



prof. dr hab. Mikołaj Olejniczak

Pracownia Biochemii RNA

22 listopada 2023, Poznań

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marka Kazimierczyka
zatytułowanej**

**"Charakterystyka i funkcja niekodujących RNA uczestniczących w rozwoju
komórek nerek oraz ich karcinogenezie"**

Praca doktorska Pana mgr inż. Marka Kazimierczyka została wykonana pod opieką Pana Prof. IChB dr hab. Jana Wrzesińskiego w Zakładzie Biochemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Temat rozprawy doktorskiej jest ściśle związany z zainteresowaniami naukowymi promotora pracy, które dotyczą struktury i funkcji cząsteczek kwasów rybonukleinowych, w tym m.in. cząsteczek transferowych RNA.

Głównym tematem badań wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest identyfikacja, charakterystyka i porównanie występowania fragmentów tRNA (tRF) w tkankach *Sus scrofa* oraz w czterech liniach komórkowych wybranych jako model rozwoju nerek człowieka, jak również zaproponowanie funkcji biologicznych tych tRF. Rozprawę stanowi zbiór czterech publikacji, z których dwie to prace eksperymentalne. Badania nad występowaniem fragmentów tRNA w tkankach *S. scrofa* oraz ich oddziaływaniami z domeną PAZ białka PIWI zostały opublikowane w czasopiśmie *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2019). Natomiast badania nad występowaniem fragmentów tRNA w liniach komórkowych odpowiadających stadium rozwojowym nerek zostały opublikowane w *International Journal of Molecular Sciences* (2022). Ponadto w skład rozprawy wchodzi dwie prace przeglądowe dotyczące właściwości długich niekodujących RNA, ich funkcji biologicznych oraz roli w procesach chorobotwórczych, które również zostały opublikowane w *International Journal of Molecular Sciences* (2020, 2021). Oświadczenia promotora pracy precyzują udział Doktoranta w tych publikacjach.

Tematem pierwszej z prac wchodzących w skład rozprawy jest analiza występowania fragmentów tRNA w tkankach *S. scrofa*, w oparciu o dane



sekwencjonowania otrzymane uprzednio w zespole macierzystym Doktoranta. Doktorant wykonał analizę występowania oraz długości fragmentów tRNA^{Val}(CAC) przy pomocy metody *Northern blot* z zastosowaniem oligonukleotydów komplementarnych do 5' końcowej albo 3' końcowej części tRNA. Spośród badanych tkanek *S. scrofa* najsilniejszy sygnał dla tego tRNA stwierdzono w nerkach. Doktorant oszacował rozmiar fragmentów 5'-końcowych na 34 i 35 nt, a fragmentów 3'-końcowych na 43 i 44 nt, co sugeruje miejsca przecięcia w pętli antykodonowej tego tRNA. Oszacowanie wielkości fragmentów było wykonane poprzez porównanie ich migracji w żelu poliakrylamidowym do migracji składników komercyjnie dostępnego markera mas RNA. Chciałbym zapytać Doktoranta, czy jego zdaniem lepszą metodą nie byłoby porównanie do migracji produktów degradacji w warunkach alkalicznych tego samego tRNA jak badane oraz produktów hydrolizy tego tRNA RNazą T1 dla oznaczenia wielkości fragmentów? Czy Doktorant porównał dokładność oznaczania wielkości fragmentów tRNA przy zastosowaniu odczynnika komercyjnego i przy zastosowaniu produktów degradacji badanej cząsteczki tRNA?

W następnym etapie prac Doktorant wykonał analizę bioinformatyczną, której celem było porównanie obecności tRF w jajnikach oraz nerkach *S. scrofa*, po czym określił metodą *Northern blot* zawartość tRF względem tRNA pełnej długości dla tRF^{Val}(CAC), tRF^{Gly}(GCC), tRF^{Lys}(CUU), oraz tRF^{Glu}(UUC) w ośmiu tkankach *S. scrofa*. Doktorant zaobserwował znacznie wyższą zawartość analizowanych tRF w nerkach niż w pozostałych badanych tkankach.

Ponieważ w poprzednich badaniach stwierdzono oddziaływanie tRF pochodzących z ludzkich linii komórkowych z białkiem PIWIL4 Doktorant podjął się sprawdzenia czy oddziaływania takie mogą być też cechą tRF z *S. scrofa*. W tym celu Doktorant przygotował konstrukty do nadekspresji białek PIWIL1, PIWIL2 i PIWIL4. Otrzymanie pełnej długości białek okazało się jednak niemożliwe. Natomiast sukcesem zostały uwieńczone prace mające na celu uzyskanie samej izolowanej 140-aminokwasowej domeny PAZ z białka PIWIL4. Doktorant zbadał wiązanie tej domeny do RNA reprezentujących klasy piRNA, miRNA oraz tRF, którymi były piRNA 6/92, miRNA 106 oraz tRF^{Val}(CAC), za pomocą metody różnicowej migracji w polu elektrycznym. Wyniki tych badań pokazały, że zarówno badana cząsteczka piRNA jak i tRF były wiązane przez izolowaną domenę PAZ z oszacowaną wartością równowagowej stałej dysocjacji (K_d) w zakresie mikromolowym. Fakt, że miRNA 106 słabiej wiązało



