



Prof. UAM dr hab. Robert Nawrot
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii, Pracownia Wirusologii Molekularnej
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
e-mail: rnawrot@amu.edu.pl
tel. (61) 829-59-31

Poznań, dn. 07.10.2023 r.

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”
dla Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

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” została wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem Prof. UPP dr hab. Eweliny Celińskiej.

Praca dotyczy jednego z najważniejszych zagadnień współczesnej biotechnologii, jakim jest produkcja rekombinowanych białek (oznaczonych w pracy skrótem „r-ProtS”) i jej optymalizacja, zarówno w badaniach podstawowych, jak i stanowiąc dużą gałąź dochodowego przemysłu biotechnologicznego na świecie. Praca w szczególności zwraca uwagę na problem przeciążenia mechanizmów komórkowych i indukcji silnego stresu w komórce pod wpływem zwiększonej produkcji białek sekrecyjnych (rs-ProtS), czego konsekwencją może być utrata docelowego białka. Dlatego Autorka postanowiła zbadać mechanizmy działania szlaku translacyjno-sekrecyjnego w komórkach wybranego gatunku drożdży *Y. lipolytica* przy użyciu globalnych narzędzi „omicznych”. W tym celu hodowle produkujące rekombinowane sekrecyjne białka prowadziła w stanie ustalonym, poddając je globalnym analizom transkryptomycznym, dającym wgląd w procesy biologiczne zachodzące w komórkach. Na ich podstawie Autorka wskazała geny, które posłużyły jako czynniki wspomagające dla wspólnej produkcji („ko-nadekspresji”) białek rekombinowanych rs-ProtS z białkami reporterowymi. Dodatkowo analizowała wpływ wspólnej produkcji kluczowego czynnika transkrypcyjnego Hac1 inicjującego reakcję komórki na nieprawidłowo sfałdowane białka (odpowiedź UPR).



Uzyskane wyniki pozwoliły na wgląd w wiele procesów biologicznych przebiegających w komórkach *Y. lipolytica* produkujących obce białka. Autorka wykazała także, że wspólna produkcja natywnego *HAC1* usprawnia sekrecję białek rekombinowanych rs-Protos i wpływa na wiele szlaków metabolicznych w komórce. Dlatego wyniki przedstawione w pracy pozwalają na głębsze spojrzenie w procesy biologii syntezy i sekrecji białek rekombinowanych w komórkach drożdżowych, pozwalając na zintensyfikowanie tej produkcji dzięki opracowanej strategii ich modyfikacji genetycznych.

Praca doktorska mgr. inż. Pauliny Korpys-Woźniak została przygotowana w postaci zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie czterech artykułów naukowych wraz ze 136-stronicową dysertacją, która wyniki te omawia i podsumowuje. Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Korpys-Woźniak zostały opublikowane w latach 2020 – 2023, w międzynarodowych czasopismach recenzowanych. Jak podaje Doktorantka były to:

- *Applied Microbiology and Biotechnology* (1 artykuł) - 5-letni IF 5.365, 100 pkt. MEiN,
- *Biotechnology Reports* (3 artykuły) – 5-letni IF 5.557, 100 pkt. MEiN.

Wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są wieloautorskie (od dwóch do czterech współautorów). We wszystkich tych pracach mgr inż. Paulina Korpys-Woźniak jest pierwszym autorem, co jednoznacznie wskazuje na Jej wiodącą rolę w opisanych badaniach. Do rozprawy dołączono oświadczenia Doktorantki i współautorów publikacji tworzących rozprawę, w których szczegółowo wyjaśniono, w formie tabelarycznej, na czym polegał ich udział w danej pracy. Swoją udział w publikacjach Doktorantka określiła na 70% (3 prace) i 75% (1 praca). Załączone oświadczenia wskazują wiodący udział Doktorantki we wszystkich pracach składających się na rozprawę doktorską, począwszy od wykonania większości prac laboratoryjnych, zebranie i przygotowanie danych do analiz statystycznych, po opracowanie wyników i spisanie ich w formie manuskryptów.

