



Dr hab. Justyna Ruchała, prof. UR
Doktor habilitowany w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych,
dyscyplinie nauki biologiczne
Profesor nadzwyczajny Uniwersytetu Rzeszowskiego

Rzeszów, 01/10/2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr inż. Pauliny Korpys-Woźniak

pt. „Intensyfikacja produkcji heterologicznych białek w komórkach niekonwencjonalnych drożdży *Yarrowia lipolytica* poprzez zastosowanie inżynierii molekularnych mechanizmów dojrzewania i sekrecji polipeptydów”.

Pani mgr inż. Paulina Korpys-Woźniak tytuł magistra inżyniera biotechnologii, uzyskała w dniu 19.06.2018 r. na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii (obecnie – Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii) Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Po uzyskaniu tytułu magistra inżyniera biotechnologii, Doktorantka podjęła pracę na stanowisku starszy referent techniczny w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Od tamtej pory była kierownikiem projektu Preludium finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz Diamentowego Grantu



finansowanego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki. Ponadto, była również wykonawcą projektu Iuventus Plus (MEiN).

Doktorantka nie ubiegała się wcześniej o nadanie stopnia doktora.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Korpys-Woźniak, została wykonana w Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu pod kierunkiem Pani dr hab. Eweliny Celińskiej, prof. uczelni z Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Wykonane w pracach badania finansowane były w ramach projektu badawczego *Diamantowy Grant VII* nr DI 2017 000947, finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (obecnie Ministerstwo Edukacji i Nauki). Kierownikiem projektu naukowego była Doktorantka.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy zbadania możliwości zwiększenia syntezy i dojrzewania heterologicznych białek przez komórki drożdży *Y. lipolytica*, a także zwiększenia przepustowości szlaków sekrecyjnych. W celu osiągnięcia powyższego, Doktorantka postawiła sobie ambitny cel poznania podstaw molekularnych działania wybranego białka sekrecyjnego poprzez całkowitą analizę transkryptomu modyfikowanych komórek drożdży *Y. lipolytica*.

Drożdże to świetna platforma ekspresyjna do produkcji białek rekombinowanych dla wielu zastosowań przemysłowych oraz medycznych. Coraz częściej podejmowane jest pytanie czy drożdże *Y. lipolytica* w dalszym ciągu powinniśmy uznawać za niekonwencjonalne, gdyż zaliczyć je można do jednych z najlepiej zbadanych drożdży niekonwencjonalnych, dla których dostępne jest wiele narzędzi molekularnych. Co więcej, coraz częściej i chętniej wykorzystywane są one w przemyśle. Z kolei produkcja rekombinowanych białek to kluczowy i znaczący obszar współczesnej biotechnologii. Wśród najbardziej obiecujących drożdżowych gospodarzy do produkcji białek rekombinowanych na dużą skalę wymienić można m. in. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffi*) i *Hansenula* (*Ogataea polymorpha*). Niemniej jednak, każdy z nich charakteryzuje się pewnymi ograniczeniami i zaletami. W dalszym jednak ciągu istnieje szereg nie w pełni poznanych mechanizmów, które ograniczają procesy produkcji, dojrzewania i sekrecji. Uważam, zatem, że tematyka przedłożonej mi do recenzji rozprawy doktorskiej jest wysoce aktualna i godna podjęcia.

Przedłożona mi do recenzji praca, to zbiór czterech oryginalnych artykułów. Wszystkie opublikowane zostały w czasopiśmie anglojęzycznych. Chciałabym podkreślić, że wartość merytoryczna publikacji jest bardzo wysoka.

Na całość pracy składa się 8 rozdziałów głównych, a także jako uzupełnienie wykaz skrótów stosowanych w pracy oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Następnie,



praca uzupełniona jest o oświadczenia współautorów publikacji naukowych, przedstawionych jako podstawa rozprawy doktorskiej, mówiące o ich udziale w przygotowywaniu poszczególnych prac. W dalszej części znajdują się teksty publikacji naukowych, wchodzących w skład cyklu wraz z suplementami – stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej.

