotowe oraz hybrydyzacji *in situ*. Moje badania wykazały, że funkcjonujący w komórkach różnicującego się ziarna pyłkowego i rosnącej łagiewki pyłkowej hiacynta system splicingowy wykazuje zarówno cechy wspólne z innymi komórkami eukariotycznymi, jak i posiada cechy specyficzne tylko dla tych komórek. Wyniki moich badań wykazały bowiem, że: 1) podobnie jak w innych komórkach eukariotycznych, organizacja systemu splicingowego w ziarnie pyłkowym, odzwierciedla zróżnicowanie aktywności transkrypcyjnej i zawartości poli(A) RNA w siostrzanych komórkach pyłkowych, 2) cechą specyficzną komórek dojrzewającego ziarna pyłkowego *Hyacinthus orientalis* jest to, iż funkcjonujący w ich jądrach system splicingowy uczestniczy w dojrzewaniu „długowiecznego” mRNA, który w dużej ilości magazynowany jest w cytoplazmie komórki wegetatywnej oraz w zdecydowanie niższej - w cytoplazmie komórki generatywnej dojrzałego ziarna pyłkowego, 3) w komórkach pyłkowych *Hyacinthus orientalis*, w których dochodzi do fizjologicznego zahamowania transkrypcji (dojrzałe ziarno pyłku), po którym nastąpi wznowienie syntezy RNA (wzrost łagiewki), elementy systemu splicingowego pozostają na terenie jąder, gdzie zlokalizowane są w skupieniach, 4) podczas wzrostu łagiewki pyłkowej, pomimo występowania w cytoplazmie obydwu komórek pyłkowych „długowiecznego” poli(A) RNA, zarówno jądro wegetatywne jak i jądro komórki generatywnej wznawiają transkrypcję czemu towarzyszy ponowna redystrybucja elementów systemu splicingowego z formy skupiskowej na dyfuzyjną.

Kontynuacja moich badań nad dystrybucją elementów systemu splicingowego podczas późniejszych etapów wzrostu łagiewki pyłkowej *Hyacinthus orientalis* pozwoliła ustalić, że: 1) ich organizacja w jądrze wegetatywnym i jądrze komórki generatywnej jest odmienna, co zapewne odzwierciedla różny los oraz odmienną funkcję biologiczną łagiewki i komórki generatywnej, 2) w skazanym na degenerację jądrze wegetatywnym elementy systemu splicingowego pozostają na jego terenie do okresu, w którym w warunkach *in vivo* łagiewki penetrują załącznię, co sugeruje że ich eliminacja z nieaktywnego już transkrypcyjnie jądra wegetatywnego prawdopodobnie zachodzi dopiero podczas jego lizy, po uwolnieniu zawartości łagiewki w woreczku załączkowym, 3) w komórce generatywnej, jeszcze przed jej podziałem na komórki plemnikowe, następuje eliminacja molekuł systemu splicingowego z jądra, co wskazuje że nie są one przekazywane

komórkom plemnikowym oraz, że do zygoty nie są przekazywane ojcowskie elementy systemu splicingowego.

Opisane powyżej wyniki stanowią pierwszą kompleksową analizę przestrzenno-funkcjonalnej organizacji ekspresji genów w komórkach męskiego gametofitu roślin okrytonasiennych podczas ich dojrzewania oraz fazy progamicznej. Istotę moich badań dodatkowo potwierdza fakt, iż zostały one opublikowane w formie 5 oryginalnych prac badawczych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, pod patronatem takich renomowanych wydawnictw naukowych jak Springer-Verlag oraz Oxford University Press. Publikacja jednej z tych prac miała miejsce przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych (2007), natomiast cztery pozostałe ukazały się po obronie mojej pracy doktorskiej, w następującej kolejności:

- **Zienkiewicz K**, Smoliński DJ, Bednarska E. (2006). Distribution of poly(A) RNA and splicing machinery elements in mature *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains and pollen tubes growing in vitro. *Protoplasma* 227: 95-103.
- **Zienkiewicz K**, Zienkiewicz A, Smoliński DJ, Świdziński M, Bednarska E. (2008). Intracellular organization of the pre-mRNA splicing machinery during *Hyacinthus orientalis* L. pollen development. *Sexual Plant Reproduction* 21: 217-231.
- **Zienkiewicz K**, Zienkiewicz A, Smoliński DJ, Rafińska K, Świdziński M, Bednarska E. (2008). Transcriptional state and distribution of poly(A) RNA and RNA polymerase II in differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains. *Sexual Plant Reproduction* 21: 233-245.
- **Zienkiewicz K**, Zienkiewicz A, Rodriguez-Garcia MI, Smoliński DJ, Świdziński M, Bednarska E. (2008). Transcriptional activity and distribution of splicing machinery elements during *Hyacinthus orientalis* L. pollen tube growth. *Protoplasma* 233: 129-139.
- **Zienkiewicz K**, Suwinska A, Niedojadło K, Zienkiewicz A, Bednarska E. (2011). Nuclear activity of sperm cells during *Hyacinthus orientalis* L. in vitro pollen tube growth. *Journal of Experimental Botany* 62: 1255-1269.

Przedstawione powyżej badania prowadzone w ramach realizacji mojej pracy doktorskiej sfinansowane zostały z pięciu następujących projektów badawczych:

- 2003; Grant UMK w Toruniu (nr 643B) pt. „Organizacja systemu splicingowego w różnicującym się ziarnie pyłkowym *Hyacinthus orientalis* L.”. Mój udział w grantie – kierownik.
- 2005; Grant UMK w Toruniu (nr 345B) pt. „Dystrybucja i poziom plicingowych snRNP na tle aktywności transkrypcyjnej różnicujących się komórek pyłkowych *Hyacinthus orientalis* L.”. Mój udział w grantie – kierownik.
- 2006-2007; Grant promotorski Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr 2 P04C 051 30) pt. „Wewnątrzkomórkowa lokalizacja elementów systemu splicingowego w różnicującym się ziarnie pyłku i rosnącej łagiewce pyłkowej *Hyacinthus orientalis* L.”. Mój udział w grantie – główny wykonawca.

- 2007-2010; Grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr N N303 290434) pt. „Dynamika transkrypcji i dystrybucja elementów maszynerii splicingowej podczas płciowego rozmnażania roślin kwiatowych”. Mój udział w grantie – wykonawca.
- 2008; Grant UMK w Toruniu (nr 365B) pt. „Organizacja systemu splicingowego podczas formowania komórek plemnikowych u roślin okrytonasiennych”. Mój udział w grantie – kierownik.

