



Poznań, 05.12.2023

Hanna Dams-Kozłowska, prof. dr hab.  
Katedra Biotechnologii Medycznej  
Zakład Immunologii Nowotworów  
w miejscu

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Marka Kazimierczyka  
pt. "Charakterystyka i funkcja niekodujących RNA uczestniczących w  
rozwoju komórek nerek oraz ich karcinogenezie."

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN z dnia 27 września 2023 roku wykonałam recenzję rozprawy doktorskiej mgr inż. Marka Kazimierczyka. Przedstawiona do recenzji praca doktorska została przygotowana pod kierunkiem dr hab. Jana Wrześcińskiego, prof. ICHB PAN. Praca jest z Dziedziny nauki ścisłe i przyrodnicze oraz Dyscypliny nauki biologiczne. Rozprawa w głównej mierze dotyczy oceny występowania jednego typu niekodującego RNA tzw. cząsteczek tRF w dwóch modelach biologicznych tj. w narządach świni domowej (*Sus scrofa*) oraz w zaproponowanym modelu rozwoju ludzkiej nerki. Dodatkowo wykonano analizę bioinformatyczną w celu wskazania potencjalnej funkcji zidentyfikowanych tRF.

Zasadniczą część rozprawy doktorskiej stanowią dwa artykuły oryginalne opublikowane w dobrze rozpoznawalnych czasopismach z dziedziny biochemia i biologia molekularna znajdujących się w bazie Web of Science Core Collection. Aktualne współczynniki oddziaływania (Impact Factor) tych czasopism wynoszą 3,1 (Biochemical and Biophysical Research Communications) i 5.6 (International Journal of Molecular Sciences). Ponadto do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską załączono dwie publikacje o charakterze przeglądowym, obie opublikowane w International Journal of Molecular Sciences. Prace te przedstawiają najnowsze doniesienia opisujące interakcje i modyfikacje epigenetyczne innej frakcji niekodujących RNA tj. długich niekodujących RNA (lncRNA) z uwzględnieniem ich roli w różnicowaniu komórek i karcynogenezie. Prace wymieniono poniżej.

1. **Marek Kazimierczyk**, Agata Jędruskowiak, Dorota Kowalczykiewicz, Maciej Szymański, Barbara Imiołczyk, Jerzy Ciesiołka, Jan Wrześciński, „tRNA-derived fragments from the *Sus scrofa* tissues provide evidence of their conserved role in mammalian development,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, Dec 10;520(3):514-519, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.062.
2. **Marek Kazimierczyk**, Marta Wojnicka, Ewa Biała, Paulina Żydowicz-Machtel, Barbara Imiołczyk, Tomasz Ostrowski, Anna Kurzyńska-Kokorniak, Jan Wrzesiński, “Characteristics of Transfer RNA-Derived Fragments Expressed

during Human Renal Cell Development: The Role of Dicer in tRF Biogenesis,” International Journal of Molecular Sciences, 2022, Mar 26;23(7):3644, doi: 10.3390/ijms23073644.

3. **Marek Kazimierczyk**, Marta K. Kasprowicz, Marta E. Kasprzyk, and Jan Wrzesinski, “Human Long Noncoding RNA Interactome: Detection, Characterization and Function,” International Journal of Molecular Sciences, 2020, Feb; 21(3): 1027, doi: 10.3390/ijms21031027
4. **Marek Kazimierczyk**, Jan Wrzesinski, “Long Non-Coding RNA Epigenetics,” International Journal of Molecular Sciences, 2021, Jun 7;22(11):6166. doi: 10.3390/ijms22116166.

