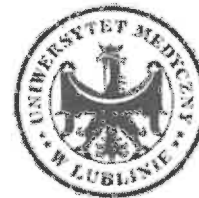


Prof. dr hab. n. med. Agata A. Filip
Zakład Genetyki Nowotworów
z Pracownią Cytogenetyczną
Uniwersytet Medyczny w Lublinie



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marka Kazimierczyka
„Charakterystyka i funkcja niekodujących RNA
uczestniczących w rozwoju komórek nerek oraz ich karcinogenezie”,
przygotowanej pod kierunkiem naukowym dr hab. Jana Wrześcińskiego, prof. ICHB PAN.**

Recenzję sporządzono w oparciu o decyzję Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN z dnia 27 września 2023 r roku oraz przepisy:

1. Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. z 2017 roku, poz. 1789),
2. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1669) oraz
3. Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. *w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora* (Dz. U. z 2018 roku, poz. 261).

Opinia ogólna

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska przygotowana przez Pana magistra Marka Kazimierczyka jest opracowaniem, które należy ocenić bardzo pozytywnie. Podjęty przez Doktoranta temat jest aktualny i istotny dla rozwoju wiedzy o niekodujących cząsteczkach RNA i ich udziale w molekularnych mechanizmach rozwoju i onkogenezy.

Rozwijające się w ostatnich dekadach techniki badań molekularnych pozwoliły na dokonanie przełomu – poznanie sekwencji genomu ludzkiego, co wiąże się z wieloma odkryciami i spektakularną zmianą paradygmatów genetyki. Dotyczy to nie tylko znacznie

mniejszej niż sądzono liczby genów kodujących białka, a przede wszystkim rozmiaru genomu zaangażowanego w powstawanie tak zwanych niekodujących cząsteczek RNA. Kolejne badania pokazały, że do grupy funkcjonalnych RNA poza mRNA należy olbrzymia liczba molekuł różniących się biogenezą, wielkością cząsteczki i funkcją. Odkrycie komórkowych miRNA i ich roli w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów było zaledwie wierzchołkiem góry lodowej i początkiem listy, do której dopisywano kolejno miRNA krążące, miRNA cyrkularne, siRNA, długie, niekodujące RNA (lncRNAs), piRNA czy też małe RNA wywodzące się z transferowego RNA (tRFs i tiRNAs). Istotny udział tych cząsteczek we wszystkich procesach zachodzących w komórce sprawia, że mają one kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, a ich zaburzenia przekładają się na zmiany patologiczne. Badania małych, niekodujących RNA mają więc nie tylko znaczenie poznawcze, przyczyniają się także do odkrycia nowych czynników diagnostycznych, prognostycznych oraz możliwych celów nowoczesnych terapii.

Głównym celem ocenianej rozprawy doktorskiej było poznanie wpływu niekodujących RNA na rozwój nerek. Cel ten Doktorant realizował analizując profil występowania cząsteczek tRF w różnych organach zwierzęcia modelowego jakim był *Sus scrofa* oraz badając możliwość interakcji cząsteczki tRF z białkami Piwi. Kolejnym etapem była charakterystyka występowania cząsteczek tRF w zaproponowanym modelu komórkowym rozwoju nerki oraz poznanie ich potencjalnej funkcji. Ostatnią częścią badań było zgromadzenie aktualnych informacji dotyczących interakcji lncRNA oraz charakterystyka modyfikacji epigenetycznych lncRNA i analiza zebranych informacji w kontekście różnicowania i rozwoju komórki.

Wchodzący w skład rozprawy cykl prac wraz z ich omówieniem stanowi dowód szerokiej znajomości najnowszej literatury przedmiotu i biegłości Autora w projektowaniu i prowadzeniu badań, obserwacji i analizie danych. Całość pracy jest przemyślana i przedstawiona w sposób uporządkowany, co pokazuje dojrzałość naukową Doktoranta.