Oprócz badań na męskiej linii generatywnej hiacynta, uczestniczyłem również w badaniach nad przestrzenno-funkcjonalną organizacją ekspresji genów w komórkach żeńskiej linii generatywnej tego gatunku. Mój udział polegał na optymalizacji metod wykrywania małych cząsteczkowych snRNA metodami immunofluorescencyjnymi w komórkach woreczka zalążkowego. Wyniki tych badań opublikowano po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora nauk biologicznych w publikacji:

- Pięciński S, Smoliński DJ, **Zienkiewicz K**, Bednarska E. (2008). Changes in poly(A) and TMG snRNA distribution in the embryo sac of *Hyacinthus orientalis* L. before and after fertilization. *Sexual Plant Reproduction* 21: 247-257.

W latach 2003-2007 byłem również zaangażowany w badania prowadzone w ówczesnym Zakładzie Fizjologii Roślin (obecnie Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii) UMK w Toruniu pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Kopcewicza nad dwoma receptorami światła niebieskiego – fototropiny 1 oraz ZTL u modelowej rośliny dnia krótkiego *Ipomoea nil*. Mój udział w tych badaniach polegał na detekcji białka fototropiny 1 metodą immunozłotową na poziomie mikroskopu elektronowego w tkankach liścia *Ipomoea nil* oraz na optymalizacji detekcji transkryptu genu kodującego białko InZTL za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Wyniki prowadzonych badań ukazały się po obronie mojej pracy doktorskiej w następujących publikacjach:

- Zienkiewicz A, **Zienkiewicz K**, Kopcewicz J. (2008). Intracellular distribution of phototropin1 protein in short day plant *Ipomoea nil*. *Protoplasma* 233: 141-147.
- Zienkiewicz A, **Zienkiewicz K**, Glazińska P, Wojciechowski W, Smoliński DJ, Kopcewicz J. (2009). *Ipomoea nil* ZTL: molecular and cytological characterization. *Biologia Plantarum* 53: 435-443.

b) Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Tuż po obronie mojej pracy doktorskiej w 2007 roku zostałem mianowany na stanowisko adiunkta w Zakładzie Biologii Komórki UMK w Toruniu. Jednakże w już 2008 roku rozpocząłem mój pierwszy zagraniczny staż podoktorski w Estación Experimental del Zaidín (EEZ) należącej do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) w Granadzie (Hiszpania). CSIC jest największą publiczną instytucją badawczą w Hiszpanii i trzecią co do wielkości w Europie. Głównym celem tej instytucji jest rozwijanie i promowanie badań, które mają na celu postęp naukowy i technologiczny, a także współpraca z podmiotami hiszpańskimi i zagranicznymi w celu osiągnięcia tego celu. Kierownikiem grupy badawczej do której dołączyłem była prof.

Maria Isabel Rodriguez-Garcia, a obecnie jej liderem jest dr Juan de Dios Alché. Tematyka badawcza tego zespołu koncentruje się na różnorodnych aspektach płciowego rozmnażania oliwki (*Olea europaea* L.), która stanowi najważniejszą gospodarczo roślinę uprawną nie tylko w Hiszpanii, ale także w całym basenie Morza Śródziemnego. Głównym modelem badawczym moich badań w EEZ były, podobnie jak poprzednio, ziarno pyłku i łagiewka pyłkowa, jednakże przedmiot moich badań był całkowicie odmienny i dotyczył następujących zagadnień: 1) molekularna i funkcjonalna analiza białka kaleozyny w różnicującym się i kiełkującym pyłku oliwki, 2) charakterystyka elementów maszynerii zaangażowanej w mobilizację lipidów zapasowych w kiełkującym ziarnie pyłkowym oliwki oraz 3) rola lipidów zapasowych pyłku w płciowym rozmnażaniu *Olea europaea* L.

Jak wspomniano w pierwszej części niniejszego autoreferatu, lipidy neutralne (głównie w formie TAG) stanowią jedną z podstawowych form magazynowania energii i węgla w różnych organach i tkankach roślinnych i na poziomie komórkowym magazynowe są w organellach określanych mianem kropli tłuszczu, ciał tłuszczowych lub olejowych (z *ang.* oil bodies). Zgodnie z obecnie przyjętym trendem w literaturze, termin krople tłuszczu używany jest głównie w odniesieniu do mikroorganizmów, natomiast termin ciała olejowe stosowany jest najczęściej w przypadku roślin wyższych oraz zwierząt. W związku z tym do opisu tych organelli w dalszej części niniejszego używany będzie termin ciała olejowe.

Badania, w których brałem udział pozwoliły na identyfikację kaleozyny o masie ok. 30 kDa, specyficznej dla pyłku. Przy użyciu metod immunofluorescencyjnych oraz immunozłotowych wykazałem, że docelowymi miejscami jej depozycji jest nie tylko powierzchnia ciał olejowych, ale także ściana ziarna pyłku, a dokładniej płaszcz pyłku (z *ang.* pollen coat). Wykazałem ponadto, iż podczas rozwoju pyłku białko to pojawia się najpierw w tkance tapetum pylnikowego, tuż po uwolnieniu mikrospor z tetrad. W trakcie dalszego rozwoju, kaleozyna uwalniana jest do komory pylnika a następnie lokalizuje na powierzchni rozwijającego się pyłku. Jednocześnie, wewnątrz ziaren pyłku, poziom kaleozyny wzrasta głównie w komórce wegetatywnej, a wzrost ten jest pozytywnie skorelowany z liczbą ciał tłuszczowych w cytoplazmie i osiąga maksimum tuż przed antezą pylnika. W trakcie kiełkowania ziarna pyłkowego kaleozynę wykryłem z kolei: 1) na powierzchni ciał tłuszczowych obecnych w cytoplazmie łagiewki, 2) w cytoplazmie strefy podwierzchołkowej łagiewki oraz 3) w tonoplaście wakuoli formujących się u podstawy rosnącej łagiewki pyłkowej. Uzyskane wyniki sugerują, że kaleozyna obecna w ciałach tłuszczowych pyłku: 1) ma pochodzenie sporofitowe i gametofitowe oraz 2) może odgrywać istotną rolę w mobilizacji lipidów zapasowych, a także w reorganizacji membran komórkowych podczas kiełkowania pyłku w warunkach *in vitro*. Wyniki tych badań wchodzi w skład następujących publikacji:

- **Zienkiewicz K**, Castro AJ, Alché JD, Zienkiewicz A, Suárez C, Rodríguez-García MI. (2010). Identification and localization of a caleosin in olive (*Olea europaea* L.) pollen during *in vitro* germination. *Journal of Experimental Botany* 61: 1537-1546.

- **Zienkiewicz K**, Zienkiewicz A, Rodríguez-García MI, Castro AJ. (2011). Characterization of a caleosin expressed during olive (*Olea europaea* L.) pollen ontogeny. *BMC Plant Biology* 11: 122.

