

Recenzja

rozprawy doktorskiej pana magistra inżyniera Piotra Pietrasa pod tytułem:

„Wpływ stresu abiotycznego na heterogeniczność rybosomów i regenerację komórek

***Saccharomyces cerevisiae*: Analiza aktywności translacyjnej i morfologii”**

Wartość naukowa rozprawy i wiedza naukowa kandydata

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej koncentrowały się na wpływie krótkotrwałego stresu środowiskowego na komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Szczególną wartością naukową stanowi pogłębiona analiza heterogeniczności rybosomów – zagadnienia nowego i dynamicznie rozwijającego się w biologii molekularnej. Autor umiejętnie powiązał swoje ustalenia z aktualnymi hipotezami dotyczącymi istnienia „wyspecjalizowanych rybosomów” oraz tzw. „kodu rybosomalnego”, które mogą odgrywać istotną rolę w regulacji ekspresji genów, różnicowaniu komórek, a także w rozwoju chorób, takich jak nowotwory czy rybosomopatie. Wyniki uzyskane przez doktoranta wpisują się w coraz liczniejsze doniesienia wskazujące, że rybosomy mogą różnić się składem białkowym i RNA, co podważa tradycyjny paradygmat rybosomów jako jednorodnych, uniwersalnych maszyn translacyjnych.

W pracy zastosowano zaawansowane metody analityczne (w tym wysokorozdzielczą spektrometrię masową (LC-HMRS) do analizy składu rybosomów, profilowanie polisomowe w celu oceny aktywności translacyjnej oraz holotomografię – wysokorozdzielcze obrazowanie fazowe – do obserwacji zmian morfologicznych komórek). Badania przeprowadzone przez autora świadczą o jego dojrzałości naukowej i samodzielności badawczej. Praca wyróżnia się kompleksowym podejściem do analizy zmian składu rybosomów w odpowiedzi na różnorodne stresory, dostarcza bezpośrednich dowodów na zmienność białkowego składu rybosomów oraz wskazuje na jej funkcjonalne konsekwencje. Tym samym rozprawa wnosi nową perspektywę do zrozumienia heterogeniczności rybosomów i ich roli w komórkowej odpowiedzi na stres, otwierając nowe kierunki badań w tej dziedzinie.

Wartość naukowa rozdziałów/artykułów:

Publikacja 1. Polskojęzyczna praca przeglądowa nie zawiera nowych danych eksperymentalnych, jednak jej znaczenie naukowe przejawia się w kompleksowej syntezie aktualnego stanu wiedzy na temat subpopulacji rybosomów różniących się składem białkowym, modyfikacjami rRNA oraz stechiometrią składników. Autorzy szczegółowo omówili wpływ tych różnic na selektywność translacji mRNA, co stanowi istotne uzupełnienie dyskusji o funkcjonalnej heterogeniczności rybosomów w literaturze przedmiotu.

Publikacja 2. Badanie dostarcza kluczowych dowodów empirycznych dotyczących wpływu stresu środowiskowego na skład białkowy rybosomów u drożdży. Zidentyfikowano 74 białka rybosomalne, z czego 22 (14 z podjednostki małej RPS i 8 z dużej RPL) wykazywały istotne statystycznie zmiany ilościowe pod wpływem stresorów: promieniowania UV, niedoboru glukozy, szoku termicznego, wysokiego zasolenia,

warunków beztlenowych i głodzenia aminokwasowego. Dodatkowo, jako efekt stosowanych stresów zaobserwowano znaczące zmiany w proporcjach 7 paralogów białek rybosomalnych. Te zmiany korelowały ze zmiennością aktywności translacyjnej rybosomów, sugerując, że heterogeniczność rybosomów może być jednym z mechanizmów adaptacyjnym komórek do przetrwania stresu.

