

Poznań, 25.05.2025 r.

dr. hab. Andonis Karachitos

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Piotra Pietrasa
pt. "Wpływ stresu abiotycznego na heterogeniczność rybosomów i regenerację
komórek *Saccharomyces cerevisiae*: Analiza aktywności translacyjnej i morfologii",
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN,
w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa Pana mgr. inż. Piotra Pietrasa pt. "Wpływ stresu abiotycznego na heterogeniczność rybosomów i regenerację komórek *Saccharomyces cerevisiae*: Analiza aktywności translacyjnej i morfologii" złożona została w postaci zbioru powiązanych ze sobą tematycznie publikacji naukowych, opatrzonych w streszczenie w języku polskim i angielskim oraz w dodatkowy opis wyników rozprawy doktorskiej i podsumowanie całości prac ujętych w rozprawie. Po zapoznaniu się z materiałami stwierdzam, że rozprawa doktorska 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.).

Tematyka badań zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej koncentruje się na wielokierunkowej analizie odpowiedzi komórek drożdży *S. cerevisiae* na stres środowiskowy, ze szczególnym uwzględnieniem heterogeniczności rybosomów jako potencjalnego mechanizmu regulacji translacji. Doktorant wraz ze współautorami podejmują zagadnienie z trzech wzajemnie się uzupełniających perspektyw: formułując koncepcję teoretyczną, analizując fizjologiczne i morfologiczne skutki stresu na poziomie całej komórki, oraz przeprowadzając zaawansowane badania proteomiczne rybosomów poddanych działaniu różnych czynników wywołujących stres w komórkach. Całość tworzy spójny projekt badawczy, w którym stres środowiskowy staje się punktem wyjścia do zrozumienia dynamicznych zmian w składzie i funkcji aparatu translacyjnego.

Na rozprawę składają się trzy artykuły. Pierwszy z nich ma charakter przeglądowy i został opublikowany w 2022 roku w krajowym czasopiśmie *Postępy Biochemii*. Drugi artykuł, o charakterze eksperymentalnym, ukazał się w 2024 r. w prestiżowym czasopiśmie *International Journal of Biological Macromolecules*. Trzecia publikacja, również eksperymentalna, została opublikowana w roku 2025 w międzynarodowym czasopiśmie *Fungal Genetics and Biology*. Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich trzech pracach. Artykuły ukazały się w czasopismach o zróżnicowanym zasięgu, z czego dwa ostatnie mają uznany międzynarodowy charakter i wysoką punktację MEiN. Całość stanowi istotny wkład w rozwój nowoczesnego podejścia do badania regulacji translacji.

Publikacja 1 stanowi aktualne opracowanie przeglądowe dotyczące rosnącego obszaru badań nad specjalizacją rybosomów. Praca w przystępny sposób omawia biologiczne i medyczne znaczenie heterogeniczności rybosomów, ilustrując je przykładami funkcjonalnych konsekwencji zmian w składzie rybosomów. Doktorant szczególną uwagę poświęca regulacyjnej roli rybosomów w translacji, ich specjalizacji wynikającej ze zmienności stechiometrycznej białek rybosomalnych, jak również obecności paralogów tych białek. Przedstawiono dowody na to, że różnice w składzie rybosomów mogą wpływać na rozwój organizmu, a także powstawanie chorób takich jak nowotwory czy niedokrwistość Blackfana-Diamonda. Artykuł ten stanowi ważne teoretyczne tło dla dalszych badań eksperymentalnych dotyczących molekularnej regulacji translacji w odpowiedzi na zmienne warunki środowiskowe. W tym rozdziale warto byłoby uzupełnić kilka informacji, dlatego proszę Doktoranta o odniesienie się do następujących kwestii:

- Czy istnieją dane strukturalne wskazujące bezpośrednio na zmiany konformacyjne całego rybosomu w odpowiedzi na wymianę pojedynczych białek lub ich paralogów?
- Doktorant wskazuje na różnice w poziomie acetylacji pomiędzy paralogami białek rybosomalnych, na przykład, RPL7A/uL30A – hipoacetylowany vs. RPL7B/uL30B – hiperacetylowany. Stopień acetylacji wpływa natomiast na funkcję rybosomu, szczególnie na wybiórczość translacyjną mRNA i odpowiedzi na leki. Czy wiadomo jakie mechanizmy odpowiadają za selektywną acetylację paralogów białek rybosomalnych?