Poza badaniami dotyczącymi kaleozyny, byłem także zaangażowany w dwa multidyscyplinarne projekty, gdzie modelem badawczym także było kiełkujące ziarno pyłkowe oliwki. Pierwszy z nich obejmował molekularną, biochemiczną i cytologiczną analizę maszynerii zaangażowanej w mobilizację lipidów zapasowych podczas wzrostu łagiewki pyłkowej w warunkach *in vitro*. Mój udział w tym projekcie obejmował lokalizację enzymu lipoksygenazy (LOX) w kiełkującym ziarnie pyłkowym oliwki metodami immunofluorescencyjnymi oraz immunozłotowymi. W ramach tych badań wykazano, że: 1) ciała olejowe pyłku oliwki posiadają na swojej powierzchni specyficzne aktywności enzymatyczne, takie jak fosfolipaza, lipaza oraz lipoksygenaza, 2) eliminacja egzogennych cukrów z pożywki nie wpływa znacząco na kiełkowanie pyłku, aczkolwiek wyraźnie intensyfikuje wymienione aktywności enzymatyczne i przyspiesza mobilizację ciał olejowych, 3) inhibitory aktywności fosfolipazowej, lipazowej i lipoksygenazowej znacząco hamują nie tylko mobilizację ciał tłuszczowych, ale także kiełkowanie pyłku i wzrost łagiewki. Opisane wyniki jednoznacznie wskazują, że lipidy zmagazynowane w ciałach olejowych są wystarczającym źródłem energii i węgla dla prawidłowego przebiegu kiełkowania pyłku, a endogenne lipazy i lipooksygenazy obecne na powierzchni ciał olejowych są bezpośrednio zaangażowane w proces ich mobilizacji w rosnącej łagiewce pyłkowej oliwki. Wyniki te opublikowano w:

- Zienkiewicz A, **Zienkiewicz K**, Rejón JD, Rodríguez-García MI, Castro AJ. (2013). New insights into the early steps of oil body mobilization during pollen germination. *Journal of Experimental Botany* 64: 293-302.
- Zienkiewicz A, Rejón JD, **Zienkiewicz K**, Castro A, Rodriguez-Garcia MI. (2015). In gel detection of lipase activity in crude plant extracts (*Olea europaea* L.). *Bio-protocol* 5: 8.

Drugi ze wspomnianych projektów miał na celu charakterystykę kompozycji molekularnej ściany komórkowej kiełkującego ziarna pyłkowego i rosnącej łagiewki pyłkowej u *Olea europaea* L. Do tego celu wykorzystano różnorodne metody detekcji pektyn i białek arabinogalaktanowych (AGP) na poziomie mikroskopu konfokalnego i elektronowego oraz technikę Western-blott. Mój udział w tych badaniach obejmował detekcję pektyn estryfikowanych i de-estryfikowanych metodami immunozłotowymi. Wyniki uzyskane w ramach tego projektu ujawniły kompleksową dynamikę zmian w poziomie i lokalizacji molekuł ściany komórkowej podczas kiełkowania ziarna pyłkowego i pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków: 1) synteza pektyn i AGP ma miejsce *de novo*, z chwilą rozpoczęcia kiełkowania ziarna pyłkowego i jest regulowana czasowo-przestrzennie, 2) akumulacja galaktanów w strefie łączącej ziarno pyłku z podstawą łagiewki pyłkowej sugeruje ich rolę w mechanicznej stabilizacji tego regionu, 3) arabiniany i białka AGP mogą być z kolei istotne dla rozpoznania i adhezji łagiewki pyłkowej w tkankach słupka podczas zapylenia i fazy progamicznej. Wyniki te opisano w publikacji:

- Castro AJ, Suarez C, Alché JD, **Zienkiewicz K**, Zienkiewicz A, Rodriguez-Garcia MI. (2013). Electrophoretic profiling and immunocytochemical detection of pectins and arabinogalactan proteins in the olive pollen during germination and pollen tube growth. *Annals of Botany* 112: 503-13.

Słupek oliwki był drugim, po ziarnie pyłkowym, modelem w moich badaniach w ramach stażu doktorskiego w EEZ. W 2011 z powodzeniem wprowadziłem nową metodę makroskopowego wykrywania jonów wapnia w tym organie, która może być z łatwością stosowana w badaniach na innych roślinach. Jony wapnia odgrywają kluczową rolę w interakcjach pyłek-słupek podczas fazy progamicznej (Dumas i Gaude 2006), jednakże wiedza na temat całościowej dynamiki tych jonów na poziomie całego organu jakim jest słupek jest stosunkowo niewielka. Wykazałem, że wprowadzając fluorescencyjny marker jonów wapniowych Fluo-3 AM bezpośrednio do wiązek przewodzących rośliny można wykryć obecność a także ocenić stężenie puli jonów wapniowych na poziomie całego narządu przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego lub stereoskopowego wyposażonego w lampę fluorescencyjną, co opisano w pracy:

- **Zienkiewicz K**, Rejón JD, Suárez C, Castro AJ, de Dios Alché J, Rodríguez García MI. (2011). Whole-organ analysis of calcium behaviour in the developing pistil of olive (*Olea europaea* L.) as a tool for the determination of key events in sexual plant reproduction. *BMC Plant Biology* 11: 150.

Jednocześnie uczestniczyłem również w badaniach składu ściany komórkowej w słupku oliwki w odpowiedzi na zapylenie. Przy użyciu zestawu przeciwciał rozpoznających różne typy pektyn i białek AGP wykazano istotne zmiany w poziomie, składzie i lokalizacji tych molekuł w słupku w odpowiedzi na interakcję z ziarnem pyłku oraz podczas fazy progamicznej. Mój udział w tym projekcie obejmował detekcję pektyn metodami immunozłotowymi na poziomie mikroskopu elektronowego. Do najważniejszych wyników, które opublikowano w:

- Suárez C, Zienkiewicz A, Castro AJ, **Zienkiewicz K**, Majewska-Sawka A, Rodríguez-García MI. (2012). Cellular localization and expression pattern of pectins and arabinogalactan proteins in olive (*Olea europaea* L.) pistil tissues during development: implications for pollen-pistil interaction. *Planta* 237: 305-319,

należą: 1) w odpowiedzi na zapylenie dochodzi do wzrostu poziomu kwaśnych pektyn estryfikowanych jak i de-estryfikowanych pektyn bogatych w arabinozę oraz białek AGP, 2) po zapyleniu, poziom wszystkich badanych molekuł sukcesywnie malał, 3) białka AGP oraz pektyny neutralne zawierające w swoim składzie arabinozę lokalizują przede wszystkim w komórkach znamienia oraz eksudacie wydzielanym przez jego komórki na powierzchnię znamienia, co sugeruje ich istotną rolę w interakcji pyłek-słupek podczas zapylenia, 4) pektyny neutralne oraz zawierające w swoim składzie galaktozę obecne były z kolei głównie w korowych tkankach słupka, co może wskazywać na ich udział w interakcji pomiędzy tkankami słupka i rosnącą łagiewką pyłkową.

