



Wrocław, 26.09.2023 r.

Prof. dr hab. inż. Zbigniew Lazar

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Pauliny Korpys-Woźniak

wykonanej
w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
Pod kierunkiem dr hab. Eweliny Celińskiej, prof. UPP

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Nauki biologiczne Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

1. Podstawowe dane o kandydatce

Pani mgr inż. Paulina Korpys-Woźniak tytuł magistra inżyniera uzyskała 19.06.2018 r. na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii (obecnie – Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii) Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Jej praca dotyczyła wykorzystania technologii klonowania modularnego do konstrukcji złożonych kaset ekspresyjnych dedykowanych dla *Yarrowia lipolytica*. Prace eksperymentalne w tym zakresie Doktorantka realizowana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, pod kierunkiem dr hab. Eweliny Celińskiej, Prof. Uczelni.

Przebieg pracy naukowo-zawodowej doktorantki jest dość znaczący i obejmuje:

- ✓ Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu – **starszy referent techniczny** (10.2021 – obecnie),
- ✓ Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Realizacja projektu **Preludium-21** NCN nr 2022/45/N/NZ9/00017: „Inżynieria szlaku sekrecyjnego u *Yarrowia lipolytica* projektowana na podstawie wyników badań omicznych dla usprawnienia produkcji białek sekrecyjnych - charakterystyka funkcjonalna nowych genów” - **kierownik projektu** (06.2023-06.2026),
- ✓ Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Realizacja projektu MNiSW (MEiN) **Diamantowy Grant VII**, Nr DI2017000947, pt. „Intensyfikacja produkcji heterologicznych białek w komórkach niekonwencjonalnych drożdży *Yarrowia lipolytica* poprzez zastosowanie molekularnych



- mechanizmów dojrzewania i sekrecji polipeptydów” - **kierownik projektu** (09.2018-02.2024),
- ✓ Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Realizacja projektu MNiSW (MEiN) **Iuventus Plus V**, Nr IP2015011074, pt. „Produkcja heterologicznych enzymów amylolitycznych w rekombinowanych komórkach drożdży i ich aplikacja w procesach biotechnologicznych” - **wykonawca projektu** (08.2018 oraz 06.2017),
 - ✓ INRA, MICALIS (Institut National de la Recherche Agronomique) Jouy-en-Josas, Francja. **Staż zagraniczny** realizowany w ramach projektu stażowego dla studentów Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii pt. „Studiujesz-Praktykuj” – projektu współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego i Programu Operacyjnego – Wiedza, Edukacja, Rozwój – **stażystka** (01.2018-03.2018),
 - ✓ Zakład Wirusologii i Bakteriologii, Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu. Udział w projekcie NCN **OPUS** Nr 2015/17/B/NZ8/02407 pt. „Dynamika ewolucyjnego wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (Tomato black ring virus) i jego adaptacja do różnych gospodarzy” – **stażystka** (12.2014-12.2016),
 - ✓ Laboratorium Analiz Mikrobiologicznych WESSLING Polska Sp. z o.o. w Poznaniu – **praktykantka** (10.2016-12.2016),
 - ✓ Dział Laboratorium Badania Wody i Ścieków „WODKAN” w Ostrowie Wielkopolskim – **praktykantka** (09.2015).

Warto podkreślić, że jeszcze przed obroną pracy magisterskiej Doktorantka udzielała się w różnych jednostkach i zdobywała doświadczenie zawodowe. Przebieg pracy obejmuje również trzymiesięczny staż zagraniczny, który w opinii recenzenta jest bardzo istotnym punktem w życiorysie zawodowym Doktorantki.

Doktorantka nie ubiegała się wcześniej o nadanie stopnia doktora.

