Załącznik Nr 3
do Uchwały Nr XXVI-5.23/25
Senatu UMCS
z dnia 29 stycznia 2025 r.

Zgłoszenie tematyki badawczej realizowanej w Instytucie Nauk Biologicznych w czasie kształcenia w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne

Imię i nazwisko promotora/promotorów, tytuł/stopień naukowy, jednostka, adres e-mail	1. Prof. dr hab. Marek Tchórzewski, marek.tchorzewski@mail.umcs.pl, Katedra Biologii Molekularnej, UMCS w Lublinie, dyscyplina: nauki biologiczne
Imię i nazwisko promotora pomocniczego (opcjonalnie), tytuł/stopień naukowy, jednostka, adres e-mail	1. Dr Przemysław Grela, przemysław.grela@mail.umcs.pl, Katedra Biologii Molekularnej, UMCS w Lublinie, dyscyplina: nauki biologiczne
Temat badawczy	Wzajemne oddziaływanie białek inaktywujących rybosomy z rybosomami i białkami rybosomalnymi na poziomie molekularnym i komórkowym
Syntetyczny opis tematyki badawczej (do 300 słów)	Jednymi z najbardziej toksycznych białek znanych w przyrodzie są białka inaktywujące rybosom (ang. *Ribosome Inactivating Proteins*, RIPs), występują one zarówno w roślinach, bakteriach jak i innych organizmach; są obecne w żywności dla ludzi, są także stosowane w etnomedycynie. Ponadto, białka RIP stanowią duże zagrożenie społeczne, z uwagi na fakt, że mogą być wykorzystane jako broń biologiczna. Toksyny te są nie tylko zagrożeniem dla życia i zdrowia człowieka, ale przyciągają one również uwagę ze względu na szerokie możliwości zastosowania biotechnologicznego w medycynie; jednakże, z punktu widzenia ich tzw. biologii, molekularny mechanizm działania tych toksyn wciąż pozostaje nie wyjaśniony. Obecnie przyjęty model działania białek RIP zakłada, że białka te prowadzą depurynację rybosomalnej podjednostki 60S (usuwają jedną zasadę adeninową w pętli sarcyna-rycyna – ang. *Sarcin Ricin Loop*, SRL) - co skutkuje zahamowaniem biosyntezy białka. Uważa się, że blokada syntezy białka leży u podstaw toksyczności białek RIP i jest uważana za główny czynnik śmierci komórki na drodze apoptozy. Należy jednak podkreślić, że nie ma wyraźnego związku pomiędzy depurynacją rybosomu a śmiercią komórki i pomimo wielu lat badań, brak jest obecnie konsensu, co do podstaw wyjaśniających molekularne aspekty toksyczności białek RIP. Zrealizowane prace badawcze w obrębie Katedry Biologii Molekularnej sugerują, że depurynacja rybosomu może mieć inny efekt biologiczny, tj. może indukować tak zwaną odpowiedź na stres rybotoksyczny (ang. *ribotoxic stress response*, RSR), co skutkuje indukcją szlaków sygnałowych prowadzących do apoptozy. Co więcej, nasze obserwacje są również zgodne z ostatnimi odkryciami tzw. zderzających/kolidujących rybosomów (ang. *collided ribosomes*), które działają jako metaboliczny sensor przekazujący informacje do różnych szlaków sygnałowych, niezależnie od blokady