W 2012 roku zostałem włączony jako wykonawca w (umieszczony w spisie poniżej) duży projekt finansowany przez Autonomiczny Rząd Andaluzji, który miał na celu identyfikację i charakterystykę białek w eksudacie wydzielanym przez znamię słupka dwóch modelowych gatunków – oliwki (*O. europaea* L.) oraz lillii (*Lilium longiflorum* L.). Badania te miały na celu poszerzenie wiedzy na temat molekularnych aspektów fizjologii znamienia u dwóch różnych gatunków roślin posiadających znamię typu mokrego (wydzielające eksudat), zwłaszcza w kontekście interakcji pyłek-słupek podczas procesu zapylenia. Analizując metodami proteomicznymi skład białkowy eksudatu pochodzącego ze znamienia lillii i oliwki zidentyfikowano odpowiednio, 51 oraz 57 białek. Mój udział w tych badaniach obejmował ich klasyfikację funkcjonalną metodami bioinformatycznymi. Charakterystyka molekularna i funkcjonalna zidentyfikowanych białek wykazała, że eksudat wydzielany przez znamię słupka obu gatunków jest środowiskiem aktywnym metabolicznie ze znaczną przewagą procesów katabolicznych. Profil ten potwierdza obecność bogatej maszynerii enzymatycznej zaangażowanej w degradację polisacharydów i tłuszczów obecnych na znamieniu do produktów, które będą inkorporowane do kiełkującego na znamieniu ziarna pyłkowego oraz w degradację komponentów ściany samego pyłku celem umożliwienia wzrostu łagiewki pyłkowej. Wyniki tych badań opisano w dwóch publikacjach:

- Rejón JD, Delalande F, Schaeffer-Reiss C, Carapito C, **Zienkiewicz K**, de Dios Alché J, Rodríguez-García MI, Van Dorsselaer A, Castro AJ. (2013). Proteomics profiling reveals novel proteins and functions of the plant stigma exudate. *Journal of Experimental Botany* 64: 5695-5705.
- Rejón JD, Delalande F, Schaeffer-Reiss C, Carapito C, **Zienkiewicz K**, de Dios Alché J, Isabel Rodríguez-García M, Van Dorsselaer A, Castro AJ. (2014). The plant stigma exudate: A biochemically active extracellular environment for pollen germination? *Plant Signaling and Behaviour* 1: 9(2).

Poza charakterem poznawczym, moje badania w ramach stażu podoktorskiego w EEZ, obejmowały także rozwój nowych molekularnych metod diagnostyki alergii na pyłek oliwki. Schorzenie to jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych typów uczulenia sezonowego w regionach Morza Śródziemnego o wysokiej koncentracji drzew oliwki. Na poziomie molekularnym zidentyfikowano jak dotąd 12 alergenów białkowych pyłku oliwki, z nomenklaturą Ole e1 - Ole e12 (Villalba i wsp. 2014), jednakże ich wysoka różnorodność molekularna jak i brak specyficznych metod diagnostycznych nie pozwalała na identyfikację konkretnego alergenu odpowiedzialnego za reakcję immunologiczną pacjentów. Badania, w których brałem udział, miały na celu 1) standaryzację ekstraktów białkowych z pyłku oliwki celem ich wykorzystania do diagnostyki molekularnej alergii oraz 2) opracowanie kompleksowej metody detekcji interakcji pomiędzy białkami obecnymi w serum pacjentów z symptomami alergii a pyłkowymi alergenami obecnymi we wspomnianych ekstraktach. Dane uzyskane podczas realizacji obu tych celów były z kolei wykorzystywane w opracowywaniu metod indywidualnej (celowanej) terapii antyalergicznego względem konkretnego antygenu, zależnie od wyników reakcji alergen-serum u danego pacjenta. Do realizacji pierwszego celu wykorzystano

zautomatyzowany system elektroforezy kapilarniej (CE) w tzw. mikrochipach (z ang. chip capillary electrophoresis), który pozwolił na precyzyjną detekcję specyficznych antygenów, zarówno w ekstraktach referencyjnych jak i ekstraktach białkowych izolowanych z pyłku oliwki. W ramach tego projektu uczestniczyłem w optymalizacji metod detekcji i analizy alergenu Ole e1 w ekstraktach białkowych pyłku oliwki. Z kolei w realizacji drugiego celu wykorzystałem technikę elektroforezy dwuwymiarowej (z ang. 2D-electrophoresis, 2-DE) skombinowanej z techniką Western-blott o wysokiej rozdzielczości. W odróżnieniu od techniki Western-blott zastosowanej po jednowymiarowym rozdziale białek i detekcji białka głównie na podstawie jego masy molekularnej, technika 2-DE pozwala na wykrycie ewentualnych izoform danego białka, które rozdzielają się także w zależności od charakterystycznego dla siebie punktu izoelektrycznego (IEF). Mój udział polegał na opracowaniu metody jednoczesnej detekcji kilku alergenów oraz wszystkich ich izoform na jednej membranie (tzw. fluorescencyjny Western-blott typu multipleks). Cel ten udało się osiągnąć a opracowana przeze mnie metoda: 1) pozwalała na użycie mniejszej, w porównaniu z indywidualną detekcją, ilości materiału biologicznego do badań, 2) skraca czas diagnostyki oraz 3) umożliwia ocenę intensywności reakcji alergen-serum względem konkretnej izoformy alergenu, co pozwala z kolei na bardziej celowaną terapię antyalergiczną. Wyniki tych badań opublikowano w postaci rozdziału w monografii oraz dwóch prac eksperymentalnych w następującej kolejności:

- **Zienkiewicz K**, García-Quirós E, Alché J, Rodríguez-García MI, Castro A. (2012). Detection and quantitation of olive pollen allergen isoforms using 2-D Western blotting. W: Jimenez-Lopez JC. Current Insights in Pollen Allergens. InTech Open, Rijeka. Croatia, str.41-56, ISBN: 980-953-307-461-5.
- Zienkiewicz A, **Zienkiewicz K**, Florido F, Marco FM, Romero PJ, Castro AJ, Alché JD. (2014). Chip-based capillary electrophoresis profiling of olive pollen extracts used for allergy diagnosis and immunotherapy. *Electrophoresis* 35:2681-2685.
- **Zienkiewicz K**, Alché JD, Zienkiewicz A, Tormo A, Castro AJ. (2015). Identification of olive pollen allergens using a fluorescence-based 2D multiplex method. *Electrophoresis* 36: 1043-1050.