2. Charakterystyka formalna rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa 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” jest oparta na zestawie czterech prac opublikowanych w latach 2020-2023. Doktorantka jest pierwszą autorką we wszystkich pracach wchodzących w skład dzieła, a Jej zadeklarowany udział procentowy w publikacjach wynosi pomiędzy 70% a 75%. Sumaryczny współczynnik IF (2-letni) publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 20,506, a liczba punktów ministerialnych to 400. Trzy prace opublikowane zostały w czasopiśmie *Biotechnology reports* a jedna praca w *Applied microbiology and Biotechnology*. W opinii recenzenta, czasopisma te są znaczącymi periodykami naukowymi w dyscyplinie nauki biologiczne.



Rozprawa doktorska skonstruowana została w klasyczny sposób, a wspomniane powyżej publikacje i ich omówienie stanowią zasadniczą część zaprezentowanej pracy. Pracę podzielono na typowe rozdziały, jak: streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, hipotezy i cele badań, materiały i metody, wyniki, wykaz analiz, dyskusja, podsumowanie i kluczowe wnioski jak również spis cytowanej literatury oraz wykaz tabel i rycin. Za duży plus uznaję dołączenie do pracy wykazu analiz z podziałem na wykonane przez Doktorantkę jak i inne osoby biorące udział w prowadzonych badaniach. Do pracy dołączona jest również dokumentacja związana z dorobkiem naukowym Doktorantki oraz oświadczenia współautorów prac, z których jasno wynika, że udział Pani Pauliny Korpys-Woźniak w powstaniu artykułów będących podstawą rozprawy doktorskiej jest znaczący i nie budzi wątpliwości, że jest ona autorem wiodącym. Podsumowując, można uznać przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską za autorskie dzieło Pani mgr inż. Pauliny Korpys-Woźniak.

Chciałbym tutaj zwrócić uwagę na fakt, że w pracy występują literówki czy, prawdopodobnie poprawione przez słownik, błędne nazwy enzymów, jak np. mutaza fosfoacetylkoglucozamiiny czy N-acetylkotransferaza (str. 55), jak również szereg potocznych określeń laboratoryjnych czy spolszczonych zapożyczeń z języka angielskiego (np. stek glicerolowy, splicingowany transkrypt *HAC1*, itp.), jednakże w żaden sposób nie umniejszają one bardzo wysokiego poziomu merytorycznego przedstawionej mi do oceny pracy.

3. Charakterystyka merytoryczna rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska stanowi spójne dzieło złożone z czterech powiązanych prac skupionych na temacie mechanizmów funkcjonowania szlaku translacyjno-sekrecyjnego w komórkach drożdży *Y. lipolytica*. Autorka postawiła sobie trzy hipotezy badawcze:

- 1: Zjawiska molekularne wywołane w komórkach *Y. lipolytica* nadprodukcujących rs-Prot zależą od właściwości biochemicznych danego rs-Prot;
- 2: Geny deregulowane pod wpływem nadprodukcji rs-Prot mogą być stosowane jako geny pomocnicze (SHs; Secretion Helpers), korzystnie wpływające na syntezę i sekrecję rs-Prot w drożdżach *Y. lipolytica*;
- 3: Działanie poszczególnych genów pomocniczych SH jest modulowane przez warunki środowiskowe zastosowane w trakcie hodowli produkcyjnej, na przykład temperatury.

Aby zweryfikować postawione przez siebie hipotezy badawcze, w pracy sformułowano dwa główne cele podzielone na cele szczegółowe:

1. Zwiększenie możliwości komórek drożdży *Y. lipolytica* w zakresie syntezy i prawidłowego dojrzewania polipeptydów, jak również przepustowości szlaku sekrecyjnego poprzez:
 - wskazanie genów bezpośrednio zaangażowanych w syntezę, dojrzewanie i sekrecję r-Protów na podstawie profilu ich ekspresji;



- modyfikację zidentyfikowanych mechanizmów badanych zjawisk celem usprawnienia produkcji rs-Protów w badanym systemie ekspresyjnym.
2. 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.