Publikacja 2 to wartościowa praca badawcza, która wnosi istotny wkład do zrozumienia roli heterogeniczności rybosomów w odpowiedzi komórek na stres. Publikacja ta analizuje zmienność składu białkowego rybosomów *S. cerevisiae* w odpowiedzi na dziesięć różnych stresów środowiskowych. Badania przeprowadzono przy użyciu proteomiki (LC-HRMS) oraz testów aktywności translacyjnej (profilowanie polisomowe, znakowanie izotopowe). Zidentyfikowano 74 odrębne białka rybosomalne, z czego 22 wykazywały

statystycznie istotne różnice w ilości, w zależności od rodzaju stresu. Zmiany te dotyczyły głównie białek zewnętrznych, które potencjalnie odpowiadają za oddziaływania rybosomu z innymi czynnikami regulującymi translację. Autorzy pracy ocenili też aktywność translacyjną komórek i wykazali, że w większości przypadków warunki stresowe prowadziły do zmniejszenia liczby polisomów i obniżenia tempa syntezy białek. Wnioski płynące z tej pracy wskazują, że rybosomy drożdży nie są strukturami statycznymi, lecz dynamicznie dostosowują swój skład do warunków środowiskowych. Taka heterogeniczność rybosomów może stanowić jeden z mechanizmów regulacji translacji, umożliwiając komórce szybką adaptację poprzez dostosowanie zestawu produkowanych białek. Wyniki wspierają koncepcję tzw. „kodu rybosomalnego”, zgodnie z którą różne warianty rybosomów mogą się specjalizować w translacji określonych mRNA. Do tej pracy mam następujące pytania:

- Ekspozycja na stres trwała tylko 15 minut. Autorzy argumentują ten wybór odwołując się do wcześniejszych prac, ale czy takie krótkotrwałe zmiany rzeczywiście odzwierciedlają istotne zmiany adaptacyjne?
- W jaki sposób zmierzono dawkę promieniowania UV (120 J/m^2)? Czy Doktorant może podać szczegóły dotyczące źródła promieniowania (typ lampy, długość fali, odległość od próbki, czas naświetlania) oraz metody kalibracji i pomiaru intensywności?
- Większość stresów zmniejsza aktywność translacyjną, ale stres cieplny ją zwiększa. Czy Doktorant ma hipotezę tłumaczącą ten odmienny efekt?
- Zmiany funkcjonalne rybosomów mogą wynikać z modyfikacji potranslacyjnych, nie tylko ilości białek. Czy metoda proteomiczna opisana w publikacji pozwalała na ich detekcję?

Publikacja 3 przedstawia bardzo dokładną analizę zdolności drożdży *S. cerevisiae* do regeneracji po ekspozycji na dziesięć łagodnych, krótkotrwałych stresów abiotycznych (m. in. szok cieplny, promieniowanie UV, stesy osmotyczne, niedobory aminokwasów i cukrów, wysokie pH, warunki beztlenowe). Oceniono żywotność, zdolność do wzrostu oraz zmiany morfologiczne na poziomie pojedynczych komórek przy użyciu nowoczesnej techniki obrazowania – holotomografii. Wyniki wskazują, że odpowiedź drożdży na łagodne stesy środowiskowe jest zróżnicowana, szybka i obejmuje zarówno mechanizmy molekularne, jak też zmiany strukturalne komórek. Publikacja wnosi istotny wkład w zrozumienie złożonej odpowiedzi drożdży na stesy środowiskowe. Zastosowanie holotomografii pozwoliło na dokładną analizę morfologiczną żywych komórek w 3D, bez potrzeby barwienia. Wyniki te odgrywają istotną rolę w badaniach podstawowych nad stresem komórkowym, ale mogą być również wykorzystane w praktyce, w przemyśle fermentacyjnym, do optymalizacji warunków hodowli oraz poprawy wydajności procesów bioprodukcji. Mimo wysokiej jakości

metodologicznej i przejrzystości wyników, można wskazać kilka punktów wymagających doprecyzowania:

- Czy przy badaniu morfologii pojedynczych komórek Doktorant obserwował znaczne różnice między poszczególnymi komórkami w obrębie tej samej próbki?
- Podano, że UV zwiększa masę i objętość kropli lipidowych, mimo że ich liczba spada. Czy istnieją wcześniejsze doniesienia potwierdzające, że komórki drożdży lub innych eukariontów w warunkach stresu ograniczają liczbę kropli lipidowych, jednocześnie zwiększając ich gęstość, aby efektywniej gospodarować zasobami lipidowymi?
- Z pracy wynika, że w warunkach stresu hiperosmotycznego dochodzi do dużej reorganizacji komórki i ograniczenia zasobów energetycznych, a także zahamowanie proliferacji. Co zdaniem Doktoranta bezpośrednio uniemożliwia lub silnie hamuje powstawanie pączków w warunkach stresu hiperosmotycznego?

Wszystkie przedstawione pytania mają na celu lepsze zrozumienie omawianych zagadnień i w żaden sposób nie umniejszają wartości ani jakości merytorycznej rozprawy doktorskiej, którą oceniam bardzo wysoko. Praca została przygotowana z dużym zaangażowaniem i ze szczególnym uwzględnieniem nowoczesnych metod badawczych, co czyni ją zarówno naukowo cenną, jak i inspirującą. Czytałem ją z dużym zainteresowaniem.

Uważam zatem, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska 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 na tej podstawie wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr. inż. Piotra Pietrasa do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



dr hab. Andonis Karachitos