Pierwsza praca wchodząca w skład osiągnięcia naukowego (praca nr P.1, opublikowana w 2020 roku) pt. „*Impact of overproduced heterologous proteins characteristics on physiological response in Yarrowia lipolytica steady-state maintained continuous cultures*” w *Applied Microbiology and Biotechnology*, autorstwa Korpys-Woźniak P., Kubiak P., Białas W., Celińska E., dotyczy wykorzystania komórek drożdży *Yarrowia lipolytica* utrzymywanych w stanie ustalonym w celu zbadania wpływu różnych heterologicznych białek na zachowanie fizjologiczne komórek gospodarza. W kolejnej pracy (praca nr P.2, opublikowana w 2021 roku), pt. „*Global transcriptome profiling reveals genes responding to overproduction of a small secretory, a high cysteine- and a high glycosylation-bearing protein in Yarrowia lipolytica*” autorstwa Korpys-Woźniak P., Celińska E., opublikowanej w *Biotechnology Reports*, Doktorantka korzystając z hodowli w stanie ustalonym i transkryptomiki, zbadała odpowiedź komórek *Yarrowia lipolytica* na wyzwanie związane z wysokim poziomem ekspresji genów kodujących białka o znacząco różnych właściwościach biochemicznych. Trzecia z omawianych prac eksperymentalnych (praca nr P.3., opublikowana w roku 2021 w *Biotechnology Reports*), pt. „*Secretory helpers for enhanced production of heterologous proteins in Yarrowia lipolytica*”, autorstwa Korpys-Woźniak P., Kubiak P., Celińska E., obejmuje badanie dwunastu SH (genów pomocniczych), funkcjonalnie obejmujących szlaki transkrypcji, translacji, translokacji, fałdowania, dojrzewania i wydzielania w komórce z genem reporterowym i różnych



warunkach temperaturowych. W ostatniej pracy cyklu (praca nr P.4., opublikowana w 2023 roku w *Biotechnology Reports*), pt. „*Molecular background of HAC1-driven improvement in the secretion of recombinant protein in Yarrowia lipolytica based on comparative transcriptomics*”, autorstwa Korpys-Woźniak P., Celińska E., przy użyciu porównawczej analizy transkryptomów zbadano mechanizmy molekularne, dzięki którym wspólna produkcja *HAC1* poprawia sekrecję rekombinowanego białka (r-Prot) w *Yarrowia lipolytica* ponad dwukrotnie.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Korpys-Woźniak ma typowy układ, składając się z rozdziałów zatytułowanych: Wstęp, Hipotezy i cele badań, Materiały i metody, Wyniki, Wykaz analiz, Dyskusja, Podsumowanie i kluczowe wnioski, Literatura, Wykaz Tabel, Wykaz Rycin. Przed wstępem Autorka zamieściła wykaz artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, informację o źródle finansowania badań, 3-stronicowy wykaz skrótów stosowanych w pracy, streszczenia pracy w języku polskim i angielskim oraz spis treści. Całość dysertacji liczy 136 stron, zawiera 188 pozycji piśmiennictwa, 5 tabel i 19 rycin. Ponadto, poza pozycjami dysertacji ujętymi w spisie treści Autorka dołączyła 6-stronicowy opis dorobku naukowego, 4 oświadczenia dotyczące wkładu poszczególnych autorów w przygotowanie publikacji stanowiących rozprawę, a także reprinty tych 4 publikacji wraz z towarzyszącymi im materiałami uzupełniającymi (*supplementary materials*). Dlatego całość rozprawy wraz z materiałami dodatkowymi stanowi bardzo obszerne opracowanie liczące łącznie aż 259 stron.

W krótkim, 11-stronicowym **Wstępie** Doktorantka zaznaczyła korzyści ze stosowania drożdżowych systemów ekspresyjnych do produkcji rekombinowanych białek. Następnie szczegółowo opisała szlak wydzielniczy *Y. lipolytica* wraz z mechanizmami pozwalającymi na wychwycenie białek nieprawidłowo sfałdowanych w procesie UPR (*unfolded protein response*), w którym ważną rolę pełni białko Sls1. Wstęp zamyka interesujące ujęcie zalet hodowli chemostatycznych komórek w stanie ustalonym, w którym komórki utrzymywane są w ustalonej fazie ich wzrostu ze stałym stężeniem wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych cząsteczek wytwarzanych lub metabolizowanych przez komórki w hodowli. Pozwala to na wykorzystanie takich jednorodnych hodowli do szerokiej gamy różnych badań, gdzie ważne jest utrzymanie badanych komórek w pewnym określonym stanie fizjologicznym przez dłuższy czas, w tym do skomplikowanych i wieloskładnikowych badań „-omicznych”.