Poza badaniami struktur rozrodczych oliwki, uczestniczyłem także w badaniach procesów związanych z metabolizmem substancji zapasowych w rozwijającym się oraz kielkującym nasieniu tego gatunku. Moja rola w tych badaniach dotyczyła analizy ultrastrukturalnej komórek bielma i zarodka podczas tych procesów a także lokalizacji wybranych molekuł zaangażowanych w metabolizm tłuszczu. Badania te wykazały, że: 1) zarówno tłuszcze jak i białka są syntetyzowane i akumulowane w komórkach bielma i zarodka rozwijającego się nasienia, 2) procesowi kielkowania nasienia towarzyszy mobilizacja zmagazynowanych tłuszczu oraz białek, 3) lipaza, lipooksygenaza oraz fosfolipaza A są głównymi enzymami odpowiedzialnymi za degradację tłuszczu zapasowych zmagazynowanych w ciałach olejowych komórek liścieni oraz 4) ciała białkowe obecne w komórkach nasienia oliwki są organellami wielofunkcyjnymi, gdyż oprócz magazynowania białek

zapasowych przechowują również enzymy odpowiedzialne za degradację tłuszczu. Wyniki tych badań opublikowano w następujących artykułach:

- Jimenez-Lopez JC, Zienkiewicz A, **Zienkiewicz K**, Alche JD, Rodríguez-García MI. (2016). Biogenesis of protein bodies during legumin accumulation in developing olive (*Olea europaea* L.) seed. *Protoplasma* 253: 517-530.
- Zienkiewicz A, **Zienkiewicz K**, Rejón JD, Alché JD, Castro AJ, Rodríguez-García MI. (2014). Olive seed protein bodies store degrading enzymes involved in mobilization of oil bodies. *Journal of Experimental Botany* 65: 103-115.
- Zienkiewicz A, Jiménez-López JC, **Zienkiewicz K**, Alché JD, Rodríguez-García MI. (2011). Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) *in vitro* seed germination and seedling growth. *Protoplasma* 248: 751-765.

Podczas mojego blisko 6-cio letniego pobytu w EEZ, moje zatrudnienie oraz badania były finansowane z następujących projektów badawczych/programów stypendialnych:

Zatrudnienie:

- 2008-2009; Dwuletni kontrakt podoktorski z grantu Andaluzjskiego Rządu Autonomicznego (Hiszpania) (nr P06-AGR-01791) pt. „Cellular and molecular bases of pollen behaviour and interaction with the pistil in the olive (*Olea europaea* L.)”. Kierownik: Maria Isabel Rodriguez-Garcia. Mój udział w grantcie – wykonawca.
- 2010-2012; Trzyletni kontrakt podoktorski zdobyty w ramach programu konkursowego JAE Doc dla doktorów ze wszystkich dziedzin naukowych w Hiszpanii i finansowany przez Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
- 2013-2014; Dwuletni kontrakt podoktorski z grantu Andaluzjskiego Rządu Autonomicznego (Hiszpania) (nr CVI-5767) pt. „Identification and characterization of proteins implicated in pollen-pistil recognition in olive (*Olea europaea* L.) by proteomic techniques.”. Kierownik: Antonio Jesus Castro Lopez. Mój udział w grantcie – wykonawca.

Badania:

- 2007-2010; Grant Andaluzjskiego Rządu Autonomicznego (Hiszpania) (nr P06-AGR-01791) pt. „Cellular and molecular bases of pollen behaviour and interaction with the pistil in the olive (*Olea europaea* L.)”. Kierownik: Maria Isabel Rodriguez-Garcia. Mój udział w grantcie - wykonawca
- 2008-2011; Grant Hiszpańskiego Ministerstwa Nauki i Innowacji (nr AGL2008-00517/AGR) pt. „Study of pectinolytic enzymes of olive (*Olea europaea* L.) and their implications in pollen germination and pollen tube growth in the pistil”. Kierownik: Antonio Jesus Castro Lopez. Mój udział w grantcie – wykonawca.

- 2011-2014; Grant Andaluzyjskiego Rządu Autonomicznego (Hiszpania) (nr CVI-5767) pt. „Identification and characterization of proteins implicated in pollen-pistil recognition in olive (*Olea europaea* L.) by proteomic techniques.”. Kierownik: Antonio Jesus Castro Lopez. Mój udział w grantcie – wykonawca.
- 2013-2014; Grant INTERCONNECTA współfinansowany przez Unię Europejską i Hiszpańskie Ministerstwo Ekonomii i Konkurencyjności (nr 090201130026; nr OTT 20134342). „Development of new processes in the Andalusian olive oil pressing industry for the preparation of novel products of high biological value with applications in human health (NUTRAOLEUM)”. Mój udział w grantcie – wykonawca.
- 2013-2014; Grant RECUPERA współfinansowany przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego oraz Hiszpańskie Ministerstwo Ekonomii i Konkurencyjności (nr 20134R078). „Optimization of pollination, fruit set and fruit development in triploid watermelons”. Mój udział w grantcie – wykonawca.

Podczas mojej pracy w EEZ, w latach 2013-2014 byłem także zaangażowany w badania prowadzone we współpracy z moją macierzystą uczelnią UMK w Toruniu, a dokładniej z zespołem badawczym prof. dr hab. Jana Kopcewicza. Koncentrowały się one na poznaniu mechanizmów formowania brodawek korzeniowych oraz funkcjonowania strefy odcinania kwiatów łubinu (*Lupinus luteus* L.) na poziomie tkankowym i komórkowym i stanowiły część szeroko zakrojonych projektów badawczych nakierowanych na zwiększenie plonów tej rośliny strączkowej o wyjątkowym potencjale agronomicznym dla Europy Środkowej. Badania te były finansowane zarówno z projektu Polskiego Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi (projekt 149/2011) oraz konsorcjum eidA3-ceiA3 w ramach The International Agrifood Doctorate School w EEZ, CSIC w Granadzie (Hiszpania). Mój udział w tych badaniach polegał na analizie makro- (brodawki korzeniowe) oraz mikroskopowej (strefa odcinania kwiatu) wymienionych struktur. Mikroskopowa analiza strefy odcinania obejmowała zarówno zmiany strukturalne zachodzące na poziomie tkankowym jak i dynamikę lokalizacji prekursora etylenu 1-karboksy-1-aminocyklopropanu (ACC) w tych tkankach podczas procesu odcinania kwiatu łubinu. Wyniki tych badań opublikowano w trzech następujących pracach:

- Frankowski K, Wilmowicz E, Kućko A, Zienkiewicz A, **Zienkiewicz K**, Kopcewicz J. (2015). Molecular cloning of the BLADE-ON-PETIOLE gene and expression analyses during nodule development in *Lupinus luteus*. *Journal of Plant Physiology* 179:35-39.
- Frankowski K, Wilmowicz E, Kućko A, Zienkiewicz A, **Zienkiewicz K**, Kopcewicz J. (2015). Profiling the BLADE-ON-PETIOLE gene expression in the abscission zone of generative organs in *Lupinus luteus*. *Acta Physiologia Plantarum* 37: 220.
- Frankowski K, Kućko A, Zienkiewicz A, **Zienkiewicz K**, Alché JD, Kopcewicz J, Wilmowicz E. (2017). Ethylene-dependent effects on generative organ abscission of *Lupinus luteus*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 86: 1-11.