Publikacja 3. Artykuł wyróżnia się pionierskim wykorzystaniem holotomografii – bezinwazyjnej techniki obrazowania 3D – do analizy żywych komórek drożdży poddanych stresowi. Metoda umożliwiła precyzyjną charakterystykę zmian morfologicznych (kształt, objętość, sferyczność), biochemicznych (zawartość białek i lipidów) oraz strukturalnych (uszkodzenia ściany komórkowej) na poziomie pojedynczych komórek. Innowacyjne połączenie analiz morfometrycznych z oceną żywotności populacji ujawniło istotną heterogenność odpowiedzi na stres, co poszerza perspektywy badawcze w zakresie mechanizmów adaptacyjnych i zastosowań biotechnologicznych.

Wartość merytoryczna rozprawy i merytoryczne przedstawienie zagadnień przez kandydata

Publikacja 1. Publikacja ma duże znaczenie merytoryczne i dydaktyczne. Autorzy przedstawiają najnowsze odkrycia dotyczące heterogeniczności rybosomów, odwołując się do aktualnych badań i literatury naukowej. Mimo omawiania skomplikowanych zagadnień biologii molekularnej, tekst jest napisany w sposób zrozumiały i stanowi zwięzły oraz przystępny materiał do nauczania akademickiego, umożliwiając zilustrowanie współczesnych koncepcji regulacji ekspresji genów na poziomie translacji. Może być także inspiracją do tematów prac licencjackich i magisterskich. Publikacja ta potwierdza i dokumentuje ugruntowaną wiedzę teoretyczną mgr. Piotra Pietrasa w zakresie biologii molekularnej stresu komórkowego.

Publikacja 2. Publikacja prezentuje nowoczesną metodologię, wykorzystującą wysokorozdzielczą spektrometrię mas (LC-HRMS), a dane są przedstawione w sposób przejrzysty. Artykuł dostarcza cennych informacji na temat dynamicznych zmian w składzie rybosomów w odpowiedzi na stres, co może być podstawą do dalszych badań nad regulacją translacji.

Publikacja 3. Artykuł dostarcza szczegółowych danych na temat wpływu różnych stresów na fizjologię i morfologię drożdży. Wykorzystanie mikroskopii 3D pozwala na dokładną analizę zmian strukturalnych komórek. Publikacja jest dobrze udokumentowana i może służyć jako cenne źródło informacji dla badaczy zajmujących się fizjologią drożdży i ich adaptacją do stresu.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa została przygotowana jako spójny tematycznie cykl trzech artykułów naukowych, które jednak, dość niefortunnie, nie stanowią części głównej rozprawy, lecz zostały dołączone na końcu jako „Załączniki publikacyjne”.

Rozprawa rozpoczyna się **Streszczeniem** (w języku polskim i angielskim), po czym następują: **Rozdział 1. Aktywność naukowa i osiągnięcia doktoranta oraz Rozdział 2. Lista powiązanych tematycznie publikacji naukowych składających się na rozprawę doktorską**. Cieszę się, że treści rozdziałów 1 i 2 zostały dołączone do rozprawy, jednak uważam, że powinny stanowić załączniki, a nie początkowe rozdziały. Dodatkowo, lista publikacji wymaga uaktualnienia, ponieważ publikacja 3 jest już opublikowana, a nie „przyjęta do druku”. **Rozdział 3** nosi nieprecyzyjny tytuł: *Opis wyników rozprawy doktorskiej*. W rzeczywistości zawiera on podrozdziały: **3.1. Cel rozprawy**; **3.2. Wstęp** (który zawiera cytacje w formie numerycznej); **3.3. Główne tezy i osiągnięcia rozprawy doktorskiej** (ten i kolejne podrozdziały nie mają już cytacji, a uważam, że powinny je zawierać). W podrozdziale **3.3.** znajdują się kolejne pod-podrozdziały, które według mnie są najważniejszymi częściami rozprawy doktorskiej, gdyż zawierają skrótowe przedstawienie publikacji wchodzących w skład rozprawy. Uważam, że właśnie tutaj również powinny znaleźć się oryginalne publikacje, które stanowią meritum pracy doktorskiej. Kolejny podrozdział **3.4.** to *Podsumowanie*, będące jednostronicowym streszczeniem podrozdziału **3.3.** Następnie pojawia się podrozdział **3.5. Finansowanie badań w ramach rozprawy doktorskiej**, gdzie mam pytanie dotyczące wymienionego projektu NCN UMO-2014/13/D/NZ1/00061 oraz „funduszy statutowych”, ponieważ te źródła finansowania nie są wymienione w żadnej z publikacji stanowiących cykl artykułów rozprawy. **Rozdział 3** kończą podrozdziały **3.6. Spis używanych skrótów** oraz **3.7. Bibliografia**, której układ jest dość niekonwencjonalny, tzn. stosuje zapis w formie: imię przed nazwiskiem, z czym dotąd się nie spotkałam. Dodatkowo nie rozumiem, dlaczego spis bibliografii dotyczy tylko podrozdziału **3.2.**, podczas gdy uważam, że powinna być również w rozdziale **3.3.** Ostatni **Rozdział 4.** to *Załączniki publikacyjne* (czyli główne dzieło doktoranta; zamienione kolejnością, tzn. publikacja opisana w treści jako 2 jest trzecim załącznikiem) oraz *Oświadczenia doktoranta i współautorów*. Nie do końca jest to zgodne z opisem, ponieważ dołączone są tylko oświadczenia doktoranta i promotorki (która jest współautorką wszystkich wykazanych publikacji), co najprawdopodobniej spełnia wytyczne Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN. W rozdziałach 1–4 nie ma żadnych rysunków ani tabel. Natomiast ilustracje, schematy i rysunki w poszczególnych artykułach zostały starannie przygotowane i w większości czytelnie opisane. Rozprawa jest dobrze napisana pod względem językowym. Podsumowując, mimo pewnych zastrzeżeń, uważam, że rozprawa doktorska spełnia kryteria poprawności redakcyjnej.