Autorka sformułowała 3 hipotezy badawcze oraz wskazała dwa cele badań: „Zwiększenie możliwości komórek drożdży *Y. lipolytica* w zakresie syntezy i prawidłowego dojrzewania polipeptydów, jak również przepustowości szlaku sekrecyjnego (...)” oraz „Poznanie molekularnych podstaw promującego wpływu działania wybranego SH na podstawie globalnej analizy transkryptomu zmodyfikowanych komórek *Y. lipolytica* w warunkach jego ko-nadekspresji wraz z rs-Prot, na przykładzie czynnika transkrypcyjnego Hac1”. **Cel pracy** jest zatem złożony i zależny od wielu czynników, ale ciekawy i jasno sformułowany. Wyjaśnienie mechanizmów rządzących szlakiem translacyjno-sekrecyjnym u drożdży w warunkach syntezy białek rekombinowanych o różnych właściwościach biochemicznych pozwoli na możliwe szerokie wykorzystanie tej wiedzy w celu poprawy wydajności tej produkcji.

W kolejnym rozdziale, na 19 stronach, Doktorantka opisuje **Materiały i metody** wykorzystane w pracy. Do produkcji wytypowane zostały trzy białka rekombinowane (r-Prot) służące jako białka reporterowe: YFP (*yellow fluorescent protein*), SoA (α -amylaza z wołka ryżowego *Sitophilus oryzae*) i TIG (glukoamylaza z termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus*). Do badań wykorzystano odpowiednie wektory oraz szczepy bakteryjne *E. coli* JM109 i drożdżowe *Y. lipolytica* skonstruowane w podłożu genetycznym szczepu Polg i Polh.

Doktorantka korzystała w pracy z szerokiego zestawu technik hodowlanych, w tym hodowli okresowych i hodowli ciągłych w warunkach chemostatu, metod analitycznych, proteomicznych, transkryptomocnych, bioinformatycznych, biologii molekularnej oraz metod przetwarzania danych RNAseq, narzędzi bioinformatycznych i baz danych. Nie mam zastrzeżeń co do stosowanych w pracy metod, są bardzo szczegółowo opisane, nowoczesne i właściwie użyte. Poprawność metodologii została także oceniona przez niezależnych recenzentów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie na dużą skalę danych z sekwencjonowania RNAseq analizowanych hodowli wraz z wymagającymi analizami transkryptomów.

W tym miejscu mam pytanie do Doktorantki dotyczące użycia homogenizatora Mixer Mill MM400 w celu izolacji RNA z biomasy w trakcie hodowli – czy rozważane były inne metody homogenizacji? Czy użyta metoda nie powodowała strat w izolowanym materiale?

Doktorantka przedstawiła **Wyniki** zebrane w najobszerniejszym rozdziale pracy, na 41 stronach. Rozdział ten podzielony jest na 4 podrozdziały, w których w usystematyzowany sposób Autorka przedstawia kolejno charakterystykę szczepów *Y. lipolytica* z nadekspresją sekrecyjnych białek rekombinowanych (r(s)-Prots) w warunkach chemostatu, globalną analizę transkryptomu rekombinowanych szczepów *Y. lipolytica* - pochodnych szczepu Polh, hodowle okresowe rekombinowanych szczepów *Y. lipolytica* z konadekspresją rs-YFP i SH (genów pomocniczych – *Secretory Helpers*) oraz transkryptomoczną analizę porównawczą rekombinowanego szczepu *Y. lipolytica* z ko-nadekspresją *HAC1* i *scYFP*.

Autorka rozpoczęła przedstawienie wyników od analiz dotyczących produkcji r(s)-Prots (scSoA, scTIG, scYFP i inYFP) w ciągłych hodowlach bioreaktorowych. Porównywano szczepy *Y. lipolytica* skonstruowane w podłożu genetycznym Polg oraz Polh. Wyniki wykazały, iż w każdym parametrze i dla wszystkich badanych białek reporterowych, pochodne Polh okazały się być lepszymi gospodarzami dla produkcji r(s)-Prots w porównaniu z Polg.