We wszystkich publikacjach Pani mgr inż. Paulina Korpys-Woźniak jest pierwszym autorem. Zgodnie z przedłożonymi oświadczeniami, Pani mgr inż. Paulina Korpys-Woźniak swój wkład szacuje na 70 -75 %. W moim odczuciu, ciężko jest estymować procentowy udział każdego z autorów publikacji, stąd uważam, że opis wkładu autorów byłby wystarczający, gdyż pozwolił mi on na jednoznaczne stwierdzenie, że udział Doktorantki był znaczący w każdej z przedłożonych jako podstawa rozprawy doktorskiej publikacji.

Na trzon rozprawy doktorskiej składają się kolejno rozdziały: Wstęp, Hipotezy i cele badań, Materiały i metody, Wyniki, Wykaz analiz, Dyskusja, Podsumowanie oraz kluczowe wnioski. Całość opatrzone spisem piśmiennictwa i wykazami tabel oraz rycin.

Wprowadzając nas do tematyki podejmowanych przez siebie badań, Doktorantka porównuje znane drożdżowe systemy do ekspresji heterologicznych białek, podkreślając zalety drożdży *Y. lipolytica* w tej sferze badań. A także kolejno dogłębnie analizuje obecny stan wiedzy w tematyce syntezy i sekrecji polipeptydów przez drożdże na podłożu molekularnym, a następnie opisuje znane strategie eliminacji ograniczeń szlaku translacyjno-sekrecyjnego. Tak sformułowany **Wstęp** stanowi doskonałe wprowadzenie do tematyki podejmowanego problemu.

Kolejny rozdział to **Hipotezy i cele badań**. Doktoranta formułuje trzy hipotezy zerowe oraz dwa główne cele. Zarówno hipotezy, jak i cele zostały przedstawione w sposób jasny i odpowiadający tematowi pracy doktorskiej.

W rozdziale **Materiały i metody**, Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje skład podłoży mikrobiologicznych wykorzystywanych w swoich pracach, a także procedury konstruowania rekombinowanych szczepów oraz metody ich hodowli. Analizując bardzo szczegółowo napisany rozdział **Materiały i metody**, nasunęło mi się pytanie, czy po badaniu poprawności drożdżowych transformantów metodą colony PCR były one stabilizowane? Doktorantka pisze, że po ich weryfikacji były one bankowane w zamrażarce niskotemperaturowej. Czy transformanty pozyskiwane z kolekcji po ich rozmrożeniu i hodowli były ponownie weryfikowane metodą colony PCR czy innymi metodami, mogącymi potwierdzić ich genetyczną stabilność? Nie mniej jednak, na szczególne wyróżnienie zasługuje ogromny arsenał przeróżnych technik oraz analiz wykorzystywanych w pracy doktorskiej. Chciałabym tutaj podkreślić, iż recenzowana praca wykonana została na wysokim metodycznym poziomie,



wykorzystując często najnowsze metody badań, jak chociażby całogenomowa analiza transkryptomu kilku szczepów z nadprodukcją heterologicznych białek. Pozwoliło to na otrzymanie nowych, ciekawych wyników oraz kolejno na zidentyfikowanie nieznanego dotychczas mechanizmu regulacji sekrecji heterologicznych białek u *Y. lipolytica*. Myślę, że już na tym etapie Recenzent uświadamia sobie, jak tytaniczną pracę wykonała Doktorantka przygotowując niniejszą rozprawę doktorską – budzi to mój podziw i respekt.

W obszernym rozdziale **Dyskusja**, Doktorantka konfrontuje otrzymane przez siebie wyniki z dostępną literaturą przedmiotu. Rozdział ten jest wyczerpujący, Recenzent utwierdza się w przekonaniu, że Doktorantka wykazuje się dogłębną znajomości problematyki produkcji rekombinowanych białek na modelu drożdżowym. Na szczególną pochwałę zasługuje krytyczna analiza wyników badań własnych, oparta na adekwatnej literaturze przedmiotu oraz obecnym stanie wiedzy w tej tematyce.

Podsumowanie i wnioski pracy przytoczone są na stronach 106 - 109, odpowiadają one treści publikacji naukowych przedłożonych jako podstawa rozprawy doktorskiej.

Po zapoznaniu się z całą dokumentacją Recenzentowi nasunęło się jednak kilka sugestii i pytań.