Ponadto w skład rozprawy doktorskiej wchodzi (i) streszczenie, (ii) wstęp, (iii) cel pracy, (iv) skrótowy opis publikacji, (v) bibliografia, (vi) prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, (vii) życiorys naukowy oraz (viii) oświadczenia autora i autora korespondującego. Na szczególną uwagę zasługuje wstęp, w którym doktorant w bardzo przystępny sposób przedstawia różne formy niekodujących RNA, co niewątpliwie wprowadza w tematykę pracy. Niestety brakuje materiałów uzupełniających, które powinny być dołączone do publikacji pierwszej (doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.062.). W opinii recenzenta brakuje także bardzo ważnego rozdziału, w którym doktorant mógłby przedstawić wnioski wynikające z przeprowadzonych badań. Bardzo proszę, aby mgr inż. Marek Kazimierczyk ustosunkował się do tej uwagi i przedstawił wnioski podczas obrony pracy doktorskiej.

Praca doktorska stanowi kontynuację badań prowadzonych w Zakładzie Biochemii RNA, ICHB PAN pod kierownictwem dr hab. Jana Wrzeńskiego, które dotyczą charakterystyki niekodujących RNA w modelu świni domowej. Wcześniejsze badania wysokoprzepustowego sekwencjonowania i analizy bioinformatycznej biblioteki małych niekodujących RNA (sncRNA) wykazały występowanie trzech frakcji takich jak piRNA, miRNA i tRF w gonadach żeńskich i męskich organizmu modelowego. Wykrycie frakcji tRF stanowiło inspirację do dalszych badań. W publikacji pierwszej zatytułowanej „tRNA-derived fragments from the *Sus scrofa* tissues provide evidence of their conserved role in mammalian development,” mgr inż. Marek Kazimierczyk kontynuował badania i potwierdził eksperymentalnie wyniki analiz bioinformatycznych. Stosując metodę Northern blot wykazał, że 5'tRF<sub>Gly</sub>(GCC), 5'tRF<sub>Val</sub>(CAC) i 5'tRF<sub>His</sub>(GUG) były najczęściej występującymi tRF w jajnikach świni domowej. Następnie zadał pytanie czy zidentyfikowane tRF są obecne także w innych tkankach świni. Analiza bioinformatyczna oraz eksperymentalna przy użyciu metody Northern Blot materiału pochodzącego z żołądka, wątroby, serca, płuc, nerek, mózgu i mięśni wykazała, że podobny do jajników profil tRF był tylko w nerkach. Dwa tRF wywodzące się z dojrzałych tRNA<sub>Val</sub>(CAC) i tRNA<sub>Gly</sub>(GCC) zostały wykryte w dużych ilościach w obu narządach. Zjawisko to nie zostało wyjaśnione, ale zasugerowano, że może to być związane z przechodzeniem wspólnej ścieżki rozwojowej. Oba narządy wywodzą się z mezodermy pośredniej. Ponadto w czasie rozwoju embrionalnego gonady i nerki są położone obok siebie oraz korzystają z tego samego przewodu prowadzącego. Dodatkowo w pracy tej analizowano interakcję cząsteczki tRF<sub>Val</sub>(CAC) z domeną PAZ białka PIWIL4. W pierwszej kolejności wyprodukowano domenę PAZ w bakteryjnym systemie ekspresyjnym,

oczyszczono ją, a następnie wykorzystano do analizy wiązania tRF. Wyniki uzyskane za pomocą metody EMSA, wykazały, że domena PAZ efektywnie wiąże tRFVal(CAC). Jako że, w przypadku komórek ludzkiego raka piersi MDA-MB-231 wykazano udział kompleksów 5'tRF<sub>Gly</sub>(GCC)/PIWIL4 i 5'tRF<sub>Val</sub>(CAC)/PIWIL4 w regulacji translacji, wykazanie podobnego wiązania w ocenianej pracy może wskazywać na znaczenie funkcjonalne badanego tRF. Jednak wymaga to dalszych badań. Uzyskane wyniki były podstawą do prowadzenia bardziej szczegółowych badań nad znaczeniem tRF w komórkach nerki.