Kolejnym etapem była globalna porównawcza analiza transkryptomów badanych szczepów *Y. lipolytica* przeprowadzona w dwóch „trybach”: nieukierunkowanym – prowadzącym do pozyskania nowej wiedzy na temat innych procesów komórkowych, istotnych dla produkcji r(s)-Prots oraz ukierunkowanym na analizę genów zaangażowanych w szlak translacyjno-sekrecyjny. Dzięki temu uzyskano eksperymentalny zestaw czterech rekombinowanych szczepów *Y. lipolytica*, pochodnych Polh, o zróżnicowanym poziomie ekspresji genów, wydajności syntezy rekombinowanego białka i innych cechach. Bardzo szczegółowo określono w badaniach cechy i właściwości poszczególnych eksperymentalnych rekombinowanych szczepów za pomocą analiz nieukierunkowanych ich transkryptomów. Ciekawym spostrzeżeniem tej części pracy jest fakt, iż biorąc pod uwagę wzrost wszystkich szczepów w tych samych warunkach, prawdopodobnie ich morfotyp był zależny od wprowadzonej zmiennej, czyli typu syntezy białka rekombinowanego i związanej z tym odpowiedzi komórki.

W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na Rycinę 8 przedstawiającą indukowane i represjonowane wspólne lub unikalne geny/zestawy genów (DEGs) dla poszczególnych szczepów *Y. lipolytica* w odpowiedzi na nadprodukcję r(s) – Prots. Rycina składa się z 3 paneli oznaczonych jako „a”, „b” i „c”, jednak brakuje ich opisu w legendzie ryciny, brak też odniesienia do materiałów uzupełniających, co znacznie utrudnia odniesienie się do uzyskanych wyników.

Wyniki z hodowli okresowych rekombinowanych szczepów *Y. lipolytica* z konadekspresją rs-YFP i SH (genów pomocniczych) w różnych warunkach temperaturowych wykazały, że w większości analizowanych wariantów do podwyższenia poziomu exYFP wymagane było jednoczesne działanie obniżonej temperatury i nadekspresji SH. Wykazano, że dla połowy badanych genów pomocniczych obniżona temperatura przyczynia się do wzrostu potencjału wydzielniczego sp_exYFP w sposób istotny ($p < 0.05$). Natomiast analiza procesów biologicznych o szczególnym znaczeniu dla produkcji wydzielniczych białek rekombinowanych pozwoliła na przedstawienie trzech głównych procesów biologicznych, które przyczyniają się do kształtowania fenotypu Hac1-zależnego. Są nimi szybkość syntezy białek rekombinowanych, degradacja białek oraz transport pęcherzykowy przez szlak wydzielniczy.

Przeprowadzona na 19 stronach **Dyskusja** jest dojrzała, wyjaśnia wiele aspektów, które mogły być niejasne po przeczytaniu samych wyników. Na stronach dyskusji Autorka podsumowuje otrzymane wyniki, omawia je, konfrontując je także z danymi literaturowymi, co jest wykonane warsztatowo sprawnie i ciekawie.

Mam tutaj jednak pewne uwagi. Autorka na podstawie globalnych wyników analiz transkryptomicznych próbuje wyciągać wnioski o pewnym kierunku zmian w procesach metabolicznych komórek drożdżowych. Jednakże należy pamiętać, że globalne dane uzyskiwane z technik "omicznych", jakkolwiek niezwykle bogate w wiele informacji, często są bardzo trudne do interpretacji i pozwalają w wielu przypadkach tylko na pewne ogólne rozeznanie w kierunku zmian zachodzących w komórce. Niestety w wielu wypadkach uzyskane wyniki mogą być zaskakujące, właśnie dlatego, że operują na ogromnym zbiorze danych, które trudno zinterpretować i znaleźć jednoznaczne reguły nimi rządzące.

