

RECENZJA ROZRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Piotra Jerzego Pietrasa

pt. „Wpływ stresu abiotycznego na heterogeniczność rybosomów i regenerację komórek
Saccharomyces cerevisiae: Analiza aktywności translacyjnej i morfologii”

wykonanej

w Pracowni Modelowych Organizmów Bezkręgowych
przy Instytucie Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

pod kierunkiem dr hab. Kamilli Grzywacz, prof. ICHB PAN

Recenzja została przygotowana na podstawie powołania na recenzenta przez Radę
Naukową Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN z dnia 13 marca 2025 roku.

1. Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Piotra J. Pietrasa jest oparta na zestawie trzech artykułów (dwóch oryginalnych artykułów naukowych i jednej pracy przeglądowej). Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich pracach wchodzących w skład dzieła. Czasopisma, w których ukazały się artykuły, to periodyki uznane i cenione w środowisku naukowym na arenie krajowej (praca przeglądowa) lub międzynarodowej (dwa artykuły oryginalne).

Sama rozprawa doktorska skonstruowana jest zgodnie z nowoprzyjętym systemem, gdzie wspomniane publikacje stanowią jej zasadniczą część. Całość manuskryptu została opatrzona wprowadzeniem do tematu, podsumowaniem, oraz wnioskami. W osobnych podrozdziałach omówiono poszczególne publikacje składające się na dzieło. Każdą z publikacji wchodzących w skład dzieła scharakteryzowano poprzez krótki, ale treściwy komentarz, prezentujący kontekst badań, cel danej pracy, główne wyniki i wnioski. Komentarze są napisane precyzyjnym językiem naukowym, konstruowane zdania są logiczne, a kolejne paragrafy są powiązane.

W rozdziale czwartym zawarto przedmiotowe artykuły naukowe, w których zaprezentowano kompletną metodykę oraz opracowane wyniki wraz z ich omówieniem i dyskusją. Niezbędną dla wykonania recenzji dokumentację uzupełniają oświadczenia Doktoranta, potwierdzone przez Panią Promotor, w których opisano zakres przeprowadzonych przez Niego prac. Syntetyczna charakterystyka dorobku naukowego mgr Pietrasa (przedstawiona w rozdziale pierwszym) pozwala zorientować się w pozostałych dokonaniach naukowych Doktoranta, w tym m.in. w wystąpieniach konferencyjnych, uczestnictwie w wydarzeniach promujących naukę, oraz realizowanych projektach badawczych. Reasumując strukturę rozprawy, stwierdzam, że konstrukcja pracy jest klarowna i logiczna, a dokumentacja kompletna.

Zapoznanie się z rzeczonymi artykułami naukowymi, jak również z załączonymi oświadczeniami o wkładzie w powstanie publikacji, pozwala uznać, że **wkład Doktoranta w przeprowadzenie badań prezentowanych w rozprawie jest wiodący.**

2. Przedmiot rozprawy i uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Pietrasa dotyczy spójnego tematycznie zagadnienia – mechanizmów odpowiedzi *Saccharomyces cerevisiae* na łagodne, przejściowe stresy abiotyczne, ze szczególnym uwzględnieniem 1) heterogeniczności rybosomów w odniesieniu do białek rybosomalnych, 2) zmian w morfologii pojedynczych komórek, 3) aktywności translacyjnej, oraz 4) kinetyce wzrostu populacji komórek w warunkach regeneracyjnych.

We wstępie Doktorant bardzo ciekawie omawia mechanizmy odpowiedzi na stres w komórkach drożdżowych, podając przykłady z obszaru regulacji transkrypcji (sieci regulacyjne zależne od czynnika transkrypcyjnego ogólnej odpowiedzi na stres - Hsp1, MAPK-Hog1 w stresie osmotycznym, Yap w stresie oksydacyjnym, sygnalizację PKA-cAMP w stresie głodu cukrowego, oraz interakcje czynników transkrypcyjnych Msn2/4 z białkami Snf1 oraz TOR/Mtl1, które hamują import Msn2/4 do jądra komórkowego). Następnie Doktorant przechodzi do omówienia mechanizmów odpowiedzi na stres funkcjonujących na etapach post-transkrypcyjnych, w tym na etapie translacji; przy okazji szczegółowo opisuje zmienną strukturę rybosomów powołując się na dane literaturowe dotyczące rozmaitych gatunków, tkanek i stadiów rozwojowych. W zakresie regulacji translacji dostarcza dowodów literaturowych nie tylko z obszaru zmienności w obrębie składu białkowego rybosomów, ale także w związku z regulacyjnym oddziaływaniem krótkich niekodujących fragmentów RNA (rancRNA; ang. ribosome associated noncoding

