

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Marii Gorczycy

pod tytułem

„Czynniki transkrypcyjne jako narzędzia masowego działania w ulepszaniu cech przemysłowych u drożdży”

Metryczka:

- data uzyskania tytułu magistra: 22.06.2021, jednostka: Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
- nie dotyczy
- przebieg pracy naukowo-zawodowej:

2016 - 2020 studia inżynierskie (kierunek: Biotechnologia, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, praca inżynierska wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, promotor: prof. dr hab. Ewelina Celińska)

2020 - 2021 studia magisterskie (kierunek: Biotechnologia, specjalizacja: Biotechnologia przemysłowa, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, praca magisterska wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, promotor: prof. dr hab. Ewelina Celińska)

2021 - 2025 Szkoła Doktorska Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (dyscyplina: nauki biologiczne, rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, promotor: prof. dr hab. Ewelina Celińska)

2021 - 2026 główny wykonawca w projekcie NCN, Opus 21, nr 2021/41/B/NZ9/00086, pt. Czynniki transkrypcyjne jako narzędzia masowego działania w ulepszaniu cech przemysłowych u drożdży, kierownik projektu: prof. dr hab. Ewelina Celińska

Ocena:

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. **Marii Gorczycy** została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Eweliny Celińskiej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego OPUS o numerze 2021/41/B/NZ9/00086, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, pod kierownictwem prof. dr hab. Eweliny Celińskiej.

Problematyka pracy doktorskiej jest aktualna i merytorycznie uzasadniona. Słuszność podjętej tematyki badawczej wynika z konieczności poszukiwania nowych, wydajnych platform komórkowych dla produkcji białek heterologicznych, w których tradycyjne modele, takie jak *Saccharomyces cerevisiae*, ustępują miejsca drożdżom niekonwencjonalnym o unikalnych właściwościach metabolicznych. Wybór gatunku *Yarrowia lipolytica* jako obiektu badań jest tym samym merytorycznie uzasadniony jego naturalną zdolnością do wysokiej sekrecji białek oraz efektywnego wykorzystywania niszowych źródeł węgla, co czyni go niezwykle atrakcyjnym biokatalizatorem przemysłowym. Kluczowym problemem, na który odpowiada niniejsza praca, jest ograniczenie wydajności bioprocessów wynikające z obciążeń metabolicznych towarzyszących nadekspresji genów oraz stresu środowiskowego w bioreaktorach. Podjęcie próby charakterystyki czynników transkrypcyjnych (TFs) jako nadrzędnych regulatorów procesów komórkowych jest podejściem innowacyjnym i uzasadnionym systemowo; zamiast modyfikacji pojedynczych genów strukturalnych, praca skupia się na manipulacji całych kaskad regulacyjnych. Pozwala to na jednoczesne kształtowanie złożonych cech fenotypowych, takich jak odporność na stesy środowiskowe (adekwatne do warunków bioprocessowych) przy zachowaniu wysokiej efektywności syntezy rProt.

Tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej charakteryzuje się wysokim stopniem innowacyjności na kilku płaszczyznach współczesnej biologii/biotechnologii molekularnej. Jej nowatorstwo opiera się przede wszystkim na odejściu od klasycznej inżynierii metabolicznej, skupionej na manipulacji pojedynczymi genami strukturalnymi, na rzecz zaawansowanej **inżynierii regulacyjnej**. Wykorzystanie czynników transkrypcyjnych (TFs) jako narzędzi do modyfikacji złożonych cech fenotypowych *Y. lipolytica* stanowi nowatorskie podejście systemowe, pozwalające na skoordynowane sterowanie całymimi sieciami genetycznymi odpowiedzialnymi za wydajność syntezy białek i odporność na stres.