4. Pytania i/lub uwagi krytyczne na które oczekuję odpowiedzi kandydata w czasie obrony:

Cel całej rozprawy został sformułowany jako „analiza mechanizmów adaptacyjnych” (str. 9), a w polskojęzycznych częściach rozprawy wielokrotnie sugerowane jest, że wyniki obu prac dostarczają „nowych dowodów na istnienie mechanizmów translacyjnej adaptacji do warunków stresowych” (str. 4). Uważam, że zasadność tych stwierdzeń nie została dostatecznie uzasadniona empirycznie, a przedstawiona konkluzja

wyprzedza dane. Obydwie prace eksperymentalne stanowiące rozprawę doktorską analizują raczej zmienność powstającą pod wpływem niewielkich, krótkotrwałych stresów środowiskowych. Mechanizmy adaptacyjne analizowane w pracy 3 to badanie ekspresji trzech genów (*HSP12*, *GPD1*, *EXO1*) związanych z odpowiedzią na stres. Natomiast analizowana zmienność fenotypowa komórek (morfologia, ilość lipidów, objętość), tempo podziału i śmiertelność to wskaźniki tego, że mechanizmy potencjalnie adaptacyjne zasły (jeśli dostosowanie szczepów eksperymentalnych nie jest istotnie niższe niż szczepów kontrolnych) – ale same w sobie nie są pierwotnymi mechanizmami, tylko ich konsekwencją. We wstępie pracy 2 autorzy piszą: *While the concept of specialized ribosomes contributing to proteome modulation as a stress response is tempting, conclusive experimental evidence is still missing. We have therefore aimed at characterizing the heterogeneity of yeast ribosomes in the aspect of ribosomal protein composition as a response to environmental stresses.* Oznacza to, że autorzy dobrze rozumieją, iż zmiany obserwowane w składzie rybosomów w odpowiedzi na stres środowiskowy, choć mogą sugerować udział w adaptacji komórkowej, nie stanowią same w sobie dowodu na istnienie mechanizmu adaptacyjnego. Aby taką funkcję im przypisać, konieczne jest wykazanie, że zmiany te są regulowane, a nie przypadkowe, oraz że przyczyniają się do poprawy przystosowania komórki do niekorzystnych warunków – na przykład poprzez zwiększenie przeżywalności lub selektywną translację genów stresowych. W tym kontekście obserwacja zmienności rybosomów stanowi raczej hipotezę niż potwierdzony mechanizm adaptacyjny.