RNA). Finalnie Doktorant przywołuje przykłady literaturowe wskazujące na zmiany strukturalne i morfologiczne komórek *S. cerevisiae* w odpowiedzi na czynniki stresowe, asocjując określone fenotypy z konkretnymi czynnikami stresowymi.

Rzeczowe wprowadzenie do rozprawy stanowi bardzo przekonujące uzasadnienie podjęcia tej tematyki badawczej. Z zaprezentowanego stanu wiedzy można wywnioskować, że brak jest danych eksperymentalnych jednoznacznie wskazujących, **czy drożdże odpowiadają na stresy abiotyczne modulacją składu białkowego rybosomów** (poza pionierskimi badaniami wskazującymi na zmienność w zależności od źródła węgla). **Wiadomo, że skład ten jest zmienny, ale czy zależny od zadanych warunków stresowych?** Zasadność podjęcia badań w tym zakresie dodatkowo umocowują wyniki zespołu, w którym pracuje Doktorant, wykazujące taką zależność dla rancRNA (poza rozprawą). Dalej Doktorant stwierdza zainteresowanie **odповідzią komórek drożdży na stresy abiotyczne na poziomie morfologii pojedynczych komórek**. Choć tutaj wydaje się, że zależności takie zostały już opisane, zaproponowane podejście metodyczne (o czym później), uzasadnia dalsze badania w tym zakresie. Jednocześnie, w zaprezentowanych dalej publikacjach, Doktorant znacznie poszerza zakres swoich prac, poza ten wspomniany powyżej.

3. Zastosowane podejście metodyczne

Jak Doktorant wskazuje w sekcji '3.3. Główne tezy i osiągnięcia rozprawy doktorskiej', zasadniczym celem pracy doktorskiej było zbadanie szeregu parametrów fizjologicznych, biochemicznych i strukturalnych komórek *S. cerevisiae* po ekspozycji na szereg czynników stresowych.

Zastosowane podejścia metodyczne zaprezentowane w dwóch publikacjach wynikowych, można skrótowo ująć w następujących punktach:

1. Ekspozycja komórek drożdżowych na łagodne, przejściowe czynniki stresowe (P2-IJBM i P3-FGB),
 - Metodycznie cel ten zrealizowano poprzez czasowe (15 min, ustalone na podstawie wcześniejszych publikacji i prac własnych zespołu) narażenie komórek *S. cerevisiae* będących w fazie wzrostu logarytmicznego na działanie 10 łagodnych, przejściowych warunków stresowych: szok cieplny, zimna, wysokiego zasolenia, ekspozycja na promieniowanie UV, warunki beztlenowe, wysokie pH, głód aminokwasowy, głód cukrowy,

szok hipoosmotyczny i szok hiperosmotyczny. Jako marker prawidłowości doboru czasu i intensywności czynnika stresowego zastosowano poziom ekspresji trzech genów markerowych (*HSP12*, *GPD1*, *EXO1*); badany RTqPCR (P3-FGB).

2. Charakterystyka składu białkowego rybosomów (P2; IJBM),

- Metodycznie cel ten zrealizowano poprzez zastosowanie techniki LC-HRMS (spektrometrii mas o wysokiej rozdzielczości, poprzedzonej rozdziałem chromatograficznym LC odpowiednio przygotowanych peptydów). Rybosomy izolowano na drodze ekstrakcji białek ze struktur komórkowych, frakcjonowania przez ultrawierowanie, a peptydy do analizy LC-HRMS poprzez redukcję, alkilację i trypsynowanie. W trakcie analizy danych spektrometrycznych odpowiednio potraktowano dane pochodzące z białek paralogów przy ocenie: 1) stechiometrii danego białka (suma dla obu paralogów), 2) reprezentacji poszczególnych paralogów (dane zebrane na podstawie różnicujących peptydów).