Dla wyeliminowania wpływu czynników zewnętrznych na biosyntezę r(s)-Protów Doktorantka podjęła się wykonania szeregu hodowli ciągłych, w których udało się uzyskać dobrze udokumentowany stan ustalony. W opinii recenzenta jest to bardzo dobre podejście i zasługuje na uznanie, zwłaszcza ze względu na trudności w prowadzeniu takich procesów, w uzyskaniu stabilnego stanu ustalonego oraz możliwości zakażeń. Ponadto, dla pełnej charakterystyki szlaku translacyjno-sekrecyjnego, Pani Korpys-Woźniak wybrała do analiz białka o odmiennych właściwościach biochemicznych (wewnątrz i zewnątrzkomórkową wersję białka żółtej fluorescencji – YFP, glukoamylazę i α -amylazę). Taki dobór białek pozwolił wskazać reakcję komórkową, specyficzną dla danego procesu biologicznego (jak glikozylacja, fałdowanie oksydacyjne itd.). Również tak przemyślana strategia doboru białek zasługuje, w mojej opinii, na pochwałę, gdyż świadczy o dojrzałości naukowej doktorantki i jej dobrej znajomości tematu, który podjęła się analizować i świetnym logicznym podejściu do planowania eksperymentów.

Dzięki zastosowaniu bardzo wartościowej analizy danych omicznych, Doktorantka szczegółowo przeanalizowała procesy związane z inicjacją stresu oksydacyjnego czy procesami fałdowania białek jak i odpowiedzi komórki na niesfałdowane białka (UPR). Ponadto, analizowała również szlaki glikozylacji czy translokacji białek do ER. W badaniach Doktorantki bardzo ciekawe okazały się procesy niekonwencjonalnego wydzielania białek, zaangażowania regulatorów transkrypcji, inicjacji lub inhibicji wakuolarniej proteolizy, czy też zatrzymania progresji cyklu komórkowego. Udało się jednoznacznie wykazać, że skierowanie białka do szlaku sekrecyjnego pozwala na uzyskanie większych jego ilości w płynie pohodowlanym, co znacząco usprawni proces jego późniejszego oczyszczania. Doktorantka udowodniła również, że sekrecja ma większy wpływ na globalną różnicę w ilości różnicowo ekspresjonowanych genów niż właściwości biochemiczne syntetyzowanego rs-Prot. W opinii recenzenta bardzo ciekawe wydają się wyniki związane z produkcją białka zasobnego w wiązania disiarczkowe (-S-S-), gdzie pomimo najwyższej ekspresji genu kodującego to białko, nie uzyskano najwyższej ilości finalnego produktu. Różnice te Doktorantka tłumaczy faktem, że energo- i materiałochłonny proces oksydacyjnego fałdowania stanowi wąskie gardło szlaku translacyjno-sekrecyjnego i przyczynia się do dysproporcji pomiędzy poziomem transkrypcji i syntezy polipeptydu. Co więcej, reakcja na stres oksydacyjny w komórkach *Y. lipolytica* jest zainicjowana niezależnie od liczby wiązań -S-S- w strukturze drugorzędowej rs-Protów.



Bardzo wartościową obserwacją z badań poczynionych przez Doktorantkę jest również morfologia komórek produkujących białka heterologiczne. Dotychczas morfotyp filamentowy uznawany jest za marker inicjacji reakcji na stres w komórkach *Y. lipolytica*, a zatem z badań Doktorantki wynika, że populacja komórek HSS w momencie przeprowadzenia badania była w trakcie przejścia dimorficznego w kierunku morfotypu filamentowego.

