

## RECENZJA ROZRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr inż. Patrycji Szczepańskiej

pt. „ Produkcja związków bioaktywnych z wykorzystaniem drożdży *Yarrowia lipolytica*”

wykonanej

w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

pod kierunkiem Prof. dr hab. inż. Zbigniewa Lazara,

oraz w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

pod kierunkiem Prof. nadzw. PAN dr hab. Andrzeja Rapaka

w ramach Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich.

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne UPWr z dnia 27 kwietnia 2023 roku.

### 1. Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Patrycji Szczepańskiej jest oparta na zestawie czterech artykułów naukowych (trzech oryginalnych artykułów eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej) opublikowanych w latach 2020-2023. Doktorantka jest pierwszym, lub pierwszym o równo cennym wkładzie, autorem we wszystkich czterech pracach wchodzących w skład dzieła. Sumaryczny współczynnik IF publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi  $> 21$ , a liczba punktów ministerialnych to 490.

Rozprawa doktorska skonstruowana jest zgodnie z nowoprzyjętym systemem, gdzie wspomniane publikacje stanowią jej zasadniczą część. Całość manuskryptu została opatrzona wprowadzeniem do tematu oraz podsumowaniem. W osobnych rozdziałach wyszczególniono cele główne i szczegółowe pracy, a także podsumowanie i wnioski wynikające z rezultatów przeprowadzonych badań. Każdą z publikacji wchodzących w skład dzieła poprzedza krótki, ale treściwy komentarz, prezentujący

kontekst badań, cel danej pracy, główne wyniki i wnioski. Po każdym z komentarzy następuje przedmiotowy artykuł naukowy, w którym zaprezentowano kompletną metodykę, opracowane wyniki wraz z ich omówieniem, oraz materiały uzupełniające. Niezbędną dla wykonania recenzji dokumentację uzupełniają oświadczenia współautorów opublikowanych artykułów, w których szczegółowo wykazano zakres przeprowadzonych prac. Syntetyczna charakterystyka dorobku naukowego mgr inż. Szczepańskiej pozwala zorientować się w pozostałych dokonaniach naukowych Doktorantki, w tym w odbytych stażach naukowych, wystąpieniach konferencyjnych, oraz realizowanych projektach badawczych. Reasumując strukturę rozprawy, stwierdzam, że **konstrukcja pracy jest klarowna i logiczna, a dokumentacja kompletna**. Pragnę podkreślić, iż **przyjęta konwencja** przygotowania rozprawy, której zasadniczą część stanowią publikacje wchodzące w skład dzieła, opatrzone krótkimi komentarzami, **jest w mojej opinii jak najbardziej prawidłowa i zasadna**.

Zapoznanie się z rzeczonymi artykułami naukowymi, jak również z załączonymi oświadczeniami współautorów publikacji, pozwala uznać, że wkład Doktorantki w przeprowadzenie badań prezentowanych w rozprawie jest kluczowy i wiodący. Tym samym, można uznać przedstawioną rozprawę doktorską za **autorskie dzieło mgr inż. Patrycji Szczepańskiej**.

## **2. Przedmiot rozprawy oraz zastosowane podejście metodyczne**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Patrycji Szczepańskiej dotyczy spójnego tematycznie interdyscyplinarnego zagadnienia – biotechnologicznej produkcji nutraceutyków z wykorzystaniem genetycznie modyfikowanych drożdży *Y. lipolytica*, oraz badania ich bioaktywnych właściwości względem ssaczych linii komórkowych. Badania prowadzone przez mgr inż. Patrycję Szczepańską skupiają się wokół dwóch grup związków bioaktywnych: (i) lipidowych (P1, P2, P4) ze szczególnym naciskiem na fosfolipidy i fosfatydylocholinę, oraz (ii) polifenolowych, z naciskiem na jeden ze stilbenów – resweratrol (P3, P4). Bezsprzecznie, zarówno fosfolipidy jak i związki polifenolowe, stanowiące przedmiot prac Doktorantki, to uznane nutraceutyki o udowodnionej funkcji prozdrowotnej. Ich podaż na globalnym rynku nie wysyca ciągle wzrastającego popytu, stąd poszukiwanie alternatywnych metod ich produkcji na drodze mikrobiologicznej stanowi istotne badawczo i aplikacyjne zagadnienie.