3. Ocena aktywności translacyjnej drożdży po ekspozycji na czynniki stresowe (P2-IJBM),

- W tym obszarze zastosowano dwa protokoły: 1) określenie zasobności frakcji polisomów do monosomów (ultrawierowanie, frakcjonowanie w gradiencie sacharozy i pomiar absorbancji w poszczególnych frakcjach), 2) znakowanie metaboliczne – znakowanie nowo zsyntetyzowanych białek znakowaną izotopowo metioniną (³⁵S-Methionine).

4. Charakterystyka kinetyki wzrostu populacji drożdży uprzednio narażonych na warunki stresowe (P3-FGB),

- W tym obszarze bardzo szczegółowo badano parametry kinetyczne wzrostu populacji komórek w hodowlach regeneracyjnych (po ustaniu czynnika stresowego) w przedziałach 30 min, 4 h i 70 h. W każdym z przedziałów analizowano odmienne parametry i wnioskowano o odmiennych właściwościach. W najkrótszym przedziale – określano czas zrównania gęstości hodowli z hodowlą kontrolną (ang. recovery time), w kolejnym przedziale - czas podwojenia populacji (ang. doubling time), a

w przedziale najdłuższym – długość trwania fazy wzrostu logarytmicznego i stacjonarnej, gęstość hodowli w fazie stacjonarnej. Tutaj bardzo precyzyjnie określono, jak należy rozumieć poszczególne pomiarowane parametry.

5. Charakterystyka zmian strukturalnych, biochemicznych i fizjologicznych drożdży uprzednio narażonych na warunki stresowe na poziomie pojedynczo-komórkowym (P3-FGB),

- W tym zakresie zastosowano cytometrię przepływową w celu oszacowania liczebności martwych komórek (barwienie jodkiem propidyny; IP), a dane potwierdzono stosując podwójne barwienie – komórek martwych i żywych (IP i Hoechst) a następnie obrazowanie przy użyciu mikroskopu konfokalnego.
- Jako novum metodyczne w tej pracy wykorzystano technikę ilościowego, bezznacznikowego obrazowania fazowego z wykorzystaniem mikroskopu holotomograficznego HT-2H, generującego obrazy 2D. Po uwzględnieniu indeksu refrakcji możliwe było skonstruowanie bardzo przydatnych tomogramów 3D. Dzięki zastosowaniu tej techniki, możliwe było nie tylko obrazowanie 3D, ale także ilościowe określenie zawartości dwóch głównych składników komórkowych – całkowitej ilości białek oraz lipidów.

Aby zrealizować założone cele badawcze, Doktorant zastosował szereg zróżnicowanych podejść eksperymentalnych, które w sposób adekwatny odnosiły się do stawianych celów szczegółowych. Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera wyniki dobrze zaplanowanych, wielokierunkowych badań, o bardzo szerokim zakresie metodycznym. Pragnę podkreślić wysoką jakość przeprowadzonych prac badawczych, na którą składają wszechobecne liczne powtórzenia doświadczeń wraz z adekwatną analizą statystyczną, oraz stosowanie alternatywnych podejść eksperymentalnych potwierdzających/pogłębiających uprzednie wyniki (np. cytometria przepływowa i mikroskop konfokalny; profilowanie polisomowe i znakowanie metaboliczne ^{35}S -Met). Łącznie te elementy przyczyniają się do bardzo wysokiej jakości wiarygodnych wyników. Jest to bardzo wysoka wartość tej pracy.

4. Kluczowe osiągnięcia i wnioski uzyskane w toku realizacji pracy

W opinii tego recenzenta, do kluczowych osiągnięć naukowych przedstawionych w rozprawie należą:

- Dostarczenie przekonujących danych eksperymentalnych potwierdzających różnicową inkorporację białek rybosomalnych do rybosomów w odpowiedzi na wybrane warunki stresowe w *S. cerevisiae*. Spośród 74 zidentyfikowanych białek rybosomalnych, 14 (45%) z małej podjednostki i 8 (19%) z dużej podjednostki rybosomalnej wykazywało istotnie zróżnicowaną reprezentację w rybosomach pod wpływem stresu (P2).
- Wykazanie istotnych różnic w stosunku występowania siedmiu (33%) paralogów białek rybosomalnych (spośród 21 par paralogów wykrytych w pracy Doktoranta). W tym zakresie – wykazanie szczególnie drastycznego różnicowego udziału paralogów białek RPS1 i RPS 7 w strukturze rybosomów w zależności od zadanego czynnika stresowego (głód cukrowy, szok cieplny; Fig.3. P2)
- Powiązanie poszczególnych czynników stresowych z molekularną odpowiedzią komórki w zakresie badanych parametrów w toku jednolitego spójnego cyklu eksperymentalnego. W tym zakresie, powiązanie np. i) stresu wysokiego zasolenia ze zwiększeniem reprezentacji 3 białek rybosomalnych w rybosomach (zwłaszcza eL42), ii) ekspozycji na działanie UV i głód cukrowy na niemal całkowite zahamowanie translacji, iii) stresów temperaturowych, pH, anoksji oraz głodu aminokwasowego i cukrowego na utratę integralności powłok komórkowych, iv) ograniczenie pączkowania przy hiperosmolarności, v) kulistej morfologii i małej objętości pączków przy zasoleniu i hipoosmolarności, vi) wykazanie zależności pomiędzy liczbą i objętością wakuoli/ciał lipidowych a ekspozycją na promieniowanie UV, czy stres hiperosmotyczny (tych najbardziej ograniczających przeżywalność *S. cerevisiae*; PI-dodatnich) (P2 i P3).
- Charakterystyka zmian w budowie trój-wymiarowej komórek drożdżowych narażonych na działanie wybranych czynników stresowych, dzięki zastosowaniu holotomografii. W tym zakresie, udokumentowanie, że zmiany morfologiczne indukowane przez czynniki stresowe dotyczą głównie objętości i długości komórek, ale nie sferyczności. Wykazanie, że czynniki stresowe o najdrastyczniejszym działaniu nie powodują zmian w integralności powłok komórkowych, ale przyczyniają się do zaburzeń pączkowania.

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

5. Komentarze

Szczegółowa lektura publikacji składających się na dzieło pozwala na znalezienie odpowiedzi na większość pytań pojawiających się w trakcie czytania streszczonej, polskojęzycznej części rozprawy. Dostarczone dane i interpretacje są przekonujące. Chciałabym jednak zaprosić Doktoranta do podjęcia naukowej dyskusji na poniższe tematy w trakcie publicznej obrony:

1. W moim odczuciu Doktorant w swojej rozprawie wydaje się nieco wymiennie stosować pojęcia 'odpowiedź na warunki stresowe' i 'adaptacja do warunków stresowych'. Czy w opinii Doktoranta każda odpowiedź to adaptacja? Czy w swoich pracach Doktorant badał 'odpowiedź' czy 'adaptację'? Jak technicznie podejść do badania jednego i drugiego?
2. Chciałam poznać **opinię** Doktoranta na temat teorii podwojenia genomu (WGD – whole genome duplication) w filogenezie drożdży (jest to powiązane z obecnością paralogów białek rybosomalnych). Czy Doktorant bardziej skłania się ku teorii, że w genomie *S. cerevisiae* paralogi powstały wskutek podwojenia genomu, czy że najpierw doszło do skrzyżowania dwóch blisko spokrewnionych gatunków, a następna duplikacja była mechanizmem umożliwiającym odzyskanie płodności?
3. Czy sekwencje wstawione (ang. Expansion sequences) w rRNA także podlegają zmianom w odpowiedzi na czynniki środowiskowe? Czy taką zmienność zaobserwowano jedynie dla rancRNA (związane z rybosomami niekodujące RNA)?
4. W badaniach zespołu Prof. Grzywacz, w których Doktorant brał udział, wykazano, że fragmenty RNA powstałe z tRNA (tDR, ang. tRNA-derived fragments) regulują proces translacji w odpowiedzi na czynniki stresowe (tworząc kompleks tDR/rybosom/aminoacylaza tRNA). W naszych badaniach (<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11731-y>) pokazaliśmy, że stres

hiperosmotyczny (3 Osm/kg; 36% sorbitolu) przyczynia się globalnego ograniczenia syntezy aminoacylaz tRNA (relatywnie obniżona reprezentacja ligaz aminoacylo-tRNA) specyficznych dla wielu aminokwasów, jak również białek zaangażowanych w biogenezę rybosomów, oraz czynnika elongacji translacji eEF-1. Oczywiście sposób zadania i intensywność czynnika stresowego są odmienne. Podobnie jak gatunek drożdży. Ale czy Doktorant widzi spójność w tych wynikach, czy raczej uzyskane dane są wykluczające? Jak mógłby wyglądać hipotetyczny mechanizm działania na tym etapie regulacji translacji z udziałem rybosomu-tRNA-aminoacylaza tRNA?