I tak na przykład na str. 95 Autorka pisze: *„Szczególnie zaskakująca obserwacja dotyczyła zwiększonej proteolizy w szczepie scYFP. Biologiczny sens zwiększenia całkowitej aktywności proteolitycznej przy intensywnej syntezie r(s)-Prots wydaje się zrozumiały i najprawdopodobniej jest związany z globalnie zwiększonym metabolizmem białek. Jednakże takie wyjaśnienie nie odpowiada ogólnemu profilowi danych transkryptomicznych, z których jasno wynika, że proteoliza była hamowana w scYFP. Szczegółowa analiza DEGs wykazała, że wiele genów o obniżonym poziomie ekspresji przypisanych do funkcjonalnej kategorii „proteoliza” to VPS, czynniki pośredniczące w ubikwitynacji i związane z autofagią, które nie posiadają aktywności proteolitycznej per se, co z kolei podlegało analizie w teście enzymatycznym.”*

Lub też: na str. 99 *„(...) w odpowiedzi na intensywną syntezę różnych rs-Prots w Y. lipolytica, (P.2 i P.4) zaobserwowano aktywację procesów biologicznych, jak: „organizacja ściany komórkowej” i „restrukturyzacja”. (...) Z drugiej strony, wprowadzona modyfikacja (ko-nadekspresja CWP11 i SCYFP) w sposób umiarkowany wpłynęła na nadprodukcję scYFP w porównaniu z innymi testowanymi SHs (P.3). Zatem, wydaje się być wysoce pożądane dalsze wyjaśnienie mechanizmu, za*



pomocą którego białka ściany komórkowej promują lub ograniczają wydzielanie rs-Prots u Y. lipolytica.”

Fragmety te zwracają uwagę na fakt widoczny też w wielu innych miejscach pracy, iż Autorka opierała wiele wniosków pracy na podstawie porównania globalnych różnic pomiędzy kategoriami funkcjonalnymi genów uzyskanych z analiz transkryptomicznych. Podejście takie jest słuszne i pozwala na uzyskanie wielu ciekawych obserwacji, ale należy pamiętać, iż kategorie funkcjonalne genów i białek stanowią tylko pewne przybliżenie. Wiele z domniemych funkcji przypisanych jest na podstawie podobieństw do innych podobnych genów i może być niepełna. Dlatego wyciąganie na ich podstawie wniosków co do funkcji genów/białek powinno służyć tylko do pewnych generalizacji, ale niekoniecznie do wyciągania ostatecznych wniosków. Nie sugeruję tym samym, iż Autorka to zrobiła, gdyż była dość ostrożna we wszelkich wnioskowanych, zwracam tylko uwagę na problem związany z tego typu analizami.

Po dyskusji następuje 4-stronicowe przedstawienie **Podsumowania i kluczowych wniosków** w 13 rozbudowanych punktach, z których pierwszy i drugi składają się także z podpunktów. Autorka wymieniła najważniejsze aspekty i wyniki pracy, przedstawione wnioski są jednoznacznie sformułowane. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na jeden element, który mógłby polepszyć odbiór pracy. Autorka mogłaby się pokusić o przedstawienie wniosków końcowych, ostatecznie podsumowujących najważniejsze aspekty pracy w kilku zdaniach. Aktualnie tylko kilka z przedstawionych kluczowych wniosków można uznać za najważniejsze, podsumowujące ogrom wysiłku i pracy włożonej w wykonanie i analizę wyników badań, a w niektórych pojawiają się nawet elementy dyskusji.

W rozdziale **Literatura** przedstawionych jest 188 przypisów na 21 stronach, przedstawiających bogatą literaturę przedmiotu na temat drożdżowych systemów ekspresyjnych, genomiki, transkryptomiki, w większości z ostatnich kilkunastu lat. Spis literatury i jej cytowanie wykonane jest w pracy wzorowo. Do każdej pozycji oprócz pełnej informacji bibliograficznej dołączony jest link z numerem doi, co pozwala natychmiast znaleźć wybraną publikację z wersji elektronicznej.

Dysertacja doktorska Pani mgr inż. Korpys-Woźniak napisana jest prawidłowo i bardzo precyzyjnie, nie zawiera także wielu błędów. Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić jednak uwagę na pewne kwestie językowe, które mogą utrudniać jej odbiór. Otóż, Autorka używa w pracy wielu słów i zwrotów pochodzących z żargonu laboratoryjnego i języka angielskiego. Poniżej wymienię kilka przykładów:

- str. 12, str. 60 - „nadprodukujące”,
- str. 60 – „ko-nadekspresją”,
- str. 78 – „komórek nadekspresjonujących HAC1 i SCYFP”, „jaka frakcja transkryptu nadekspresjonowanego HAC1”,
- str. 51 "znaczną przewagę liczby genów różnicowo ekspresjonowanych (DEGs)" - powinno być "znaczną przewagę liczby genów ulegających różnicowej ekspresji (DEGs); także str. 52, podpis pod Ryc. 5,

- str. 93 – „ekspresjonujących GFP”,
- str. 98 – „spośród szczepów nadekspresjonujących badane SHs”,
- s.105 – „Interesująco, jedną z funkcji Trl1...” – nieprawidłowa „kalka” z języka angielskiego.