Innowacyjność metodologiczna pracy wyraża się także w implementacji strategii **high-throughput screening (HTS)**, która w połączeniu ze zminiaturyzowanymi hodowlami pozwala na analizę niespotykanej dotąd liczby kombinacji szczepów i warunków środowiskowych. Przekształcenie tak uzyskanych, wielowymiarowych danych w przeszukiwalne modele matematyczne wpisuje się w najnowocześniejsze trendy biologii systemowej i *Data Science*, oferując nową jakość w interpretacji interakcji genotyp-środowisko. Ponadto, praca wnosi istotny wkład nie tylko w dyscyplinę biotechnologii, ale

również w obszarze **biologii syntetycznej** poprzez potraktowanie czynników transkrypcyjnych jako funkcjonalnych komponentów do budowy indukowalnych systemów ekspresyjnych. Takie podejście umożliwia tworzenie „inteligentnych” biokatalizatorów, zdolnych do autonomicznej odpowiedzi na dynamicznie zmieniające się warunki w bioreaktorze, co stanowi znaczący postęp w stosunku do obecnie stosowanych metod optymalizacji procesowej. W efekcie, rozprawa nie tylko wypełnia lukę w wiedzy podstawowej na temat niekonwencjonalnych drożdży *Y. lipolytica*, ale przede wszystkim proponuje oryginalne, skalowalne rozwiązania technologiczne o dużym potencjale komercyjnym.

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. **Marii Gorczyca** stanowi zbiór pięciu oryginalnych artykułów opublikowanych w latach 2023-2024 w recenzowanych zagranicznych czasopismach znajdujących się w aktualnym wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MNiSW. Są to następujące prace:

- 1) **Gorczyca M.**, Nicaud JM., Celińska E. (2023) Transcription factors enhancing synthesis of recombinant proteins and resistance to stress in *Yarrowia lipolytica* Applied Microbiology and Biotechnology, 107, 4853-4871
- 2) **Gorczyca M.**, Białas W., Nicaud JM., Celińska E. (2024) Mother(Nature) knows best' - hijacking nature-designed transcriptional programs for enhancing stress resistance and protein production in *Yarrowia lipolytica*; presentation of YaliFunTome database Microbial Cell Factories, 23:26
- 3) Celińska E., **Gorczyca M.** (2024) 'Small volume - big problem' - culturing *Yarrowia lipolytica* in high-throughput micro-formats Microbial Cell Factories, 23:184 wraz z zestawem danych stanowiącego załącznik do publikacji doi: 10.17632/c3trp7jt3n.1
- 4) **Gorczyca M.**, Korpys-Woźniak P., Celińska E. (2024) An interplay between transcription factors and recombinant protein synthesis in *Yarrowia lipolytica* at transcriptional and functional levels - the global view International Journal of Molecular Sciences, 25(17), 9450
- 5) Celińska E., Korpys-Woźniak P., **Gorczyca M.**, Nicaud JM. (2024) Using Euf1 transcription factor as a titrator of erythritol-inducible promoters in *Yarrowia lipolytica*; insight into structure, splicing and regulation mechanism FEMS Yeast Research, Volume 24, foae027

Analiza porównawcza oświadczeń doktorantki (mgr inż. Gorczycy) oraz współautorów jednoznacznie potwierdza **wiodący i kluczowy udział doktorantki** w powstaniu wszystkich wymienionych publikacji. Należy zaznaczyć, że w szczególności analiza oświadczenia Promotorki podkreśla fakt, że choć obie autorki wspólnie wypracowywały koncepcje i manuskrypty, to na doktorantce spoczywał główny ciężar realizacji praktycznej, wykonawczej i analitycznej projektów. Opisany zakres prac doktorantki wskazuje na interdyscyplinarne zaangażowanie mgr inż. Gorczycy, łączące tradycyjne techniki laboratoryjne z nowoczesnymi metodami *in silico*.

Wiodący udział mgr inż. Gorczycy w prowadzeniu badań będących podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora jest bezsprzeczny i jest zgodny także z informacjami zawartymi w artykułach w sekcji „*Author contributions*”.

Struktura ocenianej rozprawy doktorskiej została przygotowana w sposób logiczny i właściwy dla doktoratu opartego na cyklu publikacji powiązanych tematycznie. Pracę otwiera sekcja teoretyczna, stanowiąca fundament merytoryczny, w której autorka charakteryzuje drożdże *Y. lipolytica* jako platformę produkcyjną oraz przybliży rolę czynników transkrypcyjnych (TFs) w inżynierii cech złożonych i regulacji promotorów indukowalnych. Następnie sprecyzowano cele i tezy badawcze, kładąc szczególny nacisk na aplikacyjny potencjał wyników w przemyśle biotechnologicznym.