W 2014 opuściłem Hiszpanię, gdyż otrzymałem prestiżowe 3-letnie Stypendium Marii Curie (oryg. Marie Curie Outgoing Fellowship for Career Development) w ramach programu „Marie Curie Actions (obecnie Marie Skłodowska-Curie Actions)” finansowanego przez Komisję Europejską ze środków 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej na realizację projektu “AlgaeOilSynth -Towards improving biofuel production - Oil synthesis and accumulation pathways in promising oleaginous microalgae” (Grant Europejskiej Agencji Wykonawczej ds. Badań Naukowych (REA) przy Komisji Europejskiej nr 627266)⁴. Projekt, którego byłem głównym koordynatorem, realizowany był w dwóch fazach: 1) wyjazdowej - poza obszarem Unii Europejskiej (2014-2016) na Uniwersytecie Stanowym Michigan (East Lansing, USA) w grupie badawczej prof. Christopa Benninga oraz 2) powrotnej - na obszarze Unii Europejskiej (2016-2017) na Uniwersytecie w Getyndze (Niemcy) w grupie badawczej prof. Ivo Feussnera. Projekt ten miał na celu identyfikację i charakterystykę funkcjonalną kluczowych genów zaangażowanych w syntezę lipidów neutralnych u glonów jednokomórkowych o istotnym znaczeniu dla przemysłu biopaliw. Zagadnienia badawcze zawarte w tym projekcie stanowią główną oś mojego osiągnięcia habilitacyjnego i zostały szczegółowo scharakteryzowane w punkcie 4c niniejszego autoreferatu.

Mój pobyt na Uniwersytecie Stanowym Michigan (MSU) w Stanach Zjednoczonych, poza realizacją projektu AlgaeOilSynth w grupie prof. Christopa Benninga należącej do MSU-DOE Plant Research Laboratory, zaowocował także współpracą z innymi grupami badawczymi działającymi w tym instytucie. Wykorzystując moją wiedzę i doświadczenie z zakresu technik mikroskopii elektronowej zaproponowano mi udział w projektach realizowanych przez grupę dr Gregory’ego Bonito (Department of Plant Soil and Microbial Sciences, Michigan State University, USA) oraz grupę prof. Federici Brandizzi (MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University, USA). W pierwszym z wymienionych projektów analizowałem obecność endosymbiotycznych bakterii *Mycoavidus cysteinexigens* w strzępkach grzybni *Mortierella elongata* na poziomie ultrastrukturalnym (TEM), a cały projekt obejmował kompleksową analizę genomową i genofiltetyczną obu tych symbiotycznych organizmów. Efektem tej współpracy jest publikacja:

- Uehling J, Gryganskyi A, Hameed K, Tschaplinski T, Misztal P, Wu S, Desirò A, Vande Pol N, Du Z-Y, Zienkiewicz A, **Zienkiewicz K**, Morin E, Tisserant E, Splivallo R, Hainaut M, Henrissat B, Ohm R, Yan J, Kuo A, Lipzen A, Nolan M, LaButti K, Barry K, Goldstein A, Labbé J, Schadt Ch, Tuskan G, Grigoriev I, Dr. Martin F, Vilgalys R, Bonito G. (2017). Comparative genomics of *Mortierella elongata* and its bacterial endosymbiont *Mycoavidus cysteinexigens*. *Environmental Microbiology* 19: 2964–2983.

Z koeli moja współpraca z grupą badawczą kierowaną przez prof. Federicę Brandizzi obejmowała ultrastrukturalną analizę aparatu Golgiego w roślinach *A. thaliana* typu dzikiego oraz u roślin z mutacją genów

⁴ Certyfikat imienny Europejskiej Agencji Wykonawczej ds. Badań o przyznaniu Stypendium dostępny razem z załącznikiem nr 4.

kodujących białka związane z funkcjonowaniem komórkowego systemu błonowego, a zwłaszcza retikulum endoplazmatycznego. W pracy:

- Stefano G, Renna L, Wormsbaecher C, Gamble J, **Zienkiewicz K**, Brandizzi F. (2018). Plant Endocytosis Requires the ER Membrane-Anchored Proteins VAP27-1 and VAP27-3. **Cell Reports** 23: 2299-2307,

wykazałem znaczące różnice w ultrastrukturze aparatu Golgiego u mutantów genu kodującego białka VAP27, będącego komórkowym markerem miejsc kontaktu pomiędzy błoną plazmatyczną i retikulum endoplazmatycznym. Różnice te dotyczyły przede wszystkim organizacji strefy trans aparatu Golgiego, która u mutantów charakteryzowała się dłuższymi i cieńszymi cysternami aniżeli u roślin linii rodzicielskiej. Znacznie bardziej wyraźne różnice w ultrastrukturze tego regionu aparatu Golgiego wykazałem w drugiej pracy z tym samym zespołem badawczym:

- Renna L, Stefano G, Slabaugh E, Wormsbaecher C, Sulpizio A, **Zienkiewicz K**, Brandizzi F. (2018). TGNap1 is required for microtubule-dependent homeostasis of a subpopulation of the plant Trans-Golgi Network. **Nature Communications** 9: 5313,

gdzie analizowano rośliny *A. thaliana* z mutacją genu kodującego białko TGNap1, będące silnie konserwowane w obrębie podkrólestwa *Metazoa* jednakże o jeszcze nie do końca poznanej funkcji. W badaniach, których celem było właśnie poznanie roli TGNap1 w komórkach roślinnych, wykazałem, iż mutacja genu kodującego TGNap1 objawia się znacznie liczniejszymi i powiększonymi pęcherzykami aparatu Golgiego, w porównaniu z roślinami linii rodzicielskiej. Wyniki przedstawione w powyższej pracy wykazały, że białko TGNap1 w komórkach *A. thaliana* jest ściśle zaangażowane w procesy transportu błonowego z udziałem aparatu Golgiego oraz w regulację homeostazy systemu błonowego u tej rośliny.

W trakcie mojego dwuletniego pobytu na Stanowym Uniwersytecie Michigan (MSU) moje zatrudnienie i badania, w które byłem zaangażowany finansowane były z następujących źródeł:

Zatrudnienie:

- Grant nr 627266 Europejskiej Agencji Wykonawczej ds. Badań (REA), ze środków 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej (Projekt *AlgaeOilSynth*).

