



dr hab. Łukasz Wolko, prof. UPP
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań

Poznań 19. 05.2026

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
Pani mgr Anastasii Zaremby
pt. „Bioinformatics approaches to the analysis of small non-coding RNAs
in *Schmidtea mediterranea*”

Recenzję przygotowano na podstawie uchwały Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN z dnia 20 marca 2026 r.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anastasii Zaremby została zrealizowana pod kierunkiem Pani dr hab. Pauliny Jackowiak, prof. ICHB PAN, w Pracowni Analiz Pojedynczych Komórek Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk. Badania były finansowane w ramach projektu NCN nr 2019/35/B/NZ2/02658, kierowanego przez dr hab. Paulinę Jackowiak.

Rozprawa doktorska obejmuje anglojęzyczną monografię pt. *Bioinformatics approaches to the analysis of small non-coding RNAs in Schmidtea mediterranea*, oraz publikację: Zaremba A., Marszałek-Zeńczak M., Dutta A., Samelak-Czajka A., Jackowiak P. (2025). „A modular pipeline for evidence-integrated genome annotation across species: a case study on *Schmidtea mediterranea*”. *Genomics* 117(6): 1111104. Pani A. Zaremba jest pierwszym autorem tej publikacji, ale nie jest autorem korespondencyjnym. Do pracy załączono oświadczenia współautorów, opisujące istotny wkład Doktorantki w planowanie i realizację badań oraz przygotowanie manuskryptu. Uwzględniając te deklaracje oraz opisy wkładu poszczególnych autorów zawarte w samej publikacji, można stwierdzić, że rola Doktorantki w planowaniu, wykonywaniu i opracowaniu otrzymanych wyników badań była znacząca.

Recenzowana dysertacja, zgodnie z załączonym oświadczeniem autorki, prezentuje wyniki badań, które zostały przygotowane do publikacji w postaci artykułu: Dutta A., Zaremba A., Samelak-Czajka A., Marszałek-Zeńczak M., Trybus M., Osuch M., Figlerowicz M., Jackowiak P. „Knockdown of *Smed ELAC2* in *Schmidtea mediterranea* results in delayed regeneration and a reduced accumulation of the small non-coding RNA molecule, 5' tiRNA-Gly-GCC”. Manuskrypt ten znajduje się obecnie w procesie recenzji w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic*



Acids Research. Doktorantka deklaruje, że jest jednym z dwóch pierwszych autorów o równorzędnym i dominującym wpływie na powstanie manuskryptu. Dodatkowo dorobek naukowy Pani magister A. Zaremby wzbogacają dwa artykuły naukowe opublikowane w *Genes & Diseases* oraz *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, które nie wchodzą bezpośrednio w skład pracy doktorskiej.

Rozprawa doktorska liczy 189 stron i została podzielona na sześć rozdziałów. Główne rozdziały poprzedza spis treści, omówienie prac naukowych wchodzących w skład doktoratu, podziękowania, streszczenia w języku angielskim i polskim oraz lista skrótów. Rozdziały pracy tworzą klasyczny układ przyjęty dla dysertacji naukowych: (1) Wprowadzenie (Introduction), (2) Cele i zadania (Aims and Objectives), (3) Materiały i metody (Material and Methods), (4) Wyniki (Results), (5) Dyskusja (Discussion) oraz (6) Wnioski (Conclusions). W dalszej części praca zawiera informacje o materiałach znajdujących się w suplemencie udostępnionym przez Internet, bibliografię oraz załączniki: oświadczenia Doktorantki i Promotora o wkładzie w publikację stanowiącą część dysertacji, a także wydruk tej publikacji.