Ocena szczegółowa

Na dysertację składają się cztery publikacje o łącznym współczynniku wpływu IF 20.717. Wśród nich znajdują się dwie prace oryginalne – pierwsza z nich, *tRNA-derived fragments from the Sus scrofa tissues provide evidence of their conserved role in mammalian development*, została opublikowana w Biochemical and Biophysical Research Communications. Praca druga, *Characteristics of Transfer RNA-Derived Fragments Expressed*

during Human Renal Cell Development: The Role of Dicer in tRF Biogenesis, podobnie jak dwie prace przeglądowe *Human Long Noncoding RNA Interactome: Detection, Characterization and Function*, oraz *Long Non-Coding RNA Epigenetics* zostały opublikowane w *International Journal of Molecular Sciences*. Warto zwrócić uwagę, że Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich publikacji.

Rozprawa liczy 119 stron i ma typowy układ rozdziałów: Spis treści, Wykaz prac wchodzących w skład pracy doktorskiej, Streszczenie po polsku i po angielsku, Wstęp, Cel naukowy, Skrótowy opis przedstawionych prac, Bibliografia, Publikacje wchodzące w skład rozprawy, Życiorys naukowy i Oświadczenia Autora oraz Oświadczenia autora korespondencyjnego.

We Wstępie Doktorant przedstawia krótką historię odkrywania niekodujących RNA i ogólny ich podział, następnie charakteryzuje bardziej szczegółowo grupę snRNA z uwzględnieniem siRNA, miRNA, piRNA oraz tsRNA. Omówiona jest biogeneza, struktura i funkcja tych cząsteczek, ich wpływ na różnorodne procesy komórkowe i próby wykorzystania mechanizmu interferencji RNA w terapii. Duża swoboda, z jaką prezentowane są informacje świadczy o dobrej orientacji Doktoranta w rozległej (110 cytowanych pozycji) literaturze przedmiotu. Ten rozdział może z powodzeniem być opublikowany jako praca przeglądowa, dotycząca niekodujących RNA, zwłaszcza, że niewiele takich publikacji dostępnych jest w języku polskim. Warto byłoby tylko poprawić kilka błędów edytorskich, które znalazły się w tekście. Opis uzupełniają kolorowe ryciny, niektóre zapożyczone bezpośrednio z cytowanych artykułów (na przykład Figura 1 i 2) – być może ich autorzy wyrazili zgodę na taki przedruk – nie znalazłam w tekście informacji na ten temat.

Cel naukowy pracy, jakim jest poznanie wpływu niekodujących RNA na rozwój nerek, był realizowany w kilku etapach. Każdy z nich przedstawiony jest we włączonej w cykl publikacji, które Autor krótko streszcza w swoim omówieniu. Oczywistym jest, że każda z publikacji stanowi autonomiczną całość, a prace oryginalne zawierają dyskusję i wnioski, mnie brakuje jednak w dysertacji krótkiego podsumowania i odniesienia całości uzyskanych – bardzo ciekawych - wyników do zamierzonego celu badawczego.

Pierwsza z prac, *tRNA-derived fragments from the *Sus scrofa* tissues provide evidence of their conserved role in mammalian development*, przedstawia wyniki profilowania ekspresji cząsteczek tRF w tkankach *Sus Scrofa*. Metodą Northern blottingu z sondami znakowanymi izotopowo potwierdzono ich obecność w komórkach żołądka, wątroby, serca, płuc, nerek,

mózgu i mięśni. Podobny profil ekspresji tRF stwierdzono w gonadach i nerkach. Wykorzystując metodę analizy opóźnienia tempa migracji kompleksów nukleoproteidowych w żelu poliakrylamidowym (EMSA) udowodniono także występowanie interakcji pomiędzy domeną PAZ białka Piwil4 i tRFVal(CAC), co może mieć istotne znaczenie dla funkcji tych ostatnich cząsteczek.