Cele szczegółowe rozprawy, a tym samym główne etapy i zastosowane podejścia metodyczne zaprezentowane w trzech publikacjach wynikowych, można skrótowo ująć w następujących punktach:

### **1. Modyfikacje genetyczne komórek *Y. lipolytica* celem intensyfikacji procesu biosyntezy fosfolipidów.**

- Metodycznie cel ten zrealizowano poprzez zaprojektowanie i skonstruowanie szeregu rekombinowanych szczepów *Y. lipolytica* (nadekspresja genów zaangażowanych w syntezę fosfolipidów, jak również asymilację glicerolu, oraz delecja genów zaangażowanych w przekształcenia fosfolipidów lub konkurencyjną syntezę

triacylogliceroli) oraz ich testowanie w hodowlach przy różnym składzie medium hodowlanego (zmienne: źródło węgla, stosunek C/N, suplementacja „promotorami” szlaku pentozofosforanowego).

2. Skonstruowanie panelu szczepów *Y. lipolytica* syntetyzujących resweratrol na drodze przekształceń dwóch aminokwasów aromatycznych: L-fenylalaniny i L-tyrozyny.

- Tu podobnie, cel ten zrealizowano poprzez zaprojektowanie i skonstruowanie szeregu rekombinowanych szczepów *Y. lipolytica* (nadekspresja zestawu genów zaangażowanych w deaminację danego aminokwasu, ewentualnie hydroksylację pochodnej, aktywację i finalnie - kondensację z aktywowanym malonylo-CoA; w kombinacji jednej / dwóch kopii), oraz ich testowanie w hodowlach przy zmiennych parametrach (zmienne: źródło węgla, podaż prekursorów - aminokwasów, napowietrzanie).

3. Uzyskanie zestawu lipidowych pochodnych resweratrolu na drodze syntezy chemicznej i badanie ich właściwości przeciwnowotworowych i antyoksydacyjnych względem trzech nowotworowych linii komórkowych.

- W tym etapie badań, dokonano estryfikacji resweratrolu kwasami tłuszczowymi w różnych wariantach, przeprowadzono ekspozycję wybranych linii komórkowych na działanie uzyskanych związków resweratrolu, a następnie badano żywotność komórek, wystąpienie i postęp apoptozy, jak również określano potencjał antyoksydacyjny traktowanych komórek.

Aby zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zastosowała szereg zróżnicowanych podejść eksperymentalnych, które w sposób adekwatny odnosiły się do stawianych celów szczegółowych. Wśród szerokiego panelu zastosowanych metod można wyróżnić: (i) klasyczne podejścia z zakresu inżynierii genetycznej, ale też nowe techniki, jak klonowanie modularne; (ii) inne metody z zakresu biologii molekularnej, w tym oznaczanie poziomu ekspresji genów w komórkach drożdżowych i w liniach komórkowych; (iii) rozmaite techniki hodowlane komórek drożdżowych i linii komórkowych, w tym także - hodowle bioreaktorowe ukierunkowane na maksymalizację produkcji docelowych związków bioaktywnych; (iv) zróżnicowane techniki analityczne, jak np. chromatografia cieczowa, gazowa i cienkowarstwowa, czy też cytometria. Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera wyniki dobrze zaplanowanych, wielokierunkowych badań, o bardzo szerokim zakresie metodycznym.