Wstęp rozprawy doktorskiej mgr A. Zaremby stanowi szczegółowe kompendium wiedzy na temat małych niekodujących cząsteczek RNA (sncRNA). Ta część pracy zawiera również opis procesów regeneracji u wyprawków oraz wyzwań bioinformatycznych związanych z analizą modeli nieklasycznych. Opis wiedzy przedstawiony jest w sposób spójny, a w kolejnych fragmentach Doktorantka odnosi się do wcześniej omówionych zagadnień, dzięki czemu czytelnik uzyskuje zintegrowaną i przekrojową wiedzę obejmującą wpływ małych niekodujących cząsteczek RNA na procesy biologiczne, w tym różnicowanie się neoplastów w procesie regeneracji u wirków. W drugiej części wstępu autorka dokonuje krytycznej analizy postępu osiągniętego w zakresie genomiki i transkryptomiki gatunku *S. mediterranea*. Wykorzystanie postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w poznaniu genomu tego gatunku (*schMedS2*), jest wciąż ograniczone licznymi trudnościami. Szczegółowa diagnoza problemów obejmuje zjawisko błędnych i niekompletnych adnotacji genowych (dotyczących zazwyczaj grupy krótkich niekodujących RNA), oraz brak dedykowanych baz danych. Niedokładność narzędzi bioinformatycznych prowadzi do niewłaściwej rekonstrukcji fragmentarycznych lub chimerycznych transkryptów. Doktorantka słusznie konkluduje, że wykorzystanie takich obciążonych błędami danych w procesie adnotacji skutkuje błędnymi interpretacjami procesów biologicznych. Dodatkowo, w przypadku gatunków niemodelowych sytuację komplikuje ograniczona ilość danych eksperymentalnych, która utrudnia walidację przewidywanych modeli. W ostatnim podrozdziale wstępu Autorka uzasadnia wykorzystanie strategii wyciszania (knockdown) genu *ELAC2* w badaniach nad wpływem cząsteczek sncRNA na przebieg procesu regeneracji *S. mediterranea*.

Opisując stan wiedzy i istotne braki w obszarze genomiki, transkryptomiki oraz analiz bioinformatycznych u *S. mediterranea*, Doktorantka wykazała potrzebę stworzenia



ulepszonych rozwiązań. Z tego powodu jednym z głównych celów recenzowanej dysertacji było opracowanie i optymalizacja pipeline'u analitycznego SmedAnno, pozwalającego na kompletną analizę danych: od surowych odczytów sekwencyjnych, przez mapowanie i składanie *de novo*, aż do wyznaczania adnotacji genowych i analizy transkryptomu. Ulepszone narzędzie miało pozwolić na realizację zaawansowanych analizy krótkich niekodujących RNA u *S. mediterranea*. Zainteresowania naukowe Autorki były skoncentrowane doprecyzowaniu roli sncRNA w regeneracji, dlatego celem szczegółowym pracy doktorskiej było wyjaśnienie obserwowanego wpływu wywołanego wyciszeniem genu *Smed ELAC2* na zaburzenia procesów regeneracyjnych u *S. mediterranea*.

Na początku rozdziału „Materiały i metody” Autorka definiuje swój wkład informując, że laboratoryjna część eksperymentów została zrealizowana przez współpracowników. Samodzielnym i twórczym osiągnięciem mgr A. Zaremby prezentowanym w pracy jest stworzenie, przetestowanie i optymalizacja narzędzi bioinformatycznych SmedAnno oraz wykonanie pozostałych analiz wyników sekwencjonowania RNA-seq, zarówno uznanych dla prób zbiorczych, jak i pojedynczych komórek. Metodyka została opisana szczegółowo, a dobór narzędzi badawczych odpowiada postawionym celom naukowym. Uwzględnienie specyfiki biologicznej *S. mediterranea* pozwoliło na wdrożenie autorskich rozwiązań analitycznych w obszarach, w których standardowe podejścia okazywały się niewystarczające.