	translacji, a odpowiedź ta jest zależna od intensywności kolizji i poziomu formowania tzw. disomów. Opierając się na wstępnych wynikach i opublikowanych oryginalnych danych głównym celem projektu jest wyjaśnienie na poziomie molekularnym i komórkowym konsekwencji działania białek RIP w komórce eukariotycznej, które prowadzi do ich toksyczności. Nasza hipoteza naukowa postuluje, że RIP zostały ewolucyjnie przystosowane do 'przejęcia' maszynerii translacyjnej organizmów eukariotycznych poprzez interakcje ze specyficznymi dla eukariotów rybosomalnymi białkami P i aktywację kaskady stresu (ISR/RSR) na drodze zależnej od formowania się disomu powstałego po depurynacji SLR. W ramach realizacji projektu proponujemy dwa w pełni uzupełniające się poziomy analityczne. Pierwszy, poziom molekularny *in vitro* – mający na celu zbadanie mechanizmu interakcji między różnymi przedstawicielami rodziny białek RIP a rybosomem (jako głównym celem dla toksyn). Etap ten obejmuje podejścia biochemiczne i biofizyczne (interakcje białko-białko) oraz strukturalne (przy użyciu techniki CryoEM). Postulujemy, że białka RIP, pomimo wysokiego poziomu podobieństwa strukturalnego i aktywności enzymatycznej wykazują zróżnicowanie pod względem powodowanych efektów biologicznych - co może przyczynić się do nowego wykorzystania badanych w projekcie RIP. Drugi, poziom badań to poziom komórkowy *in vivo*, który ma na celu precyzyjne zbadanie odpowiedzi komórkowej w reakcji na pojawienie się w komórce białek RIP. W ramach realizacji tego etapu opracowaliśmy szereg innowacyjnych systemów genetycznych, mających na celu ścisłą, regulowaną kontrolę ekspresji białek RIP w komórkach ssaków wykorzystując m.in. unikalny system ekspresji toksyn pozwalający na precyzyjną kontrolę aktywacji RIP na poziomie post-translacyjnym - system ten oparty jest na podziale białka RIP na dwie odseparowane w przestrzeni i czasie indywidualne połówki (co czyni je nieszkodliwymi dla komórki), które w dalszym etapie (w kontrolowany sposób z wykorzystaniem intein) mogą być łączone do przywrócenia ich pełnej funkcjonalności - toksyczności. Opracowane w projekcie systemy umożliwiają po raz pierwszy, szczegółowe badanie fluktuacji metabolicznych wywołanych przez pojawienie się białek RIP w komórkach ssaków, jednocześnie torując drogę do skutecznego opracowania innowacyjnych i bezpiecznych technologii w medycynie m.in. do tzw. celowanej terapii przeciwnowotworowej.
Dodatkowe wymagania w stosunku do kandydata	- Posiadać tytuł magistra biologii, biologii molekularnej, biochemii lub dziedzin pokrewnych (nie dłużej niż 4 lata). - Posiadać udokumentowaną wiedzę/doświadczenie w co najmniej jednej z następujących dziedzin: biologia molekularna, biochemia i/lub biologia strukturalna. - Posiadać doświadczenie/wiedzę w zakresie ekspresji i oczyszczania białek; znajomość badań strukturalnych (Cryo-EM, krystalografia rentgenowska) będzie uważana za cenną zaletę. - Posiadać wiedzę/szkolenie w zakresie różnych technik, w tym: klonowania genów, elektroforezy agarozowej DNA/RNA, SDS-PAGE, PCR i innych technik badawczych DNA/RNA/białek.

	- Publikacje w recenzowanych czasopismach, staże zagraniczne lub umiejętności dydaktyczne będą traktowane jako dodatkowe atuty.
Wskazanie źródeł i zakresu finansowania stypendium spoza subwencji	Projekt badawczy NCN, OPUS nr.: UMO-2022/45/B/NZ3/02353. Kierownik projektu dr Przemysław Grela „Opracowanie mechanizmu działania białek inaktywujących rybosomy na poziomie molekularnym i komórkowym”.
Temat zgłoszony w ramach odrębnego limitu przyjęć do realizacji projektów badawczych finansowanych ze źródeł zewnętrznych. **TAK/NIE*** ***Skreślić niewłaściwe**	