Główny trzon rozprawy (rozdział 5) stanowi szczegółowe omówienie pięciu publikacji naukowych (P1–P5), które odzwierciedlają kolejne etapy procesu badawczego. Cykl ten rozpoczyna się od szerokiej identyfikacji TFs zwiększających syntezę białek i odporność na stres (P1), przechodzi przez stworzenie bazy danych YaliFunTome (P2) oraz opracowanie innowacyjnej metodyki wysoko-przepustowych mikroprowadzeń hodowli (P3). Kolejne etapy to globalna analiza wzajemnych oddziaływań transkrypcyjnych (P4) oraz precyzyjna, strukturalna i funkcjonalna charakterystyka czynnika Euf1 jako regulatora siły ekspresji genów (P5). W tej ostatniej części autorka wykazała się biegłością w bioinformatycznym modelowaniu struktur białkowych oraz badaniu interakcji molekularnych.

Całość wieńczy podsumowanie z wnioskami końcowymi oraz wyznaczenie dalszych kierunków badań, co podkreśla dojrzałość naukową opracowania. Strukturę uzupełnia bogata dokumentacja dorobku doktorantki, w tym opis staży, projektów i nagród, a także formalne oświadczenia o współautorstwie, które precyzują jej wiodący, eksperymentalny i analityczny

udział w powstaniu prezentowanych wyników. Do ocenianej dysertacji dołączono pełne teksty publikacji, które stanowią podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora.

Ocena spójności tematycznej zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych

Zestawienie pięciu publikacji naukowych oraz towarzyszącego im zbioru danych cyfrowych stanowi wyjątkowo spójny merytorycznie i metodologicznie cykl badawczy, skoncentrowany na systemowej inżynierii sieci regulacyjnych drożdży *Y. lipolytica*. Prace te tworzą logiczną strukturę, która prowadzi od rozwoju zaawansowanych narzędzi hodowlanych, przez masową identyfikację funkcjonalną czynników transkrypcyjnych, aż po ich praktyczne wykorzystanie w biologii syntetycznej. Fundamentem cyklu jest opracowanie i walidacja wysokoprzepustowego protokołu zminiaturyzowanych hodowli, co umożliwiło generowanie wielowymiarowych zbiorów danych w skali dotąd niespotykanej dla tego gatunku. Ta baza technologiczna pozwoliła na przeprowadzenie szeroko zakrojonego skringingu 125 szczepów w zróżnicowanych warunkach środowiskowych, co zaowocowało identyfikacją kluczowych regulatorów (TFs) odpowiedzialnych za jednoczesne wzmocnienie syntezy białek heterologicznych oraz poprawę odporności na stresy bioprosesowe.

Integracja wyników z poszczególnych etapów badań pozwoliła na stworzenie unikalnej bazy danych YaliFunTome oraz dogłębne zrozumienie globalnych zależności między aparatem transkrypcyjnym a wydajnością funkcjonalną komórki. Spójność cyklu domyka praca o charakterze aplikacyjnym, w której zidentyfikowany wcześniej czynnik transkrypcyjny Euf1 został z powodzeniem wykorzystany jako precyzyjny modulator („titrator”) siły promotorów indukowalnych. Takie podejście dowodzi, że prezentowane prace nie są zbiorem przypadkowych tematów, lecz konsekwentnie realizowaną strategią badawczą, zmierzającą do przekształcenia *Y. lipolytica* w wysoce przewidywalną i odporną platformę biotechnologiczną.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że wszystkie załączone publikacje stanowią spójny tematycznie zbiór prac odpowiadający tematowi dysertacji. Dlatego stwierdzam także, że warunek ustawowy jaki powinna spełniać praca doktorska, w tym zakresie należy uznać za spełniony.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Podjęcie metodologiczne zastosowane w rozprawie cechuje się wyjątkową precyzją i nowoczesnością, stanowiąc wzorcowy przykład integracji biologii molekularnej z inżynierią bioprosesową. Kluczowym elementem strategii badawczej była ewolucyjna optymalizacja systemów hodowlanych w mikroskali, która ewoluowała od wstępnych testów w standardowych formatach do wysoce zaawansowanych układów z wykorzystaniem systemu Duetz. Zastosowanie kwadratowych dołków oraz specjalistycznych pokrywek typu „sandwich” pozwoliło na wyeliminowanie krytycznych błędów pomiarowych, takich jak efekt brzegowy czy nierównomierne natlenienie, co zapewniło wysoką powtarzalność wyników i zbliżyło warunki mikroskali do rzeczywistych parametrów panujących w bioreaktorach przemysłowych. Na szczególną uwagę zasługuje dbałość o czystość chemiczną układu eksperymentalnego, objawiająca się m.in. doбором podłoża o niskiej autofluorescencji oraz zastosowaniem jednolitego buforu dla szerokiego zakresu pH, co skutecznie wyeliminowało zmienne zakłócające interpretację wpływu czynników środowiskowych na fizjologię komórek.