Zarówno w monografii, jak i w publikacji stanowiącej część dysertacji obszernie opisano rozwój i walidację narzędzia SmedAnno. Autorka nie ograniczyła się do zastosowania gotowych rozwiązań, lecz zintegrowała programy bioinformatyczne w ciąg (pipeline) w taki sposób, by zoptymalizować każdy z etapów procesu adnotacji genomów. Pozwoliło to na uzyskanie wyraźnego postępu w analizie transkryptomu w zakresie zarówno kodujących, jak i niekodujących typów cząsteczek RNA. Aby potwierdzić wartość nowego rozwiązania, Autorka poddała działanie algorytmów SmedAnno szczegółowym testom. Elementy pipeline'u badano pod kątem stabilności oraz zdolności do jednoczesnej analizy różnych klas cząsteczek – od mRNA po specyficzne fragmenty sncRNA. Autorka dokonała korekty modeli genowych w celu wyeliminowania błędów w adnotacji genów. Zastosowała również rygorystyczne podejście do mapowania odczytów, co w przypadku krótkich sekwencji sncRNA (często mapujących się w wielu miejscach genomu) jest wyzwaniem krytycznym dla wiarygodności wyników. Pipeline SmedAnno charakteryzuje się automatyzacją, wszechstronnością i modułowością. Wprowadzenie zaawansowanych algorytmów, takich jak oparte na uczeniu głębokim narzędzie DeepSpice, pozwoliło na uzyskanie wyższej dokładności strukturalnej niż w przypadku metod standardowych. Dodatkowo wprowadzenie automatycznych oznakowań jakościowych transkryptów (wykazujących cechy potencjalnie chimeryczne lub fragmentaryczne) pozwala na filtrowanie wyników przed etapem manualnej analizy, podnosząc wartość informacyjną dla biologicznych interpretacji adnotacji.



Nowe narzędzie bioinformatyczne Doktorantka zastosowała do realizacji kolejnego celu, którym była analiza zmian w puli sncRNA wywołanych wyciszeniem genu kodującego rybonukleazę ELAC2. Wykazano, że brak aktywności białka Smed ELAC2 w komórkach prowadzi do selektywnej, a nie globalnej przebudowy krajobrazu małych RNA. Stosując wieloetapowe profilowanie i selekcję, wykazano spadek akumulacji cząsteczki 5'-tiRNA-Gly-GCC. Dane uzyskane z analiz bioinformatycznych zostały potwierdzone eksperymentalnie za pomocą metody qPCR. Doktorantka wykazała związek zmian molekularnych z fenotypem makroskopowym. Wyniki wskazują, że knockdown *Smed ELAC2* skutkuje zmianami i istotnym opóźnieniem procesu regeneracji, objawiającym się m.in. późniejszym pojawieniem się pigmentacji oczu w blastemie. W badaniach tych zastosowano nowoczesną metodę sekwencjonowania transkryptomów z pojedynczych komórek (scRNA-seq). Pozwoliło to na precyzyjne zlokalizowanie ekspresji genu *Smed ELAC2* w określonych populacjach neoblastów (m.in. typu zeta i gamma) oraz prześledzenie zaburzeń w trajektoriach różnicowania. Doktorantka stosując złożone podejście analityczne wykazała, że wpływ wyciszenia genu *Smed ELAC2* nie ogranicza się tylko do komórek poddanych bezpośredniemu działaniu RNAi. Okazało się, że wywołane przez spadek poziomu 5'-tiRNA-Gly-GCC zmiany funkcjonalne komórek są wykrywalne głównie w różnicujących się komórkach sąsiadujących – fagocytach i komórkach miększu – gdzie następowała represja docelowych transkryptów mRNA.

Autorka podjęła również próbę funkcjonalnej interpretacji roli 5'-tiRNA-Gly-GCC, stosując metodę pośredniego wnioskowania o aktywności małych RNA z danych sekwencjonowania transkryptomów pojedynczych komórek. Cząsteczki sncRNA nie posiadają na końcu 3' struktury poli(A), przez co nie są wykrywane w atlasach RNA single-cell. Aby obejść to ograniczenie, Doktorantka zaproponowała tzw. metodę „scRNA-seq guided activity inference”, polegającą na analizie „śladu”, jaki niekodujące RNA pozostawiają na swoich transkryptach docelowych. Opracowane algorytmy, przy użyciu modeli parowania sekwencji, identyfikowały zestaw potencjalnych genów docelowych (targetów), których ekspresja była następnie analizowana w pojedynczych komórkach w odniesieniu do genów kontrolnych. Spójność wyników była ostatecznie weryfikowana w odniesieniu do obserwacji konkretnych sncRNA w danych z sekwencjonowania na próbach zbiorczych. Łącząc dane o spadku poziomu sncRNA z danymi o wzroście ekspresji genów docelowych w konkretnych populacjach komórek, Autorka zaproponowała spójny model regulacyjny. Chociaż są to konkluzje oparte na modelowaniu *in silico*, to rygorystyczna analiza statystyczna wyników (testy permutacyjne, korekta Benjamini–Hochberg) oraz osadzenie w kontekście biologicznym (komórki PGRN-dodatnie) czynią z nich solidną podstawę do dalszych badań funkcjonalnych.