### **3. Kluczowe osiągnięcia i wnioski uzyskane w toku realizacji pracy**

Do kluczowych osiągnięć naukowych przedstawionych w rozprawie w mojej opinii należą:

- Skonstruowanie szeregu szczepów *Y. lipolytica* o zwiększonej syntezie fosfolipidów (PS05 →

PS06 → PS07 → PS08) poprzez zastosowanie klasycznej już strategii inżynierii metabolicznej, zwanej „push and pull” (w tym wydaniu polegającej na nadekspresji genów *CDS1* i *OPI3*, czyli pierwszego i ostatniego w szlaku przekształceń kwasu fosfatydowego do fosfatydylocholiny) uzupełnionej o inne zasadne modyfikacje (nadekspresja *DGK1* i delecja *SPO14*);

- Wykazanie, które geny szlaku biosyntezy i przekształceń fosfolipidów, spośród szeregu badanych, są kluczowe dla efektywności tego procesu (*CDS1*, *OPI3*, *SPO14*), i tym samym mogą stanowić cele dla strategii inżynierii genetycznych u innych gatunków drożdży oleistych;
- Wykazanie kluczowej roli poziomu kwasu fosfatydowego dla regulacji szlaku metabolizmu (syntezy i katabolizmu) fosfolipidów i triacylogliceroliu *Y. lipolytica*;
- Wykazanie, że intensywne biosynteza fosfolipidów zachodzi równocześnie z procesami akumulacji triacylogliceroli w fazie stacjonarnej wzrostu, wbrew intuicyjnemu założeniu, że skoro te procesy biologiczne konkurują o substraty, to czas ich intensyfikacji będzie odmienny;
- Opracowanie procesu mikrobiologicznej biosyntezy fosfolipidów na poziomie 650 mg/L z odpadowego glicerolu w hodowlach bioreaktorowych;
- Skonstruowanie szczepu *Y. lipolytica* T2P2 niosącego dwie kopie syntetycznych szlaków konwersji aromatycznych aminokwasów (L-feniloalaniny i L-tyrozyny) do resweratrolu;
- Opracowanie procesu biotechnologicznej produkcji resweratrolu na poziomie 430 mg/L z glicerolu w hodowlach bioreaktorowych;
- Uzyskanie lipidowych estrów resweratrolu (mono-RES-OA, tri-RES-PA, RES-CLA) o wykazanej w niniejszej pracy aktywności obniżającej żywotność komórek nowotworowych przy braku negatywnego wpływu na żywotność komórek prawidłowych (z wyłączeniem mono-RES-OA < 25 ug/mL);
- Wyjaśnienie molekularnych mechanizmów prozdrowotnego działania uzyskanych lipidowych estrów resweratrolu (mono-RES-OA, tri-RES-PA, RES-CLA); w tym zakresie: wykazanie zmian w aktywności apoptotycznej i w potencjale antyoksydacyjnym powodowanych ekspozycją na działanie badanych związków resweratrolu.

Wyniki uzyskane w toku prac eksperymentalnych, po trafnej interpretacji biologicznej i szczegółowym przedyskutowaniu z dostępnymi danymi literaturowymi, pozwoliły na sformułowanie siedmiu wniosków, zaprezentowanych na str. 107 dokumentu. Postawione wnioski są uzasadnione i w pełni poparte przedstawionymi danymi eksperymentalnymi.

#### **4. Znaczenie uzyskanych wyników na tle danych literaturowych**

Podjęta w niniejszej pracy tematyka badawcza stanowi zarówno *novum* naukowe, nie podejmowane we wcześniejszych badaniach publikowanych w literaturze światowej, jak i dostarcza implikacji dla dalszych badań stosowanych. Za szczególnie ciekawe uważam podjęcie tematu inżynierii szlaku biosyntezy fosfolipidów w komórkach drożdży *Y. lipolytica*. Dotychczas, prace związane z inżynierią