W drugiej publikacji zatytułowanej "Characteristics of Transfer RNA-Derived Fragments Expressed during Human Renal Cell Development: The Role of Dicer in tRF Biogenesis" analizowano występowanie cząsteczek tRF w różnych etapach rozwoju komórek nerek oraz prowadzono analizy w celu poznania ich potencjalnej funkcji. W pracy zaproponowano bardzo uproszczony komórkowy model rozwoju nerki ludzkiej, na który składały się cztery linie komórkowe mające reprezentować różne etapy rozwoju nerki. Model zawierał komórki: hESC (komórki macierzyste), HEK293T (komórki embrionalne nerkowe), HK-2 (komórki kompletnie wykształconej nerki) oraz A-498 (komórki nowotworowe nerki). W pracy wykonano sekwencjonowanie bibliotek małych niekodujących RNA pochodzących z każdej linii komórkowej oraz analizę bioinformatyczną uzyskanych wyników. Najwięcej zidentyfikowanych cząsteczek tRF wykazano swoistych dla komórek hESC (421) i A498 (393), najmniej dla komórek HK-2 (11), a wszystkie typy komórek wykazywały 286 wspólnych tRF. Największą grupę wspólnych cząsteczek tRF wykazano dla komórek hESC, HEK293T i A498 (575 wspólnych tRF), a drugą grupę pod względem liczby wspólnych tRF stanowiły komórki hESC i A498 (368 wspólnych tRF). Wyniki analiz bioinformatycznych wskazały, że w całym modelu najliczniej występowały cząsteczki tRF pochodzące z tRNA: Gly(CCC), Val(AAC), Arg(CCU). Dane zostały zweryfikowane za pomocą metody Northern blot wykorzystując sondy pozwalające na późniejszą identyfikację sekwencji i identyfikatorów poszczególnych tRF w bazie tRFdb. Uzyskane informacje posłużyły do wyszukania potencjalnych celów tj. sekwencji mRNA w bazie danych tRFTars. Wśród sekwencji mogących oddziaływać z zidentyfikowanymi tRF były mRNA kodujące białka związane z biologią komórek nerki u człowieka. Dodatkowo, analizując metodą Northern blot materiał pozyskany z komórek HEK293T z i bez ekspresji genu kodującego białko DICER, mgr inż. Marek Kazimierczyk potwierdziły znaczenie tego białka w powstawaniu cząsteczek tRF.

Kolejne dwie publikacje to prace przeglądowe. Praca zatytułowana "Human Long Noncoding RNA Interactome: Detection, Characterization and Function" dotyczy innej klasy niekodujących RNA tj. lncRNA i opisuje ich interakcje wraz z technikami pozwalającymi na badania interakcji lncRNA z biologicznymi molekułami. Natomiast publikacja zatytułowana "Long Non-Coding RNA Epigenetics" dotyczy modyfikacji epigenetycznych lncRNA. W pracach tych także zwarto wątki związane ze znaczeniem badanych zjawisk w kontekście funkcji danego lncRNA z uwzględnieniem ich roli w różnicowaniu komórek i karcynogenezie.

We wszystkich pracach mgr inż. Marek Kazimierczyk jest pierwszym autorem, a promotor dr hab. Jan Wrzesiński jest ostatnim (ang. *senior author*) i korespondencyjnym autorem. Pozycja jako pierwszy autor wskazuje na wiodącą rolę doktoranta w powstaniu

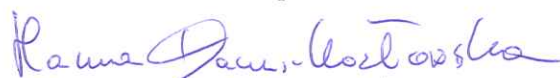
publikacji. Dodatkowo do wniosku załączono oświadczenia doktoranta i promotora (autor korespondujący), które potwierdzają znaczący udział mgr inż. Marka Kazimierczyka w prowadzonych badaniach i powstawaniu manuskryptów. Obie publikacje oryginalne są tematycznie spójne i uzupełniają się wzajemnie i w opinii recenzenta są wystarczające do ubiegania się o stopień doktora. Przedstawione dwie prace przeglądowe można traktować jako wartość dodaną do doktoratu. Prace te dotyczą niekodujących RNA (ncRNA) i zawierają wątki związane z funkcją ncRNA w różnicowaniu komórek i karcynogenezie. Jednakże dotyczą innej klasy ncRNA niż ta, nad którą prowadzono badania w pracach oryginalnych, a także nie nawiązują do rozwoju komórek nerek oraz ich karcynogenezy.