Innowacyjność metodologii przejawia się również w szerokim wykorzystaniu narzędzi statystycznych i matematycznych, w szczególności podejścia *Design of Experiments*. Zamiast tradycyjnej analizy pojedynczych parametrów, autorka zastosowała planowanie eksperymentalne pozwalające na jednoczesne badanie wielu zmiennych ilościowych i kategorycznych, co umożliwiło precyzyjne mapowanie interakcji między pH, temperaturą, a dostępnością źródeł węgla i azotu. Dane uzyskane z kolekcji 125 szczepów poddano zaawansowanemu modelowaniu metodą powierzchni odpowiedzi (RSM) oraz wizualizacji w formie map cieplnych, co przekształciło surowe wyniki fluorescencji i wzrostu w czytelne modele krajobrazu regulacyjnego *Y. lipolytica*. Tak skonstruowane podejście nie tylko gwarantuje wysoką siłę statystyczną wnioskowania, ale również dostarcza gotowych protokołów wysokoprzepustowych (*high-throughput*), które mogą być bezpośrednio adaptowane przez laboratoria badawczo-rozwojowe w celu szybkiej optymalizacji nowych szczepów biotechnologicznych.

Publikacja pt. „*Transcription factors enhancing synthesis of recombinant proteins and resistance to stress in Yarrowia lipolytica*”, opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Applied Microbiology and Biotechnology*, reprezentuje najwyższy poziom merytoryczny i stanowi fundament teoretyczno-eksperymentalny dla całej rozprawy doktorskiej. Jej wartość wynika z innowacyjnego podejścia do inżynierii szczepów, w którym Doktorantka odchodzi od klasycznej modyfikacji szlaków metabolicznych na rzecz inżynierii regulacyjnej, operującej na

poziomie czynników transkrypcyjnych (TFs). Praca ta udowadnia, że manipulacja nadrzędnymi regulatorami, takimi jak Gzf1, Hsf1 czy Skn7, pozwala na jednoczesne sterowanie wieloma procesami molekularnymi, co jest kluczowe dla uzyskania szczepów zdolnych do wysokiej produkcji białek w trudnych warunkach bioprosesowych. Szczególną zaletą merytoryczną artykułu jest zastosowanie zaawansowanego modelowania matematycznego do analizy ogromnej liczby danych fenotypowych uzyskanych w 72 różnych wariantach środowiskowych. Pozwoliło to na precyzyjne skorelowanie aktywności poszczególnych TFs z konkretnymi stresorami, takimi jak wysoka temperatura, ekstremalne pH czy stres osmotyczny, co ma bezpośrednie przełożenie na praktykę przemysłową. W analizie krytycznej publikacji (Gorczyca M., Nicaud JM., Celińska E. (2023) *Transcription factors enhancing synthesis of recombinant proteins and resistance to stress in Yarrowia lipolytica* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107, 4853-4871) trudno doszukać się błędów warsztatowych, gdyż metodologia jest spójna i rygorystyczna, jednak można wskazać na pewne ograniczenia wynikające z pionierskiego charakteru badań. Skupienie się na wewnątrzkomórkowym białku reporterowym, choć uzasadnione na etapie szerokiego skriningu, pozostawia otwarte pytanie o wpływ badanych TFs na skomplikowany szlak sekrecyjny białek wydzielanych na zewnątrz, co jest często kluczowe w przemyśle. Ponadto, inżynieria regulatorów nadrzędnych zawsze niesie ze sobą ryzyko efektów plejotropowych, czyli nieprzewidzianych zmian w innych obszarach metabolizmu, których pełne zmapowanie wymagałoby dodatkowych, szeroko zakrojonych analiz omicowych. Należy jednak zaznaczyć, że te aspekty nie stanowią błędów, lecz raczej wyznaczają granice przyjętego modelu badawczego, które autorka konsekwentnie rozwija w kolejnych pracach swojego cyklu. Publikacja ta w istotny sposób porządkuje wiedzę o systemach regulacyjnych *Y. lipolytica*, dostarczając wspólnocie naukowej konkretnych, zwalidowanych narzędzi do optymalizacji procesów bioprodukcji.