Druga publikacja, *Differential expression of transfer RNA-derived fragments (tRF) during renal cell development. The role of Dicer in tRF biogenesis*, to efekty badań prowadzonych na modelu nerki ludzkiej, skomponowanym z czterech różnych linii komórkowych, reprezentujących poszczególne etapy jej rozwoju. Były to komórki hESC (komórki macierzyste), HEK293T (komórki embrionalne nerkowe), HK-2 (komórki kompletnie wykształconej nerki) oraz A-498 (komórki nowotworowe nerki). Przeprowadzono sekwencjonowanie specjalnie przygotowanych bibliotek małych RNA pochodzących z każdej linii komórkowej, a następnie analizę bioinformatyczną wyników ze szczególnym uwzględnieniem cząsteczek tRF. Wyniki tej analizy potwierdzono metodą Northern blotting. Najwyższy poziom ekspresji w badanym modelu opisano dla tRFGly, tRFVal i tRFArg. Ciekawa obserwacja dotyczyła cząsteczek tRF wspólnych dla poszczególnych linii komórkowych – była ona najwyższa dla linii komórek macierzystych i nowotworowych. W kolejnym etapie, z pomocą narzędzi bioinformatycznych oraz przeglądu literaturowego opracowano tabelę potencjalnie możliwych oddziaływań zidentyfikowanych cząsteczek tRF na transkrypty białek zaangażowanych w rozwój i różnicowanie komórek nerek u człowieka. Dodatkowo, wykorzystując komórki HEK293T pozbawione genu dla białka Dicer udowodniono jego rolę w powstawaniu cząsteczek tRF z pętli D tRNA.

Kolejna praca, *Long Noncoding RNA Interactome: Detection, Characterization and Function*, to publikacja przeglądowa, w której zebrano dostępną wiedzę na temat lncRNA. W pracy przedstawiono pojęcie "interaktomu lncRNA" oraz zaproponowano techniki badawcze do badania tych interakcji. Rozwijając koncepcję interaktomu lncRNA, uwzględniono różne klasy RNA, zarówno kodujące, jak i niekodujące, DNA, białka, związki niskocząsteczkowe oraz krótkie peptydy. W kontekście oddziaływań lncRNA z RNA, szczególną uwagę poświęcono interakcjom z miRNA i mRNA.

Cykl zamyka publikacja zatytułowana *Long Non-Coding RNA Epigenetics*. Przedstawia ona obecny stan wiedzy o modyfikacjach epigenetycznych lncRNA. Autorzy wskazują, iż modyfikacje nukleotydów angażują 3 typy białek. Wprowadzanie zmian epigenetycznych

następuje za pośrednictwem enzymów zwanych *writers*. Zmiany wprowadzone do sekwencji odczytywane są przez białka zwane *readers*, a usuwane być mogą za pośrednictwem enzymów zwanych *erasers*. Wśród modyfikacji najczęściej występują cztery: 6-metyloadenozyna (m^6A), 5-metylocytydina (m^5C), pseudourydyna (Ψ) oraz inozyna (I). Opisane są metody wykorzystywane do badania takich modyfikacji – od historycznej chromatografii bibułowej do nowoczesnej chromatografii cieczonej połączonej ze spektrometrią mas, czy też sekwencjonowania NGS. Autorzy zwracają uwagę na fakt, iż modyfikacje epigenetyczne lncRNA mogą w istotny sposób wpływać na ich funkcję, co ma istotne znaczenie w wielu procesach, takich jak różnicowanie komórek czy proces onkogenezy.

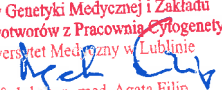
W podsumowaniu mogę stwierdzić, że praca doktorska Pana mgr Marka Kazimierczyka jest nowatorska, ciekawa i wartościowa z merytorycznego punktu widzenia. Obserwacje, których dokonał Doktorant, są cenne poznawczo. Może to przyczynić się do dalszych studiów nad rolą niekodujących RNA w mechanizmach rozwoju i karcynogenezy.

Konkluzja

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.), 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.). Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pana mgr Marka Kazimierczyka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie, mając na względzie nowatorski charakter badań, nakład pracy konieczny do ich przeprowadzenia oraz znaczenie poznawcze dysertacji wnioskuję o jej wyróżnienie.

Lublin, 3.12.2023

KIEROWNIK
Katedry Genetyki Medycznej i Zakładu
Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Prof. dr hab. n. med. Agata Filip