W powyższych przykładach pojawia się słowo „nadekspresja”, które sugeruje się zastąpić słowem „produkcja” lub „synteza”, albo po prostu „ekspresja” bez przedrostka „nad”, jednak nie jest już uważane w świecie naukowym za jednoznacznie błędne. Jednak słowa „ekspresjonujące”, „ekspresjonowane”, czy też „nadekspresjonujące” są już jednoznacznie niepoprawnymi formami językowymi. Także użycie przedrostka „nad” w dodatku do słowa „produkcja” wydaje się być niepotrzebną formą językową. Można ją zastąpić np. sformułowaniem „zwiększona produkcja”.

Ponadto, omawiając kwestie językowe zwraca uwagę w pracy bardzo rozbudowane użycie skrótowców. Nie jest to błędne, gdyż wszystkie skróty są poprawnie wyjaśnione i zebrane w wykazie skrótów stosowanych w pracy. Jednak w wielu przypadkach, np. podając nazwę procesów fizjologicznych zachodzących w komórkach, użycie pełnej nazwy procesu, zamiast skrótu mogłoby ułatwić odbiór tekstu. W przedstawionej postaci praca jest bardzo dobra, jednak przez rozbudowane użycie skrótów stosunkowo trudna w odbiorze i przez to hermetyczna. Za przykład może posłużyć fragment ze str. 103 "indukcja HAC1 w szczepie inYFP nie była odosobnionym zjawiskiem spowodowanym nadmierną syntezą inYFP, ale rzeczywiście towarzyszyło jej wiele innych zjawisk (DEGs) typowych dla UPR.”

Doktorantka nie ustrzegła się niestety w pracy innych drobnych błędów - stylistycznych i interpunkcyjnych. Nie ma ich w pracy dużo, zatem wymienię te, które zauważyłem, aby zwrócić uwagę na możliwe uniknięcie tego typu błędów w przyszłości:

- str. 17, jest: „Wiedza na temat mechanizmów związanych z fałdowaniem, dojrzewaniem i sekrecją polipeptydów w komórkach *Y. lipolytica* było możliwe...”, powinno być: „Wiedza na temat mechanizmów związanych z fałdowaniem, dojrzewaniem i sekrecją polipeptydów w komórkach *Y. lipolytica* była możliwa...”,
- str. 17, jest: „Procesy zachodzące w szlaku sekrecyjny obejmują”, powinno być: „Procesy zachodzące w szlaku sekrecyjnym obejmują”,
- str. 29, tabela 1, jest: „masa molekularna”, powinno być: „masa cząsteczkowa”,
- str. 31, jest: „wklonowano w wektor”, powinno być: „wklonowano do wektora”,
- str. 55, jest: „glioksylazy”, powinno być „glioksalazy”,
- str. 55, jest: „fosfoacetylkoglucozaminy”, powinno być: „fosfoacetyloglucozaminy”,
- str. 55, jest: „N-acetylotransferazę”, powinno być: „N-acetylotransferazę”,
- str. 95, jest: „zidentyfikowano ATG8 który, bierze udział w procesie autofagii”, powinno być: „zidentyfikowano ATG8, który bierze udział w procesie autofagii”,
- str. 102, jest: „w stosunku szczepu kontrolnego”, powinno być: „w stosunku do szczepu kontrolnego”.



Przedstawione powyżej krytyczne uwagi i spostrzeżenia nie wpływają na końcową wysoką ocenę pracy, która ze względu na dużą wartość poznawczą przedstawionych wyników i możliwość ich praktycznego wykorzystania zasługuje na wyróżnienie. Przedstawiona praca doktorska świadczy o tym, że Pani mgr inż. Paulina Korpys-Woźniak niezwykle sprawnie porusza się w wykorzystaniu szerokiej gamy technik hodowlanych, analitycznych, biologii molekularnej, proteomicznych, transkryptomicznych, czy analiz bioinformatycznych, a także posiada ogromną wiedzę i umiejętność samodzielnego planowania i krytycznej analizy wyników badań, co jest świetnym prognostykiem dla dalszej pracy naukowej.