Zgodziłabym się z takim zdefiniowaniem celu rozprawy, gdyby publikacje 2 i 3 były zaplanowane jako jedna, większa całość badawcza i gdyby w jednym eksperymencie potwierdzono, że stres powoduje zmienność molekularną (rybosomów) i fenotypową (komórek) prowadzącą do zwiększonego dostosowania (przeżywanie, odrastanie i inne parametry dostosowania); a dodatkowo przeprowadzono by eksperymenty bezpośrednio porównujące przeżywalność komórek posiadających rybosomy o różnym składzie białkowym w warunkach stresu, pokazując funkcjonalny charakter zmian. Dodatkowym potwierdzeniem mogłoby być pogorszenie odpowiedzi stresowej po zablokowaniu, np. poprzez delecję określonego białka rybosomalnego. Podsumowując, uważam, że cel całej rozprawy doktorskiej mógłby być lepiej sformułowany, nawiązując na przykład do jej tytułu („Wpływ stresu abiotycznego na heterogeniczność rybosomów i regenerację komórek *Saccharomyces cerevisiae*: Analiza aktywności translacyjnej i morfologii”), a znaczenie adaptacyjne obserwowanej zmienności wymaga jeszcze potwierdzenia empirycznego.

Do obu publikacji eksperymentalnych wybrano auktotroficzny szczep haploidalny BY4741 (MAT α ; *his3* Δ , *leu2* Δ , *met15* Δ , *ura3* Δ). Wydaje mi się, że szczególnie w przypadku badania stresów aminokwasowych lepszy byłby szczep prototroficzny. *Co było powodem wyboru właśnie tego szczepu? Jaki wpływ taki wybór może mieć na uzyskane wyniki, na przykład w zakresie morfologii komórek?*

W publikacji 3 analizowano krzywe wzrostu populacji po zastosowaniu warunków stresowych. Próbkę populacji przenoszono do świeżego, płynnego podłoża YPD, a następnie monitorowano wzrost przez 0,5; 4

oraz 70 godzin. Interesuje mnie, jakie było początkowe zagęszczenie komórek oraz jaka była objętość odrastających populacji i populacji kontrolnej. Nie jest dla mnie jasne, czy przedstawione na wykresach krzywe (Fig. 2, 3 i 4) pochodzą z jednego eksperymentu odrastania i ciągłych pomiarów, czy też są to krzywe z oddzielnych inkubacji monitorowanych przez różny czas odrastania (0,5, 4 i 70 godzin). Wyniki zaprezentowano na rycinach 3, 4 i 5 oraz w tabelach 1 i 2. Oś OY wykresów opisana jest jako „normalised OD₆₀₀” - proszę o wyjaśnienie, na czym polegała normalizacja oraz jaki był jej cel. Byłabym również zainteresowana zobaczeniem nienormalizowanych wykresów, ponieważ potencjalne różnice w początkowej liczbie komórek zdolnych do wzrostu mogą istotnie wpływać na kształt krzywej. Zastanawia mnie także brak fazy lag we wszystkich zaprezentowanych krzywych - czy wynika to z przedstawienia jedynie fragmentów danych? W naszych własnych badaniach, nawet przy zachowaniu identycznych warunków środowiskowych, nie udało się całkowicie wyeliminować fazy lag. Czy krzywa kontrolna przedstawiona na rycinie 4 jest średnią z kilku powtórzeń? Dlaczego w tabelach nie zamieszczono odchyłeń standardowych dla wyników (brak jest również odchyłeń standardowych w tabeli 1 w publikacji 2)?

W pracy zauważyłam również drobne uwagi redakcyjne, które nie wpływają na moją ocenę końcową i na które nie oczekuję odpowiedzi podczas obrony rozprawy doktorskiej. Jeśli jednak mogą być przydatne w przyszłości, chętnie je prześlę autorowi.

6. **Ocena końcowa**

Stwierdzam, że *Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Piotra Pietrasa spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 40/2025/Internet/RN_140 z dnia 18 marca 2025 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Piotra Pietrasa do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.*

14.05.2025

data sporządzenia recenzji

.....

podpis recenzenta