W dalszej części swoich badań, na podstawie własnych analiz, Doktorantka wybrała kilka białek, które zastosowała jako czynniki wspomagające (helper factors) syntezę i sekrecję rs-Prots w warunkach ich ko-nadekspresji z białkiem docelowym. Wyniki tego eksperymentu wyraźnie wykazały, że ko-nadekspresja kluczowych genów zaangażowanych w syntezę rs-Prots znacząco zwiększa efektywność syntezy pożądanego białka przez *Y. lipolytica* w zależności od zastosowanej temperatury hodowli. W swoich analizach Doktorantka stosowała 25°C i 30°C, które to temperatury są często stosowane w badaniach procesów biotechnologicznych z udziałem drożdży *Y. lipolytica*. Ciekawym okazało się, że obniżenie temperatury o 5 stopni przyczynia się do ograniczenia transkrypcji genu reporterowego przy jednoczesnym zwiększeniu syntezy dojrzałego polipeptydu. Kolejnym, w mojej opinii, bardzo istotnym i dobrze uargumentowanym podejściem badawczym było zastosowanie jednoczesnej nadekspresji kluczowego czynnika transkrypcyjnego, zaangażowanego w inicjację odpowiedzi UPR – Hac1 z pożądanym białkiem docelowym. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki udowodniły, że taka strategia poprawia sekrecję rs-Prots i znacząco wpływa na deregulację genów zaangażowanych w biogenezę rybosomów, procesy zachodzące w jądrze komórkowym i mitochondriach, zatrzymanie cyklu komórkowego, a także modulację proteolizy i metabolizmu RNA.

Po lekturze pracy doktorskiej, chciałbym zadać Doktorantce kilka pytań, z ciekawości, jakie jest zdanie Doktorantki na dany temat.

1. Które drożdże zdaniem Doktorantki są niekonwencjonalne? We wstępie do pracy można przeczytać, że *Kluyveromyces lactis* oraz *Yarrowia lipolytica*. Jednakże wcześniej Doktorantka wspomina gatunki metylotroficzne *Pichia pastoris* i *Hansenula polymorpha* jak również gatunek drożdży rozsiewkowych *Schizosaccharomyces pombe*.
2. Czy znany jest Doktorantce wzór glikozylacji występujący u drożdży *Y. lipolytica*? W łańcuchach można spotkać m.in. glikany o długości do 14 cząsteczek mannozy i więcej. Czy wiadomo jaki enzym za to odpowiada, jeśli brak jest genu *Mnn1*?
3. Jakie zagrożenia Doktorantka widzi w strategii, w której podejmuje się próby zatrzymania zjawiska ERAD? Czy Doktorantka próbowała zrobić coś podobnego u *Y. lipolytica* w jakichś swoich innych badaniach?
4. Dlaczego Doktorantka wybrała do analiz tylko szczepy produkujące określone białko heterologiczne o wzroście zbliżonym do szczepu kontrolnego? Czy np. w szczepie, który produkowałby dużo więcej białka, odpowiedź komórki nie byłaby jeszcze bardziej wyraźna? W założeniu jest produkcja jak największej ilości białek.



5. Podczas prowadzenia badań Doktorantka zdecydowała się na szybkość rozcieńczania wynoszącą $D=0,2 \text{ h}^{-1}$. Czy nie było to jednak za dużo? Z wykresów stanu ustalonego widać, że warunki faktycznie były najbardziej stabilne, jednak „marnowało” się bardzo dużo glicerolu, którego stężenie w płynie po hodowli wynosiło aż 90 g/L.
6. Co Doktorantka miała na myśli pisząc, że przelicznik ilości białka z aktywności jest obciążony niepewnością? O jakiej wielkości błędzie można tutaj mówić?
7. Czy różnice w poziomie ekspresji poszczególnych genów (np. Rys. 4, strona 51), mogą wynikać przykładowo z różnicy w miejscu wklonowania w genom drożdży? Doktorantka stosowała dwie różne platformy integracyjne, a z uwagi na bardzo silną odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA w postaci mechanizmu niehomologicznego łączenia końców, integracja w genom u *Y. lipolytica* bardzo często jest bardzo losowa. Ile różnych klonów Doktorantka analizowała?