Supervisor(s): name/surname, degree/title, affiliation, e-mail address	1. Prof. Dr. Marek Tchórzewski, marek.tchorzewski@mail.umcs.pl, Department of Molecular Biology, UMCS in Lublin, discipline: biological sciences
Auxiliary supervisor (optional) affiliation,e-mail address	Dr Przemysław Grela, przemysław.grela@mail.umcs.pl, Department of Molecular Biology, UMCS in Lublin, discipline: biological sciences
Title of research topic	Interplay of ribosome inactivating proteins with ribosome and ribosomal proteins at the molecular and cellular levels
Synthetic description of the research topic (up to 300 words)	One of the most toxic proteins known in nature are the Ribosome Inactivating Proteins (RIPs), which are found in plants, bacteria, and other organisms; they are present in human food and are also used in ethnomedicine. Moreover, RIP proteins pose a high social risk due to the fact that they can be used as biological weapons. These toxins are not only a threat to human life and health but also attract attention due to the wide possibilities of biotechnological application in medicine; however, from the point of view of their so-called biology, the molecular mechanism of action of these toxins remains unclear. Most RIPs are classified as singlechain (type 1) or double-chain (type 2) proteins in which the enzymatically active A chain is linked by a disulfide bond to the B chain (lectin-like), which ensures their highly efficient ability to penetrate into mammalian cells. Therefore, type 2 RIP proteins are substantially more toxic than type 1 RIPs. Within the RIP family, a third class has also been identified, referred to as type 3, which exists as a proenzyme consisting of a single polypeptide that is active only after proteolytic processing. The currently adopted model of the operation of RIP proteins assumes that these proteins depurinate the 60S ribosomal subunit (they remove one adenine base in the Sarcin Ricin Loop, SRL), which results in inhibition of protein biosynthesis. The blockade of protein synthesis is believed to lie at the core of RIP toxicity and is regarded as the main trigger of apoptotic cell death. However, it should be stressed that there is no clear functional link between depurination and cell death, showing the gap in the current knowledge of the molecular aspects of RIP toxicity. The research work carried out in the Department of Molecular Biology suggests that depurination may have a different biological effect, i.e. it may induce the so-called ribotoxic stress response (RSR), which results in the induction of signaling pathways leading to apoptosis. Moreover, our observations are also

	consistent with the recent discoveries of the so-called collided ribosomes, which act as a metabolic sensor that transmits information to various signaling pathways, independent of translation blockage, and the response is dependent on the severity of ribosome collisions. Based on our preliminary results and published original data, the primary objective of the project is to unravel, at the molecular level, the consequences of RIP action that leads to their toxicity in the eukaryotic cell. Our scientific hypothesis postulates that RIPs were evolutionary adapted to highjack the eukaryotic translational machinery by interacting with eukaryotic-specific ribosomal P-proteins and trigger the disome dependent ISR/RSR pathways. Therefore, we are questioning the generally accepted concept that protein biosynthesis inhibition lies at the heart of RIP toxicity. Thus, to achieve the project objectives, two analytical platforms are proposed: 1) structural to cast light on the interaction between RIPs and the ribosome as the primary target for the toxins using structural and biophysics approaches (cryo-EM and protein-protein interactions); 2) cell biology to address the mechanism of RIPs action at the cellular level. We postulate that RIP proteins, despite the high level of their structural similarity and enzymatic activity, show differentiation in terms of their biological effects, which may contribute to a new application of the RIPs proposed in the project. The second part of the project is dedicated to define the physiological impact of RIP activity on the performance of the ribosome in vivo and on the reprogramming of cellular signaling. Within the task, we developed tightly regulated RIP expression systems in the ON/OFF mode to have the toxin in the cell at the right time and in the right amount for time course-analysis of metabolic changes in mammalian cells, i.e. the system is based on splitting of RIPs into two innocuous subunits on their own that can be reunited through the intein re-joining phenomenon into active protein. Such a regulation will allow a time-controlled RIP synthesis, especially the regulation at the post-translational level will enable for the first time studying the metabolic fluctuations caused by RIPs in minute details. It should be underlined that the new tools will not only reveal the biology of RIPs but also open a way for drug discovery. Our approach will provide unique opportunities to study the biology of RIPs; additionally, by controlling toxic proteins inside the cell, it will pave the way for development of safe RIP-based anti-cancer-targeted technologies.
Additional requirements to the candidate	• Hold a master's degree in biology, molecular biology, biochemistry or related fields (not longer than 4 years). • Have proven knowledge/experience in at least one of the following fields: molecular biology, biochemistry and/or structural biology. • Have experience/knowledge in protein expression and purification; knowledge of structural studies (cryo-EM, X-ray crystallography) will be considered as valuable advantage.

	• Have knowledge/training in various techniques including: gene cloning, DNA/RNA agarose electrophoresis, SDS-PAGE, PCR and other DNA/RNA/protein handling techniques. • Publications in refereed journals, any internships abroad, or teaching abilities will be considered as additional advantages.
Sources of scholarship funding, other than subsidy	NCN research project, OPUS no: UMO-2022/45/B/NZ3/02353. Project leader: Dr Przemysław Grela 'Development of the mechanism of action of ribosome inactivating proteins at the molecular and cellular level'.
Subject submitted under a separate admission limit for the implementation of research projects financed from external sources. **YES/NO*** ***Delete inappropriate**	