domenę PAZ w badanym zakresie stężeń białka potwierdza specyficzność oddziaływań piRNA 6/92 oraz tRF^{Val}(CAC). Ponieważ jednak w publikacji nie opisano w jaki sposób analizowano dane wiązania oraz jak obliczono wartość K_d chciałbym poprosić Doktoranta o wyjaśnienie tego podczas obrony. Szczególnie interesuje mnie w jaki sposób uwzględniono różne kompleksy powstające podczas wiązania w obliczaniu wartości K_d , oraz jak interpretowano co reprezentują te kompleksy? Ponadto obrazy żeli w publikacji (Ryc. 3 w publikacji oraz Ryc. 5 we wprowadzeniu o rozprawie) nie zawierają oznaczeń określających zakres stężeń białka, co utrudnia ich interpretację.

W drugiej z prac eksperymentalnych Doktorant badał występowanie tRF w czterech liniach komórkowych pochodzących z komórek nerek człowieka. Doktorant zidentyfikował fragmenty tRNA występujące w tych czterech typach komórek i stwierdził, że wzór występowania cząsteczek tRF w dojrzałych komórkach nerek różnił się od wzorów występowania tRF w liniach komórkowych pochodzących z wczesnych stadiów rozwojowych oraz z komórek nowotworowych. Nie rozumiem jednak z czego wynika wniosek zawarty w publikacji, że największa liczba fragmentów tRNA występuje w komórkach HK-2 (strona 4 publikacji w odniesieniu do ryc. 1)? We wprowadzeniu do rozprawy (str. 23) jest jednak inny wniosek w tej kwestii. Doktorant stwierdził ponadto, że w badanych komórkach najczęściej występują fragmenty tRF^{Gly}, tRF^{Val} i tRF^{Arg}. Aby określić miejsca przecinania tRNA Doktorant zastosował metodę *Northern blot* do analizy fragmentów tRF^{Gly}(CCC), tRF^{Val}(AAC), oraz tRF^{Arg}(CCU). Wzory przecinań różniły się zależnie od rodzaju tRNA oraz typu linii komórkowej. W dodatkowych badaniach Doktorant stwierdził, że wzór przecinania tRNA zmienia się w komórkach pozbawionych genu kodującego enzym Dicer. Na podstawie braku w tych komórkach fragmentów pochodzących z przecinania tRNA w pętli D zaproponował, że Dicer uczestniczy w biogenezie cząsteczek tRF. Ponadto Doktorant zaproponował funkcje biologiczne zidentyfikowanych fragmentów tRNA na podstawie ich analizy za pomocą oprogramowania tRFTars. Chciałbym poprosić o wyjaśnienie podczas obrony pracy w jaki sposób zastosowane oprogramowanie przypisuje fragmentom tRF funkcje biologiczne? Czy identyfikacja regionów komplementarnych uwzględnia tylko sekwencję powstałych tRF, czy także ich przewidywaną strukturę drugorzędową, która może determinować dostępność sekwencji dla wiązania komplementarnych RNA?



W skład rozprawy wchodzi także dwie prace przeglądowe. W pierwszej z nich Doktorant omówił pochodzenie i funkcje biologiczne długich niekodujących RNA (lncRNA), a w drugiej przedstawił stan wiedzy na temat modyfikacji potranskrypcyjnych wprowadzanych do lncRNA. Prace te w przystępny sposób wprowadzają czytelnika w zagadnienia związane ze strukturą i funkcją tej ważnej grupy regulatorowych RNA.

Rozprawa doktorska jest także zaopatrzona we wprowadzenie literaturowe oraz krótkie omówienia najważniejszych wyników publikacji wchodzących w jej skład. Wprowadzenie przystępnie przedstawia stan wiedzy na temat niekodujących RNA u eukariontów, w tym na temat ich biogenezy. Szczególnie dokładnie przedstawione są pochodzenie, struktura i funkcje cząsteczek tRF. Ponadto, Doktorant omówił najważniejsze wnioski prac wchodzących w skład rozprawy. Język pracy jest jasny i logiczny, jednak zdarza się stosowanie żargonu, np. „tRFy” (str. 16), „wyrażanie cząsteczek tRF” (str. 22). Ponadto, ryciny pracy są określane przy użyciu słowa „Figura” (podpisy pod rycinami oraz w tekście na str. 22). W opisie końców 5' i 3' części jest stosowany apostrof niż symbol prim. Występują też nieliczne błędy stylistyczne, np. „Uzyskane wyniki prążki pogrupowałem” (str. 23).

Podsumowując, w swojej pracy Doktorant przeprowadził analizę występowania fragmentów tRNA w tkankach *S. scrofa* oraz ludzkich liniach komórkowych, co doprowadziło go do uzyskania wniosków pozwalających na lepsze poznanie ich struktury, występowania oraz biogenezy, co jest ważne dla zrozumienia mechanizmów regulacji ekspresji genów w komórkach eukariotycznych.

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 wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pana mgr inż. Marka Kazimierczyka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych.


Mikołaj Olejniczak