Na stronach 137-142 rozprawy Doktorantka przedstawiła swój dorobek naukowy, który jest bardzo bogaty. Poza przedstawionymi 4 pracami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej, legitymuje się 8 innymi publikacjami w międzynarodowych czasopismach punktowanych, z 80-100 pkt. MEiN. Dodatkowo jest autorką 22 doniesień konferencyjnych na konferencjach krajowych i zagranicznych w formie posteru lub też prezentacji ustnej, a także 2 monografii pokonferencyjnych. Na wyróżnienie zasługuje również fakt kierowania przez nią dwoma projektami badawczymi: Diamentowym Gratem oraz NCN Preludium, które są jeszcze w trakcie realizacji. Według informacji na str. 5 pracy, wspomniany Diamentowy Grant był źródłem finansowania przedstawionych w pracy badań. Doktorantka pełniła także rolę wykonawcy w projekcie MNiSW Juventus Plus, a także wolontariusza w projekcie NCN Opus. Ponadto Pani mgr Korpys-Woźniak odbyła 3-miesięczny staż naukowy w ramach programu stażowego dla studentów Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w 2018 roku w Institut National de la Recherche Agronomique we Francji, pod kierunkiem Prof. Jean-Marca Nicaud.

Jak dotąd, większość badań z udziałem drożdży *Y. lipolytica* utrzymywanych w chemostacie koncentrowała się na wytwarzaniu metabolitów o niskiej masie cząsteczkowej. Autorka natomiast pokusiła się o wykorzystanie tych hodowli do wielkoskalowych badań „-omicznych”, które pozwalają na uzyskanie znacznie większej ilości cennych danych, pozwalających wyciągać różnorodne wnioski. Na stronach 88-89 rozprawy przedstawiony jest wykaz analiz przeprowadzonych przez Doktorantkę. Wynika z niego, iż pełniła Ona główną rolę we wszystkich prowadzonych eksperymentach, od przygotowania zestawu rekombinowanych szczepów *Y. lipolytica*, przez prowadzenie ciągłych hodowli bioreaktorowych, po wykonanie większości oznaczeń i analiz. Część prac została zlecona (np. sekwencjonowanie RNA) lub wykonana przez współautorów prac (analizy statystyczne).

Zakres i skala przeprowadzonych w pracy analiz znacznie wykracza poza typową pracę doktorską. Chciałbym w tym miejscu bardzo pogratulować Doktorantce za podjęcie się tak interesującego tematu i za niekonwencjonalne podejście w jego realizacji. Pomimo wielu trudności został zrealizowany wieloaspektowy projekt, który przyczynił się do rozwoju naszej wiedzy na temat drożdżowych systemów ekspresyjnych i zwiększenia ich wydajności i skuteczności.

Podsumowując, głównym osiągnięciem Pani mgr Pauliny Korpys-Woźniak przedstawionym w recenzowanej pracy doktorskiej jest lepsze poznanie biologii syntezy i sekrecji wydzielniczych białek rekombinowanych w komórkach *Y. lipolytica*. Doktorantka opracowała bardzo wydajną kombinację modyfikacji genetycznej (wspólnej produkcji SSA5, SSA8, RPL3) wraz z optymalnymi warunkami środowiskowymi (temperatura hodowli wynosząca 25 °C), które zastosowane razem



przyczyniają się do dużego zwiększenia produkcji rekombinowanych białek wydzielniczych (rs-Prot) w komórkach drożdży *Y. lipolytica*. Dlatego wyniki przedstawione w pracy pozwalają na głębsze spojrzenie w procesy biologii syntezy i sekrecji białek rekombinowanych w komórkach drożdżowych, pozwalając na zintensyfikowanie tej produkcji, co może być wykorzystane na szerszą skalę w praktyce biotechnologicznej i przemysłowej.

Oświadczam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Pauliny Korpys-Woźniak spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668; tekst jednolity Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Pauliny Korpys-Woźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na dużą wartość poznawczą przedstawionych wyników, skalę przeprowadzonych analiz i możliwość ich praktycznego wykorzystania uważam, iż praca Pani Pauliny Korpys-Woźniak zasługuje na wyróżnienie, co obszernie uzasadniłem powyżej.

Robert Nawrot

Poznań, 7.10.2023r.