W kolejnym rozdziale (Dyskusja) Doktorantka dokonuje merytorycznej syntezy uzyskanych wyników, konfrontując je z aktualnym stanem wiedzy. Przygotowanie i optymalizacja narzędzia SmedAnno umożliwiły opracowanie wysokiej jakości adnotacji



genomu *schMed_Pn*. Stworzony przez Doktorantkę pipeline integruje wiele typów danych (Illumina, PacBio) i narzędzi umożliwiających automatyczne wykrywanie artefaktów (fragmentacja, chimeryzm), podwójne podejście do składania transkryptów (*reference-based* i *de novo*) oraz szeroką adnotację funkcjonalną. Wykazała, że nowe adnotacje tworzą bardziej kompletny profil, zwłaszcza wzbogacając opis izoform transkryptów, unikając przy tym wysokiego stopnia fragmentacji genów widocznego np. w genomie *dd_Smed_v6*. Dzięki zastosowaniu opracowanej procedury bioinformatycznej zidentyfikowano 4011 nowych genów oraz liczne, nieopisane wcześniej, izoformy i sncRNA. *SmedAnno* porównywano w testach z popularnym narzędziem BRAKER3, uzyskując lepsze wyniki pod względem dokładności i kompletności na wszystkich poziomach (egzonów, intronów i całych transkryptów).

Wyniki dotyczące zmian w składzie małych RNA po wyciszeniu *Smed ELAC2* Autorka porównuje z danymi pochodzącymi z innych organizmów. U kręgowców angiogenina jest główną rybonukleazą odpowiedzialną za cięcie dojrzałych cząsteczek tRNA w pętli antykodonowej w warunkach stresu. Analizy sekwencji wykazały, że gatunek *S. mediterranea* nie posiada homologu angiogeniny. W ramach pracy badano, czy rolę tę może pełnić produkt genu *ELAC2*. Wykazano, że wyciszenie *Smed ELAC2* prowadzi do selektywnych zmian w puli miRNA i tRF (fragmentów tRNA). Autorka przeprowadziła szczegółową analizę potencjalnych mechanizmów działania zidentyfikowanej cząsteczki 5'-tiRNA-Gly-GCC. Rozważano trzy modele: (1) pełnienie funkcji fragmentu RNA nakierowującego dla działania nukleazy ELAC2, (2) selektywna represja mRNA genów targetowych, zgodnie z mechanizmem miRNA oraz (3) oddziaływanie piRNA wspólnie z białkami PIWI. Udało się eksperymentalnie potwierdzić oddziaływanie represorowe typu miRNA na gen fosfatazy tyrozynowej. Oddziaływanie cząsteczki z białkami z rodziny PIWI (u wyplawka określanymi jako SMEDWI) wykazano na podstawie danych pochodzących z sekwencjonowania bibliotek małych RNA przygotowanych dwoma metodami: immunoprecypitacji białek SMEDWI wraz z sncRNA oraz biblioteki sekwencji fragmentów hybrydowych uzyskanych metodą CLASH (*Cross-linking, Ligation, and Sequencing of Hybrids*) między fragmentami tiRNA a docelowymi genami. Opisane analizy stanowią cenny wkład w zrozumienie wpływu małych niekodujących cząsteczek RNA na regulację ekspresji genów u wyplawków.