Kilka innych kwestii po przeczytaniu pracy wydaje mi się koniecznym do doprecyzowania:

1. Co to jest heterologiczna synteza rs-Prot? Czy nie chodziło o biosyntezę heterologicznych rs-Prot?
2. Hipoteza 2 – sformułowanie geny korzystnie wpływające na syntezę i sekrecję rs-Prot. W mojej opinii powinno być białka, jako produkt takiego genu.
3. W opisie podłoża YNB Doktorantka wymienia YNB, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i agar. Zabrakło tu źródła węgla.
4. Na stronie 55 Doktorantka podała gen YALI0A08360g jako kodujący proteazę Xpr2, podczas gdy gen kodujący to białko ma numer YALI0F31889g.
5. Na stronie 62 Doktorantka pisze „(...) białka odpowiadające na UPR, zaangażowane w fałdowanie białek, degradację proteasomów czy ERAD (...)”. Czy chodziło o degradację w proteasomach?
6. Strona 104 – Doktorantka dyskutuje odpowiedź komórki na jednoczesną nadekspresję dwóch genów pisząc, że są one heterologiczne. Jednakże jednym z genów był *HAC1*, który pochodził z *Y. lipolytica*. Czy jest to zatem gen heterologiczny?

4. Podsumowanie dorobku naukowego Doktorantki

W dorobku naukowym Doktorantki znajduje się 8 publikacji naukowych w czasopismach z listy JCR. Doktorantka brała udział w 4 projektach, w których w dwóch pełniła rolę kierownika (Diamentowy Grant oraz Preludium 21, który jest ciągle w trakcie realizacji). Ponadto Pani Paulina Korpys-Woźniak odbyła 3 miesięczny staż badawczy w INRA, który realizowała pod opieką Dr. Jean-Marc Nicaud, wybitnego specjalisty od drożdży *Y. lipolytica*. Staż ten na pewno pozwolił Doktorantce zdobyć dużo cennego doświadczenia w pracy z tym gatunkiem drożdży. W dorobku Pani Korpys-Woźniak są również 22 doniesienia konferencyjne, z których 6 uzyskało nagrodę lub wyróżnienie. Z udziału w dwóch



konferencjach powstały również rozdziały w monografii. W opinii recenzenta dorobek naukowy Doktorantki jest bardzo dobry i zasługuje na uznanie.

5. Podsumowanie

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr inż. Pauliny Korpys-Woźniak na wyróżnienie zasługuje bardzo wysoka jakość przeprowadzonych badań, które zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych. Bardzo wysoko oceniam zakres przeprowadzonych prac eksperymentalnych, wielokierunkowość podejść i ilość różnorodnych technik, co pozwoliło Doktorantce na kompleksową analizę odpowiedzi komórki na stres spowodowany syntezą heterologicznych białek. W opinii recenzenta przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, wraz ze składającymi się na nią publikacjami, stanowi bardzo wartościowy i nowatorski wkład do światowej nauki zajmującej się szlakiem sekrecyjnym białek, szczególnie u drożdży, jak również produkcją białek heterologicznych, co może być szczególnie istotne w wykorzystaniu *Y. lipolytica* do biosyntezy białek o przeznaczeniu terapeutycznym. Uzyskane wyniki stanowią niewątpliwie znaczący wkład w głębsze zrozumienie odpowiedzi komórkowej drożdży *Y. lipolytica* na warunki stresowe.

6. Wniosek końcowy

Po wnikliwej analizie rozprawy doktorskiej i na podstawie opublikowanych prac naukowych będących jej podstawą stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa doktorska spełnia warunki 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.) i na tej podstawie **wnioskuje** do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki biologiczne Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu **o nadanie stopnia naukowego doktora** nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne **mgr inż. Paulinie Korpys-Woźniak**. Równocześnie **wnioskuje** do ww. Rady Naukowej **o wyróżnienie** rozprawy doktorskiej. Wniosek o wyróżnienie podyktowany jest bardzo dobrze zaplanowaną strategią badawczą, kompleksową analizą tematu, wysoką jakością prezentowanych wyników, jak również szeroką wiedzą Doktorantki w temacie rozprawy, która zaprezentowała zarówno we wprowadzeniu w tematykę pracy jak również w bardzo dojrzałej naukowo dyskusji wyników. Nie mam wątpliwości, że w przyszłości badania prowadzone przez Panią Paulinę Korpys-Woźniak będą na najwyższym poziomie naukowym.

Zbigniew Łazarz