metabolizmu lipidów w komórkach tych drożdży były skupione wokół maksymalizacji syntezy i akumulacji triacylogliceroli, natomiast próby modyfikacji konkurencyjnego szlaku, syntezy fosfolipidów, nie były dotąd publikowane. Warto podkreślić, że założony cel (intensyfikacja szlaku syntezy fosfolipidów), stanowi niezwykle ambitny projekt z punktu widzenia inżynierii metabolicznej. Jako że zabezpieczenie podaży odpowiedniej ilości i profilu fosfolipidów stanowi fundament funkcjonowania i przeżycia komórki, szlak ich biosyntezy i przekształceń jest silnie regulowany (podobnie, jak glikoliza). Stąd też, objęcie tak ambitnego celu wiązało się ze znacznym ryzykiem niepowodzenia, bez względu na zastosowaną strategię inżynierii metabolicznej. Zakończenie tego projektu sukcesem uważam za doniosłe osiągnięcie przedstawionej pracy.

Podobnie, w mojej opinii, na uznanie zasługuje dążenie do implementacji skonstruowanych szczepów *Y. lipolytica* nadprodukcujących pożądaną nutraceutyki (fosfolipidy i resweratrol) do realiów procesów biotechnologicznych, bazujących na preferowanym substracie, czyli odpadowym glicerolu. Każdorazowo po wykazaniu funkcjonalności skonstruowanych szczepów w warunkach typowych dla prac z zakresu biologii molekularnej (medium syntetyczne YNB z glukozą), podejmowano próby hodowlane na glicerolu. Co ciekawe, zastosowanie odpadowego glicerolu nie miało negatywnego wpływu na efektywność procesu produkcji fosfolipidów (względem glicerolu czystego), a zastosowanie glicerolu jako głównego źródła węgla miało pozytywny wpływ na ilości wytworzonego resweratrolu (w porównaniu do hodowli prowadzonych z glukozą).

Ponadto, za osiągnięcie o doniosłym znaczeniu w obszarze badań nad nutraceutykami uważam wykazanie aktywności przeciwnowotworowej uzyskanych estrów resweratrolu. Jak podkreślono w pracy, badania nad aktywnością biologiczną estrów resweratrolu prowadzono głównie w odniesieniu do ich potencjału antyoksydacyjnego, natomiast badania aktywności pro-/anty-apoptotycznej stanowią rzadkość.

## 5. Komentarze

Z racji, iż przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi zbiór oryginalnych artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, a interpretacje i wyjaśnienia uzyskanych rezultatów są szczegółowe i wyczerpujące, pozwolę sobie jedynie na drobne komentarze dotyczące opracowania części wspólnych manuskryptu i zadanie Doktorantce kilku pytań:

1. W pracy wielokrotnie Doktorantka stosuje pojęcia „inżynieria metabolizmu”, „inżynieria metaboliczna”, „biologia systemów”, „biologia syntetyczna”, inżynieria metaboliczna”, „inżynieria genetyczna”, „manipulacje genetyczne”, „modyfikacje genetyczne” itp. Chciałabym poznać zdanie Doktorantki na temat zasadności stosowania niektórych z tych pojęć wymiennie, oraz określenie, do jakiego obszaru wiedzy i działań te pojęcia się odnoszą.
2. Chciałam prosić Doktorantkę o wyjaśnienie postawionego na str. 13 stwierdzenia, że

„mikroorganizmy olejogenne ... zajmują szczególne miejsce wśród producentów związków bioaktywnych”.