5. Chciałabym też poprosić o komentarz do części technicznej/metodycznej sposobu zadania czynników stresowych. Metodyka implementacji czynników stresowych zastosowana przez Doktoranta jest dla mnie nieintuicyjna (co nie znaczy, że nieprawidłowa). O ile czas ekspozycji na czynnik stresowy został dobrany na podstawie wcześniejszych doświadczeń (zespołu i innych autorów), to dobór intensywności czynnika stresowego nie został wyjaśniony. W jaki sposób zdecydowano, jak dany czynnik wprowadzić (podaż stężonego NaCl czy sorbitolu, buforu o innym pH, zmieszanie mediów o różnych temperaturach). Czy mając już obecne doświadczenie w prowadzeniu takich prac eksperymentalnych, Doktorant wprowadziłby czynniki stresowe w inny sposób?
6. Na jakiej podstawie wybrano gen *EXO1* (P3, FGB) na marker stresu w komórkach drożdżowych?
7. Bardzo wysoko oceniam zastosowanie nowego i ciekawego narzędzia w badaniach nad biochemią/strukturą komórek drożdżowych w odpowiedzi na warunki stresowe (mikroskopia holotomograficzna). Czy przeprowadzono walidację skuteczności holotomografii w szacowaniu/określaniu zawartości białek i lipidów w wyznaczonych strukturach 3D? Czy producent dostarcza takich informacji?

Komentarze pomniejsze: Cel rozprawy podany w rozdziale 3.1 jest zbyt skąpy. W mojej ocenie, Doktorant wykonał znaczenie szerszej zakrojone badania, niż to, co podano w tym rozdziale.

6. Znaczenie badań i posumowanie

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr Piotra J. Pietrasa na uwagę zasługuje bardzo **ciekawa**, jeszcze nienazbyt przebadana **tematyka**, wysoka **jakość** przeprowadzonych **badań**, ciekawe i **kompleksowe** podejście **eksperymentalne**, oraz **waga odkryć**. Niniejsza praca dostarcza dowodów i wyjaśnień, dlaczego powszechnie znane, uproszczone przedstawienie dogmatu o ekspresji genów (DNA-RNA-białko) powinno zostać uzupełnione nie tylko o 'regulacja transkrypcji przez czynniki transkrypcyjne' oraz 'modyfikacje potranslacyjne' (co jest często wprowadzone), ale także 'regulacja translacji przez rybosomy' (zarówno białka jak i rancRNA). Jest to nie tylko bardzo ciekawe, ale i brzemiennie w skutkach, m.in. dla badań aplikacyjnych.

Jest to także pierwszy raz, kiedy spotykam się z koncepcją 'kodu rybosomów', która jest bardzo ciekawa i dostarcza interesujących (i obecnie udokumentowanych) wyjaśnień na temat braku liniowości na drodze transkrypcja-translacja. W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska stanowi merytorycznie wartościowy i nowatorski wkład do światowej nauki. Podjęte w niej zagadnienia są interesujące zarówno dla naukowców pracujących w obszarze biologii molekularnej, biologii komórki, biologii systemów, ale także tych zajmujących się badaniami aplikacyjnymi, jak np. ulepszaniem mikroorganizmów o znaczeniu przemysłowym w kontekście ich wykorzystania do nadprodukcji białek w stresujących warunkach bioprocesu.

7. Wniosek końcowy

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Piotra J. Pietrasa spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadanie stopnia doktora w IChB 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 IChB PAN **o dopuszczenie mgr Piotra J. Pietrasa do dalszych etapów** postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze, w dyscyplinie nauki biologiczne. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną zaprezentowanych badań, oraz doskonałe wymierne skutki pracy naukowej Pana Piotra J. Pietrasa wnoszę o **wyróżnienie** rozprawy.

Poznań, 23-04-2025


.....