Z kolei publikacja pt. „*Small volume—big problem: culturing Yarrowia lipolytica in high-throughput micro-formats*” (Celińska i Gorczyca, 2024), opublikowana w *Microbial Cell Factories*, stanowi niezwykle istotne studium metodologiczne. Praca ta poddaje krytycznej analizie ograniczenia techniczne hodowli drożdży niekonwencjonalnych w mikroskali, co jest kluczowe dla wiarygodności badań typu *high-throughput*. Główną zaletą publikacji jest dekonstrukcja „czarnej skrzynki”, jaką często są zminiaturyzowane hodowle. Doktorantka wraz z Promotorką udowadniają, że wyniki uzyskiwane w standardowych mikropłytkach bez odpowiedniej optymalizacji mogą prowadzić do błędnych wniosków biologicznych z powodu

ograniczeń fizykochemicznych (głównie transferu tlenu). Praca ta legitymizuje dane przedstawione w pozostałych częściach rozprawy (P1, P2, P4), pokazując, że wybrane warunki hodowlane nie były dziełem przypadku, lecz wynikiem rygorystycznych testów. Dane zaprezentowane na rycinach są kluczowe dla zrozumienia dynamiki wzrostu *Y. lipolytica*.

Doktorantka wraz z pozostałymi autorami bardzo rzetelnie pokazują różnice w profilach wzrostu w zależności od objętości roboczej (V_L). Ryciny te wyraźnie obrazują, że powyżej pewnej objętości krytycznej, wzrost drożdży staje się liniowy, co jest klasycznym sygnałem ograniczenia tlenowego (k_{La}). Jest to dowód na to, że wiele publikowanych danych dotyczących „optymalizacji” szczepów w mikroplątkach może w rzeczywistości mierzyć jedynie wydajność transferu tlenu w danym dołku, a nie potencjał genetyczny komórki. Bardzo wartościowe są ryciny porównujące różne formaty (płytki okrągłe vs. kwadratowe). Jasno z nich wynika, że geometria dołka w mikroskali ma radykalny wpływ na turbulencję cieczy. Dane te uzasadniają przejście na system Duetz (kwadratowe dołki), co zostało przedstawione jako warunek konieczny dla uzyskania powtarzalnych wyników. Autorki zwracają uwagę na istotny problem techniczny – wpływ autofluorescencji podłoża i samej gęstości zawiesiny komórkowej na odczyt sygnału reporterowego. Dane te sugerują, że bez odpowiedniej korekty statystycznej (którą autorka stosuje w rozprawie), surowe wyniki z czytników płytek mogą być obarczone błędem systematycznym przekraczającym 20-30%.

Należy jednak zauważyć, że praca koncentruje się na konkretnym modelu genetycznym. Chociaż parametry fizyczne (k_{La} , parowanie) są uniwersalne, to fizjologiczna odpowiedź na stres tlenowy może się różnić między różnymi izolatami *Y. lipolytica*. Warto byłoby rozważyć, czy zoptymalizowane „okno hodowlane” jest tak samo stabilne dla szczepów o bardzo wysokiej aktywności proteolitycznej. Choć ryciny pokazują skuteczność pokrywek typu „sandwich”, parowanie w długotrwałych hodowlach (powyżej 48-72 h) w mikroskali pozostaje wyzwaniem, którego nie da się całkowicie wyeliminować, a jedynie zminimalizować. Wpływa to na wzrost osmolalności pożywki, co może nakładać dodatkowy stres na komórki, nieplanowany w projekcie eksperymentalnym.

Publikacja pt. „*An Interplay between Transcription Factors and Recombinant Protein Synthesis in Yarrowia lipolytica at Transcriptional and Functional Levels—The Global View*” stanowi jeden z najbardziej zaawansowanych merytorycznie elementów cyklu doktorskiego mgr inż. Marii Gorczy, oferując holistyczne spojrzenie na mechanizmy regulacyjne u drożdży niekonwencjonalnych. Wartość merytoryczna pracy opiera się na udanej próbie



zintegrowania danych z poziomu transkrypcyjnego (ekspresja genów) z poziomem funkcjonalnym (aktywność syntetyczna i metaboliczna komórki). Praca wyróżnia się rygorystycznym podejściem do analizy wpływu delekcji i nadekspresji wybranych TFs na globalny krajobraz fizjologiczny *Y. lipolytica*, co pozwala na wyjście poza uproszczone modele regulacji i dostrzeżenie złożonych interakcji, w których dany czynnik może pełnić rolę zarówno aktywatora, jak i represora, zależnie od kontekstu środowiskowego.