Badania:

- Grant nr 627266 Europejskiej Agencji Wykonawczej ds. Badań REA ze środków 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej (Projekt *AlgaeOilSynth*)
- Grant nr FA9550-11-1-0264 Biura ds. Badań Nukowych Amerykańskich Sił Powietrznych (US Air Force Office of Scientific Research, AFOSR).
- Grant kooperacyjny nr DE-FC02-07ER6449 pomiędzy Departamentem Energii Stanów Zjednoczonych (US Department of Energy) i Centrum Bioenergii Wielkich Jezior (Great Lakes Bioenergy Research Center, GLBRC).

- Grant nr DE-FG02-91ER20021 Departamentu Energii Stanów Zjednoczonych (US Department of Energy), Oddział Nauk Chemicznych, Geologicznych i Biologicznych (Division of Chemical Sciences, Geosciences and Biosciences).
- Środki własne Uniwersytetu Stanowego Michigan (MSU) w ramach programu AgBioResearch.

W 2016 roku, po zakończeniu fazy wyjazdowej Stypendium Marii-Skłodowskiej Curie, powróciłem do Europy i dołączyłem do grupy prof. Ivo Feussnera w Zakładzie Biochemii Roślin na Uniwersytecie w Getyndze (Niemcy), gdzie w ciągu kolejnych 12 miesięcy sfinalizowałem projekt *AlgaeOilSynth*. Podsumowując, mój pobyt w obu laboratoriach w ramach tego Stypendium zaowocował 12 publikacjami w renomowanych czasopismach międzynarodowych, 5 przyjętymi do druku rozdziałami w przygotowywanym obecnie wydawnictwie *Encyclopedia of Lipidomics* pod patronatem wydawnictwa Springer-Verlag oraz 10 doniesieniami na prestiżowych międzynarodowych konferencjach dedykowanych lipidom roślinnym (szczegóły w załączniku nr 4).

Obecnie kontynuuję mój staż doktorski w laboratorium prof. Feussnera, gdzie, oprócz badań nad metabolizmem lipidów u mikroglonów, jestem zatrudniony jako wykonawca w dużym projekcie InRAPS, finansowanym przez Federalne Ministerstwo Żywności i Rolnictwa (BEML, nr 2814900115). Celem tego projektu jest ewaluacja nowych technologii zaprawy nasion rzepaku nakierowanych na podniesienie odporności tej ważnej gospodarczo rośliny naszego regionu Europy na szkodniki bez stosowania pestycydów. Idea tego projektu jest ściśle związana ze stopniowo wprowadzanym zakazem stosowania syntetycznych pestycydów na obszarze Unii Europejskiej i koniecznością poszukiwania biologicznych strategii walki ze szkodnikami roślin uprawnych. Moja rola w tym projekcie obejmuje ogólnoprofilowe analizy metabolomu roślin rzepaku (*ang.* non-targeted metabolomics) z zastosowaniem spektrometrii mas (MS), wliczając zarówno optymalizację metod analitycznych i obróbkę wygenerowanych danych.

Plany przyszłych badań

W najbliższej przyszłości planuję powrót do Polski, stworzenie tu własnej grupy badawczej i kontynuację badań nad zastosowaniem mikroglonów jako surowca do produkcji biomasy lipidowej. Jak wykazały moje dotychczasowe badania, zwiększaniu zawartości TAG w komórkach mikroalg zarówno poprzez stres jak i na skutek manipulacji genetycznych towarzyszy znaczna redukcja lub całkowite zahamowanie podziałów komórkowych. W związku z tym moje przyszłe projekty będą miały na celu identyfikację molekularnych mechanizmów łączących określone programy metaboliczne z cyklem komórkowym u tych organizmów. Moja przyszła grupa badawcza specjalizować się będzie zarówno w badaniach podstawowych, jak i badaniach biotechnologicznych oraz biologii syntetycznej, mających na celu uzyskanie linii mikroglonów akumulujących nie tylko większe ilości tłuszczu, ale także aktywnie dzielących się co pozwoli na uzyskanie hodowli o lepszej produkcji biomasy. W szerszym ujęciu planuję także, aby profil badawczy mojej grupy mieścił się nie tylko w

aktualnych trendach badań na glonach jednokomórkowych, ale także aby sprostał współczesnym wyzwaniom w produkcji energii odnawialnej jak i globalnej ekonomii. W perspektywie długoterminowej planuję także rozwój platformy technik „omicznych” z zakresu metabolomiki i lipidomiki, dedykowanej glonom jednokomórkowym, a także roślinom lądowym o dużym znaczeniu badawczym oraz gospodarczym. Platforma ta służyła by jako serwis analityczny w projektach krajowych oraz międzynarodowych. W celu finansowania moich przyszłych badań planuję projekty własne jak i we współpracy z grupą prof. Feussnera (Uniwersytet w Getyndze, Niemcy) oraz grupą prof. Benninga (Uniwersytet Stanowy Michigan, USA), dla których o finansowanie będę ubiegał się z następujących źródeł:

- 1) Europejska Rada ds. Badań Naukowych (ERC – European Research Council), w ramach akcji Synergy Grants
- 2) Narodowe Centrum Nauki (NCN)
- 3) Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej (FNP)
- 4) Niemiecka Fundacja ds. Badań (DFG - Deutsche Forschungsgemeinschaft).

Praca dydaktyczna i organizacyjna

Jak wyszczególniono w załączniku nr 4, obok pracy naukowej, niezależnie od kraju pobytu, prowadzę również działalność dydaktyczną. Zarówno jako asystent jak i adiunkt w Zakładzie Biologii Komórki UMK w Toruniu, w latach 2002-2008 prowadziłem zajęcia praktyczne dla studentów Biologii i Biotechnologii w wymiarze 210 godzin rocznie z następujących przedmiotów: 1) Biologia Komórki, 2) Embriologia Roślin oraz 3) Techniki Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej, jak również sprawowałem bezpośrednią opiekę nad 6 magistrantami i 2 licencjatami podczas realizacji ich prac dyplomowych. Podczas pobytu w EEZ w Hiszpanii, w każdym roku akademickim prowadziłem zajęcia dla studentów i doktorantów Uniwersytetu w Granadzie (w języku hiszpańskim i angielskim) w ramach następujących kursów: 1) Genetyka Pyłku (8 godzin rocznie), 2) Techniki Mikroskopii – Teoria i Praktyka Mikroskopii Konfokalnej (kurs: Technical Training Courses ceiA3 - Agrifood International Docotrate School, 16 godzin rocznie) oraz 3) Zastosowanie Mikroskopii w Badaniach Roślin (kurs: UNESCO: Soil Science, Soil Fertility and Plant Biology, 16 godzin rocznie). Ponadto sprawowałem bezpośrednią opiekę nad 1 magistrantem i 1 licencjatem podczas realizacji ich pracy dyplomowych. W roku 2010 byłem zaangażowany w organizację warsztatów popularyzujących naukę dla uczniów szkół średnich w Andaluzji pt. “Un Laboratorio Moderno en tus Manos - Semana de la Ciencia 2010” pod patronatem Autonomicznego Rządu Andaluzji, a latach 2012 oraz 2013 uczestniczyłem w organizacji I i II kongresu PIISA (Research Investigation by Young Students in Science Technology, Humanities and Arts). W trakcie mojego obecnego zatrudnienia w Zakładzie Biochemii Roślin na Uniwersytecie w Getyndze sprawowałem bezpośrednią opiekę nad realizacją jednej pracy licencjackiej, jednej pracy magisterskiej oraz 3 studentami rotacyjnymi podczas ich 3-miesięcznego stażu w wymienionym laboratorium.