Doktorantka opisała różnice w ekspresji (nadekspresji, represji) setek licznych genów u rekombinowanych superproducentów białek. Jednak analiza eksperymentalna jest bardzo ograniczona. Niestety nie przeprowadzono/nie zostało to ujęte w przedłożonej do oceny pracy tzw. genetyki zwrotnej (*reverse genetics*), która zawierałaby nadekspresję, ale i delecję odpowiednich genów. Myślę, że z dużym prawdopodobieństwem takie eksperymenty zaplanowane są/zostaną w przyszłości. W swojej pracy Doktorantka analizowała nadekspresję czterech obcych genów reporterowych, z których trzy zaopatrzone w peptydy sygnałowe w celu wydajnej sekrecji polipeptydów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (scSoA, scTIG, scYFP), a jeden, inYFP, stworzono jako wariant wewnątrzkomórkowej produkcji białka fluorescencyjnego. Kolejno Doktorantka przeprowadziła analizę transkrypcji wszystkich czterech producentów heterologicznych białek. Na podstawie całogenomowej analizy transkryptomu czterech nadproducentów, Doktorantka przytacza pewne hipotezy, mówiące, iż nadekspresja pewnych wspólnych genów jest niezbędna dla nadprodukcji białek heterologicznych. Zidentyfikowane ponadto geny, wykazują specyficzną podwyższoną ekspresję lub represję tylko dla konkretnego spośród czterech analizowanych nadproducentów. Jednak takie stwierdzenia w większości przypadków nie zostały potwierdzone eksperymentalnie z wykorzystaniem „odwrotnej genetyki”. Ponadto niezrozumiałe jest stwierdzenie Doktorantki (strona 107 rozprawy doktorskiej): „Innymi



słowy, sekrecja ma większy wpływ na liczbę DEGs niż właściwości biochemiczne syntetyzowanego r(s)-Prot". O jakich właściwościach biochemicznych pisze tutaj Doktorantka? Ponadto, czy w ogóle można porównywać liczbę (DEGs) z właściwościami (białek)?

W trakcie czytania całości rozprawy doktorskiej moją szczególną uwagę zwróciły dość często pojawiające się anglicyzmy, a także opisy wykorzystujące żargon laboratoryjny. Do najważniejszych zaliczyć można takie sformułowania jak: dosłowne tłumaczenie angielskiego „*briefly*” - „w skrócie” oraz inne: „stok glicerynowy”, „totalny RNA”, „wewnętrzne kalibratory”, „ko-nadekspresja”, „produkowały istotnie więcej reportera” i inne. Choć zupełnie nie wpływają one na wartość merytoryczną przygotowanej rozprawy doktorskiej, to wspominam o tym tylko dlatego, że warto dbać o czystość języka polskiego, pomimo faktu, że nie jest to proste zadanie dla naukowca głównie operującego literaturą anglojęzyczną. Ponadto, warto pamiętać, że w zapisie liczb w języku polskim tzw. separator dziesiętny to „przecinek”, a nie, jak to wykorzystywane jest w języku angielskim, „kropka”.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu chciałabym stwierdzić, że wszelkie moje uwagi nie wpływają zupełnie na poziom naukowy i merytoryczny przedłożonej mi do recenzji pracy doktorskiej.

Recenzowaną przeze mnie pracę doktorską mgr inż. Pauliny Korpys-Woźniak oceniam bardzo wysoko, została wykonana z należytą starannością oraz zachowaniem właściwej metodologii badań biologicznych. Pani mgr inż. Paulina Korpys-Woźniak udowodniła, że potrafi samodzielnie sformułować problem naukowy oraz zweryfikować go poprzez odpowiednio dobrane eksperymenty, których wyniki potrafi zinterpretować oraz poddać krytycznej dyskusji, a także sformułować wyważone i wynikające z wyników wnioski.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Pauliny Korpys-Woźniak pt. „Intensyfikacja produkcji heterologicznych białek w komórkach niekonwencjonalnych drożdży *Yarrowia lipolytica* poprzez zastosowanie inżynierii molekularnych mechanizmów dojrzewania i sekrecji polipeptydów” spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1-4 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Na tej podstawie wnoszę do wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne przy Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach UPP Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Ponadto, biorąc po uwagę wysoką wartość naukową wyników zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Korpys-Woźniak stosownym wyróżnieniem przyjętym w Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu.

Rzeszów, dn. 01.10.2023 r.

Dr hab. Justyna Ruchała