3. W kontekście dyskutowanego na str. 15 szlaku biosyntezy lipidów *ex vivo*, chciałam prosić o przedstawienie obecnego stanu wiedzy na temat mechanizmu transportu lipidów przez błony biologiczne do wnętrza komórki *Y. lipolytica*. Co zakłada obecnie obowiązujący model?
4. Doceniam rzetelnie przygotowany przegląd stanu techniki na temat mikrobiologicznej produkcji resweratrolu. Szczególnie zainteresowały mnie opisane przez Doktorantkę na str. 22 / 23 procesy biotechnologiczne funkcjonujące w przemyśle opracowane przez firmę Evolva i DuPont. Czy znane są szczegóły dotyczące tych procesów? Czy wiadomo, z jakich substratów syntetyzowany jest resweratrol w tych procesach? Jaki mikroorganizm jest wykorzystywany, oraz czy i jak został on zmodyfikowany genetycznie?
5. W kontekście wyników zaprezentowanych w publikacji 1, i efektów powodowanych przez delecję genu *LRO1* (zaangażowanego w przekształcenie DAG w TAG) – czy istnieją jakieś przypuszczenia dlaczego ta modyfikacja spowodowała efekt odwrotny do założonego (czyli obniżenie stężenia fosfolipidów a zwiększenie akumulacji TAG)? Podobnie, czy Doktorantka ma jakieś przypuszczenia dlaczego zwiększanie skali prowadzenia bioprocesu miało pozytywny wpływ dla poziomu syntezy fosfolipidów przez uzyskany szczep PS08, a takiego efektu nie zaobserwowano dla szczepu kontrolnego W29? Przy jakim stosunku C/N prowadzono finalny proces syntezy fosfolipidów pozwalający na uzyskanie tak zadowalającego wyniku (650 mg/L)?
6. W odniesieniu do wyników prezentowanych w publikacji 2 – tutaj wykazano, że zwiększenie liczby kopii syntetycznego szlaku konwersji L-fenylalaniny i L-tyrozyny ma pozytywny wpływ na ilość syntetyzowanego resweratrolu. Jaką metodą określano liczbę kopii syntetycznego szlaku? Lub, jak skonstruowano drugą kopię kasety ekspresyjnej, aby była utrzymywana w genomie? Czy jest możliwe, że miejsce integracji kasety ekspresyjnej „P” („konwersja L-fenylalaniny”) było przyczyną nieoczekiwanych rezultatów powodowanych zwiększeniem liczby kopii tej kasety? Czy Doktorantka zgodziłaby się, że w obliczu postulowanej toksyczności intermediatu szlaku biosyntezy resweratrolu kolejną strategią mogłoby być nadekspresja genu *STS* (czyli *de facto* strategia „pull” stosowana przez Doktorantkę w inżynierii szlaku metabolizmu fosfolipidów zaprezentowanej w publikacji 1)? Jak wyjaśnić obserwowaną niższą produkcję biomasy przez genetycznie modyfikowane drożdże *Y. lipolytica* (Fig. S1, S3 w P2) przy podaży aminokwasów?
7. W kontekście prac zaprezentowanych w publikacji 3 chciałam zapytać Doktorantkę o wyniki analiz poziomu ekspresji genów *SOD1/2*. Czy w Jej opinii poziom ekspresji genów *SOD1/2* (czy to

stymulowany procesami nowotworzenia, czy też ekspozycji na działanie związków chemicznych) należy rozumieć jako „wskaźnik wewnątrzkomórkowej siły antyoksydacyjnej” czy jako marker odpowiedzi na stres oksydacyjny? A może nie należy czynić takich rozróżnień?

## 6. Posumowanie

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr inż. Patrycji Szczepańskiej na uwagę zasługuje wysoka jakość przeprowadzonych badań, co znajduje odzwierciedlenie w poziomie opublikowanych prac. Wysoko oceniam zakres przeprowadzonych prac eksperymentalnych, jak również wielokierunkowość podejść i mnogość zastosowanych technik, co skutkuje kompleksowym i interdyscyplinarnym podejściem do badanego problemu. W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska stanowi merytorycznie wartościowy i nowatorski wkład do światowej wiedzy na temat modyfikacji genetycznych drożdży *Y. lipolytica* celem biosyntezy nutraceutyków, jak również sposobów modyfikacji uzyskanych związków bioaktywnych celem poprawy ich właściwości prozdrowotnych.

## 7. Wniosek końcowy

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Patrycji Szczepańskiej spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017, poz. 1789). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne UP we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Patrycji Szczepańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną zaprezentowanych badań, oraz doskonałe wymierne skutki pracy naukowej Pani mgr inż. Patrycji Szczepańskiej wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Poznań, 08-05-2023

..... Ewelina Celińska.....