Dane bibliometryczne dorobku naukowego

Liczba prac opublikowanych w czasopismach z Imapct Factor	34
Sumaryczny Impact Factor*	145,742
Suma punktów MNiSW	1255
Liczba wszystkich cytowań	268 (WoS**) 537 (GS***)
Indeks Hirscha	10 (Wos) 15 (GS)

*IF dla roku opublikowania,

** Źródło: Web of Science (bez autocytowań), ***Źródło: Google Scholar (stan na dzień 01.03.2019)

Cytowana literatura:

Archibald JM, Keeling PJ. (2002). Recycled plastids: a 'green movement' in eukaryotic evolution. *Trends in Genetics* 18: 577-584.

Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT. (2012). Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *Journal of Lipid Research* 53: 215-226.

Chen C-X, Sun Z, Cao H-S, Fang F-L, Ouyang L-L, Zhou Z-G. (2015). Identification and characterization of three genes encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) from the microalga *Myrmecea incisa* Reisigl. *Algal Research* 12: 280–288.

Dufey A. (2006). Biofuels production, trade and sustainable development: emerging issues. International Institute for Environment and Development, London.

Dumas C, Gaude T. (2006). Fertilization in plants: is calcium a key player?. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2: 244-253.

Gidda SK, Park S, Pyc M, Yurchenko O, Cai Y, Wu P, Andrews DW, Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT. (2016). Lipid droplet-associated proteins (LDAPs) are required for the dynamic regulation of neutral lipid compartmentation in plant cells. *Plant Physiology* 170: 2052–2071.

Goold H, Beisson F, Peltier G, Li-Beisson Y. (2015). Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Reports* 34: 545–555.

- Hernandez ML, Whitehead L, He Z, Gazda V, Gilday A, Kozhevnikova E, Vaistij FE, Larson TR, Graham IA. (2012). A cytosolic acyltransferase contributes to triacylglycerol synthesis in sucrose-rescued *Arabidopsis* seed oil catabolism mutants. *Plant Physiology* 160: 215–225.
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal* 54: 621–639.
- Huang AHC. (2017). Plant Lipid Droplets and Their Associated Proteins: Potential for Rapid Advances. *Plant Physiology* 176: 1894–1918.
- Keeling PJ, Burger G, Durnford DG, Lang BF, Lee RW, Pearlman RE, Roger AJ, Gray MW. (2005). The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 670–676.
- Krienitz L, Wirth M. (2006). The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* 36: 204–210.
- Li X, Moellering ER, Liu B, Johnny C, Fedewa M, Sears BB, Kuo MH, Benning C. (2012). A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 24: 4670–86.
- Liu B, Benning C. (2013). Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Current Opinion in Biotechnology* 24: 300–309.
- Pyc M, Cai Y, Greer MS, Yurchenko O, Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT. (2017). Turning Over a New Leaf in Lipid Droplet Biology. *Trends in Plant Science* 22: 596–609.
- Radakovits R, Jinkerson RE, Darzins A, Posewitz MC. (2010). Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. *Eucaryotic Cell* 9: 486–501.
- Rodolfi L, Chini Zittelli G, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102:100–112.
- Saha S, Enugutti B, Rajakumari S, Rajasekharan R. (2006). Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oilseeds: molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiology* 141:1533–1543.
- Sandager L, Gustavsson MH, Ståhl U, Dahlqvist A, Wiberg E, Banas A, Lenman M, Ronne H, Szymne S. (2002). Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 277: 6478–6482.

- Sanjaya, Miller R, Durrett TP, Kosma DK, Lydic TA, Muthan B, Koo AJ, Bukhman YV, Reid GE, Howe GA, Ohlrogge J, Benning C. (2013). Altered lipid composition and enhanced nutritional value of *Arabidopsis* leaves following introduction of an algal diacylglycerol acyltransferase 2. *The Plant Cell* 25: 677-693.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87-96.
- Spector DL. (2001). Nuclear domains. *Journal of Cell Science* 114: 2891-2893.
- Staněk D. (2017). Cajal bodies and snRNPs - friends with benefits. *RNA Biology* 14: 671-679.
- Turchetto-Zolet AC1, Maraschin FS, de Moraes GL, Cagliari A, Andrade CM, Margis-Pinheiro M, Margis R. (2011). Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology* 11: 263.
- Vieler A, Wu G, Tsai CH, Bullard B, Cornish AJ, Harvey C, Reca IB, Thornburg C, Achawanantakun R, Buehl CJ, Campbell MS, Cavalier D, Childs KL, Clark TJ, Deshpande R, Erickson E, Armenia Ferguson A, Handee W, Kong Q, Li X, Liu B, Lundback S, Peng C, Roston RL, Sanjaya, Simpson JP, Terbush A, Warakanont J, Zäuner S, Farre EM, Hegg EL, Jiang N, Kuo MH, Lu Y, Niyogi KK, Ohlrogge J, Osteryoung KW, Shachar-Hill Y, Sears BB, Sun Y, Takahashi H, Yandell M, Shiu SH, Benning C. (2012a). Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLoS Genetics* 8: e1003064.
- Vieler A, Brubaker SB, Vick B, Benning C. (2012b). A lipid droplet protein of *Nannochloropsis* with functions partially analogous to plant oleosins. *Plant Physiology* 158:1562-1569.
- Zienkiewicz K, Castro AJ, Alché JD, Zienkiewicz A, Suárez C, Rodríguez-García MI. (2010). Identification and localization of a caleosin in olive (*Olea europaea* L.) pollen during in vitro germination. *Journal of Experimental Botany* 61: 1537-1546.
- Zou J, Wei Y, Jako C, Kumar A, Selvaraj G, Taylor DC. (1999). The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *Plant Journal* 19: 645-653.
- Villalba M, Barderas R, Mas S, Colás C, Batanero E, Rodríguez R. (2014). Amaranthaceae pollens: review of an emerging allergy in the mediterranean area. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 24: 371-381.