Oceniana rozprawa doktorska dotyczy bardzo aktualnego tematu związanego z funkcją niekodujących RNA. Biorąc pod uwagę, „że 80% genomu ulega transkrypcji, a jednak tylko 2% koduje białka,” pozostała część transkryptomu zapewne nie jest nieistotna. W pracy pogłębiono wiedzę głównie w zakresie występowania tRF w różnych tkankach świni domowej ze wskazaniem na podobny profil tRF w gonadach i nerkach. W związku z tym, iż gonady i nerki wywodzą się ze wspólnej ścieżki rozwojowej, zaproponowano, że podobny profil tRF może być z tym związany. Jednak zaznaczono, że wymaga to dalszych badań z czym recenzent zdecydowanie się zgadza. Dodatkowo wpływ tRF na procesy różnicowania i karcynogenezy badano w modelu komórkowym rozwoju ludzkiej nerki i w komórkach raka nerki. Szkoda, że w modelu zastosowano tylko po jednej linii komórkowej reprezentującej poszczególne „etapy” rozwoju. Chociaż zaproponowany model jest bardzo uproszczony, otrzymane wyniki wskazują, że tRFGly(CCC) and tRFVal(AAC) potencjalnie mogą oddziaływać z mRNA kodujących białka odgrywające rolę w biologii komórek nerki. Osiągnięcie stanowi bardzo istotny punkt wyjściowy do dalszych badań. Celem prowadzonych badań „była charakterystyka występowania cząsteczek tRF w zaproponowanym modelu komórkowym rozwoju nerki i wskazanie ich potencjalnej funkcji,” co zostało osiągnięte. Należy zwrócić uwagę na fakt, że otrzymane wyniki są bardzo często cytowane przez środowisko naukowe. Artykuł mgr inż. Marka Kazimierczyka przedstawiający powyższe wyniki został opublikowany w marcu 2022. Jak dotąd praca była cytowana już 10 razy (bez autocytowań). Ponadto dużą wartość stanowi także publikacja przeglądowa opisująca lncRNA interaktom opublikowana w lutym 2020 roku. Chociaż w opinii recenzenta praca ta stanowi wartość dodaną do pracy doktorskiej, należy także podkreślić wagę tej publikacji. Jak dotąd artykuł ten był cytowany 105 razy. Niewątpliwie świadczy to o dużej wadze podejmowanych tematów badawczych.

Mgr inż. Marek Kazimierczyk w publikacji zatytułowanej “Characteristics of Transfer RNA-Derived Fragments Expressed during Human Renal Cell Development: The Role of Dicer in tRF Biogenesis” określił fakt występowania największej wspólnej grupy cząsteczek tRF dla komórek hESC, HEK293T i A498 (575 wspólnych tRF) jako interesujące. Jak już wspomniałam powyżej, drugą dużą grupę stanowiły tRF wspólne dla komórek hESC i A498 (368 wspólnych tRF). Bardzo proszę o rozwinięcie tego wątku podczas obrony pracy doktorskiej z uwzględnieniem cech charakterystycznych dla komórek nowotworowych (Hallmarks of Cancer), których zestaw zostały rozszerzony w 2022 roku.

Na podstawie przedłożonej do oceny Rozprawy stwierdzam, że Doktorant osiągnął poziom dojrzałości naukowej, który pozwala mu na ubieganie się o stopień doktora. Przedstawiona 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.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 56/2023/Internet z dnia 29 marca 2023 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr inż. Marka Kazimierczyka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Z poważaniem,



Hanna Dams-Kozłowska