Krytyczna analiza danych zaprezentowanych na rycinach pozwala na sformułowanie kilku istotnych uwag dotyczących interpretacji wyników. Na uwagę zasługują wykresy porównawcze poziomu transkrypcji i wydajności produkcji białka reporterowego, które wyraźnie obnażają zjawisko „obciążenia metabolicznego” (ang. *metabolic burden*). Ryciny przedstawiające profile wzrostu szczepów z delekcjami wybranych TFs (np. *gzf1Δ* czy *hsf1Δ*) w zestawieniu z produkcją rProt rzucają światło na fakt, że niektóre regulatory są niezbędne do zachowania homeostazy komórkowej podczas intensywnej syntezy białek. Dane te sugerują jednak pewną ostrożność w interpretacji – wysoki poziom fluorescencji specyficznej w niektórych wariantach może wynikać nie tyle ze wzmożonej syntezy, co z drastycznego zahamowania podziałów komórkowych i akumulacji białka w starzejącej się populacji, co jest częstym wyzwaniem w interpretacji wyników *high-throughput*.

Dodatkowo mimo wysokiej jakości prezentacji danych, pewnym ograniczeniem publikacji jest oparcie „globalnego spojrzenia” na wyselekcjonowanej grupie czynników transkrypcyjnych, co – choć uzasadnione technicznie – pozostawia pewien niedosyt w kontekście pełnej rekonstrukcji interaktomu. Ryciny obrazujące korelacje między poszczególnymi wariantami genetycznymi a odpowiedzią na stres wykazują dużą zmienność (wysokie odchylenia standardowe w niektórych punktach), co może wskazywać na ogromną wrażliwość sieci regulacyjnych *Y. lipolytica* na nawet subtelne wahania mikrośrodowiskowe w mikroskali. Ponadto, choć praca deklaruje spojrzenie globalne, brakuje w niej bezpośredniego zestawienia danych z szeroko zakrojonymi analizami RNA-seq dla wszystkich testowanych mutantów, co pozwoliłoby na jeszcze głębszą weryfikację postawionych tez. Niemniej jednak, ryciny przedstawiające mapy cieplne zmian fenotypowych są wykonane w sposób wzorcowy, pozwalając czytelnikowi na szybką identyfikację TFs o najwyższym potencjale aplikacyjnym. Publikacja ta wskazuje, że racjonalne projektowanie wydajnych biokatalizatorów musi uwzględniać dynamiczne i często nieintuicyjne współdziałanie między aparatem transkrypcyjnym a wydajnością translacyjną komórki.

Załączona do doktoratu publikacja pt. „*An Interplay between Transcription Factors and Recombinant Protein Synthesis in Yarrowia lipolytica at Transcriptional and Functional Levels—The Global View*”, opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*, stanowi również wartościowy i dojrzały merytorycznie element dorobku naukowego Doktorantki, w pełni wpisujący się w ramy rozprawy doktorskiej. Praca podejmuje niezwykle istotne zagadnienie z zakresu biologii molekularnej, a Doktorantka ponownie wykazuje się dużą rzetelnością badawczą i odwagą naukową, otwarcie konfrontując się z wynikami, które doprowadziły do częściowego odrzucenia pierwotnej hipotezy badawczej. Należy podkreślić, że wykazanie, że zmiany poziomu transkrypcji czynników transkrypcyjnych w odpowiedzi na stres nie są bezpośrednim i uniwersalnym predyktorem ich przydatności w inżynierii szczepów, stanowi kluczowy i niezwykle pouczający wniosek dla całej dyscypliny. Taka konkluzja chroni innych badaczy przed uproszczoną interpretacją danych typu „omics” i wskazuje na znacznie większą złożoność sieci regulacyjnych niż dotychczas przypuszczano.