W dyskusji nad efektem wyciszania genu *Smed ELAC2* na poziomie komórkowym i tkankowym Doktorantka przedstawia spójną koncepcję określoną jako „stepwise model”. Stawia hipotezę, że choć zależna od enzymu ELAC2 biogeneza 5' tiRNA-Gly-GCC przebiega w neoblastach, to działanie tej cząsteczki przeniesione jest do komórek potomnych lub sąsiednich, które posiadają pełen zestaw białek efektorowych i tam następuje ekspresja genów docelowych. Rozważane są potencjalne drogi przeniesienia sygnału między komórkami. Autorka wskazuje na pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV), które mogą



transportować tiRNA, oraz kanały typu gap junction umożliwiające przepływ sygnałów regulacyjnych. Model zaproponowany przez Doktorantkę zakłada, że wczesne zaburzenie w neoplastach propaguje się w czasie, wywołując późniejsze, pośrednie skutki w różnicujących się tkankach. Prowadzi to do zmian w alokacji linii komórkowych i opóźnień w regeneracji oczu, promując jednocześnie alternatywne ścieżki (neuralną i parenchymalną). Wyniki te pokazują, że konsekwencje wyciszenia *Smed ELAC2* wykraczają poza komórki, w których gen ten ulega pierwotnej ekspresji, wpływając na cały ekosystem tkankowy biorący udział w regeneracji.

Podsumowując, przedstawiona dysertacja, składająca się z monografii doktorskiej oraz powiązanej z nią publikacji (Zaremba i in. 2025), prezentuje kompleksowe badania nad rolą małych niekodujących RNA (sncRNA) w regeneracji wyprawka *Schmidtea mediterranea*. Praca opiera się na bardzo wysokim standardzie metodycznym. Stworzenie i wykorzystanie autorskich narzędzi bioinformatycznych, a także świadome posłużenie się transkryptomicznymi danymi sekwencyjnymi, pozwoliło autorce na rekonstrukcję mechanizmu, w którym rybonukleaza *Smed ELAC2* oraz cząsteczka 5' tiRNA-Gly-GCC wpływają na różnicowanie komórek macierzystych w procesie regeneracji. Praca ta bez wątpienia wnosi nową jakość do badań nad biologią regeneracji i bioinformatyką sncRNA.

Uwagi do tekstu:

- Strona 7. w spisie artykułów wchodzących w skład rozprawy podano skrócony numer Genomics 117(6): 111110, powinno być 1111104
- Strona 31. Cytowanie w ilustracji Figure 5. Wymieniona tam pozycja Rink, 2018 nie występuje - w spisie literatury
- Strona 48. W ostatniej linii tabeli cytowanie Li et al. 2015 nie występuje w Bibliography
- W podrozdziałach pracy dotyczących postępu nad poznaniem genomu *S. mediterranea* zabrakło informacji o dokładnej wielkości genomu oraz wskazania konkretnych źródeł internetowych (repozytoriów), z których pobrano aktualne sekwencje i adnotacje genomowe.

Pytania do Doktorantki:

- 1) W pracy wykazano asocjację tiRNA-Gly-GCC z białkami PIWI. Czy Autorka planuje badania nad wpływem tej cząsteczki na stabilność transpozonów lub stan chromatyny w neoplastach, biorąc pod uwagę silne wiązanie z jądrowym SMEDWI-2? Jakimi metodami można takie badania przeprowadzić?
- 2) Dzięki ulepszeniu dokładności w białku ELAC2 wykryto obecność sekwencji kierującej do mitochondriów. Aktywność tego białka ma być zlokalizowana zarówno w jądrze/cytoplazmie jak i w mitochondriach. Czy zaburzenia procesów regeneracyjnych



obserwowane po wyciszeniu genu ELAC2 mogą wynikać nie tylko z deficytu cytoplazmatycznych tiRNA, lecz również z dysfunkcji metabolicznych neoplastów, spowodowanych zakłóceniem dojrzewania mitochondrialnych pre-tRNA

Wniosek końcowy:

Stwierdzam, że 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.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej 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 Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie **Pani mgr Anastasii Zaremby** do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Ponadto, uznając bardzo wysoką wartość naukową i aplikacyjną recenzowanej rozprawy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

Łukasz Wolko