Pod względem warsztatowym praca stoi na bardzo wysokim poziomie, wykorzystując nowoczesne narzędzia edycji genetycznej, w tym nadekspresję oraz wyciszenie genów (*knockout*), wsparte precyzyjnymi systemami reporterowymi opartymi na fluorescencji. Autorka nie ogranicza się jedynie do prezentacji wyników, ale dokonuje ich głębokiej analizy krytycznej, rzetelnie odnosząc się do istniejącej literatury przedmiotu i próbując wyjaśnić zaobserwowane rozbieżności poprzez pryzmat różnic w warunkach hodowlanych czy fizjologii komórki. Choć wiele mechanizmów molekularnych badanych czynników transkrypcyjnych o nieznanym dotąd funkcji nadal wymaga dalszych badań, praca ta stanowi solidny fundament pod przyszłe projekty z zakresu biologii syntetycznej. Publikacja udowadnia, że Doktorantka posiada zdolność do samodzielnego planowania złożonych eksperymentów, krytycznej oceny uzyskanych danych oraz syntezy wniosków o znaczeniu ogólnonaukowym.

Ostania z cyklu publikacji pt. “*Using Euf1 transcription factor as a titrator of erythritol-inducible promoters in Yarrowia lipolytica; insight into the structure, splicing, and regulation mechanism*” (Celińska i in., 2024) wnosi istotną wiedzę w biologię syntetyczną drożdży *Y. lipolytica*. W mojej ocenie artykuł jest wysokiej jakości publikacją badawczą, która przesuwa granice inżynierii genetycznej *Y. lipolytica*. Nie mniej mam do niego kilka uwag, do których prosiłbym aby Doktorantka odniosła się podczas obrony doktoratu. Kluczowym wnioskiem z pracy jest to, że nadekspresja skróconej wersji *EUF1* (spEuf1) eliminuje indukowalny charakter promotora (staje się on konstytutywny). Z punktu widzenia biologii syntetycznej jest



to efekt obosieczny – zyskujemy siłę wyrazu, ale tracimy precyzyjną kontrolę nad czasem włączenia genu, co było pierwotnym celem stosowania układów indukowalnych. Doktorantka wraz z współautorami przyznaje, że nadekspresja zarówno białka reporterowego, jak i titratora (TF) prowadzi do spadku ogólnej wydajności. W pracy brakuje głębszej analizy, jak zbalansować te dwa elementy, aby uniknąć przeciążenia komórki. Dalej w pracy wykazano, że sorbitol również może pełnić rolę induktora, co jest interesujące, ale komplikuje obraz specyficzności tego systemu. Ponadto autorzy uczciwie wskazują na artefakty fluorescencji przy wysokich stężeniach sorbitolu, co sugeruje, że systemy te wymagają bardzo ostrożnej kalibracji. Choć model współdziałania Euf1 i Adr1 jest bardzo prawdopodobny, w samej publikacji opiera się on w dużej mierze na analizie sekwencji i modelowaniu. Bezpośrednie dowody biochemiczne (np. ChIP-seq dla Adr1 w tych konkretnych warunkach lub testy EMSA) wzmocniłyby ten model.

Podsumowując, rozprawa mgr inż. Marii Gorczycy stanowi spójny, dojrzały naukowo i rzetelnie przygotowany materiał. Doktorantka wykazała umiejętność planowania skomplikowanych doświadczeń i krytycznej analizy danych. **Praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Rekomenduję ją jako wartościowy wkład w rozwój biologii.**

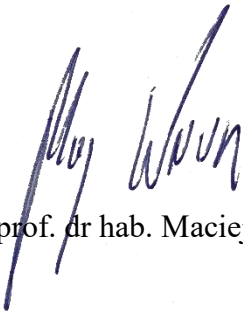
Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Marii Gorczycy spełnia warunki określone w art.187 ust. 1 i 2 Ustawie Prawo o szkolnictwo wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2023 r. poz. 742). Doktorantka dowiodła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. Stwierdzam także, że oceniana przeze mnie praca doktorska istotnie poszerza stan wiedzy w dyscyplinie biologia. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowa Dyscypliny Nauki biologiczne Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Marii Gorczycy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową otrzymanych przez Doktorantkę wyników o charakterze aplikacyjnym, posiadających bardzo duży potencjał komercyjny wnoszę do Rady

Naukowa Dyscypliny Nauki biologiczne Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 10/02/2026



prof. dr hab. Maciej Wnuk