

Prof. dr hab. Dariusz Rakus  
Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej  
Uniwersytet Wrocławski  
ul. Sienkiewicza 21  
50-335 Wrocław

Wrocław, 20.06.2026

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

Rozprawa doktorska Pani mgr Anastasii Zaremby pt. "Bioinformatics approaches to the analysis of small non-coding RNAs in *Schmidtea mediterranea*" została przygotowana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN pod kierunkiem Pani dr hab. Pauliny Jackowiak.

Rozprawa dotyczy opracowania i zastosowania metod bioinformatycznych do analizy małych niekodujących RNA (sncRNA) w modelu regeneracyjnym *Schmidtea mediterranea*, ze szczególnym uwzględnieniem konsekwencji wyciszenia genu *Smed ELAC2*. Rozprawa łączy rozwój narzędzi bioinformatycznych, analizę danych wielkoskalowych oraz interpretację biologiczną procesów regeneracji.

Badania nad sncRNA stanowią obecnie jeden z najdynamiczniej rozwijających się obszarów biologii molekularnej. W przeciwieństwie do klasycznych modeli zwierzęcych, takich jak niektóre ssaki, *Drosophila melanogaster*, czy też *Caenorhabditis elegans*, organizmy „nieklasyczne” – takie jak *Schmidtea mediterranea* (płatyniec) – są znacznie mniej poznane i dane na ich temat są relatywnie ubogie (np. brakuje wysokiej jakości zasobów referencyjnych). Autorka identyfikuje tę lukę metodologiczną i proponuje rozwiązania mające realną wartość użytkową dla rozwoju badań.

Rozprawa została przygotowana bardzo starannie pod względem formalnym i strukturalnym, a układ pracy jest logiczny i przejrzysty. Na uwagę zasługuje obszerny i dobrze uporządkowany wstęp, jasno sformułowane cele pracy, szczegółowy opis metod, czytelna prezentacja wyników oraz rozbudowana dyskusja uzyskanych wyników w kontekście obecnego stanu wiedzy.

Szczególnie wysoko oceniam rozdziały metodologiczne dotyczące analizy sncRNA, problemu multimappingu, modyfikacji tRNA, ograniczeń technologii single-cell oraz strategii inferencji funkcjonalnej. To bogactwo metodologiczne rozprawy stanowi jej zaletę, ale miejscami utrudnia odbiór pracy czytelnikowi spoza „biologii obliczeniowej”. Niektóre fragmenty mogłyby zostać uproszczone lub uzupełnione o bardziej syntetyczne podsumowania biologiczne.

Jak wspominałem, w wynikach badań przedstawionych w Rozprawie wykorzystano bardzo szerokie spektrum metod. Zakres ten wykracza poza standardowy poziom metodologiczny typowy dla rozpraw doktorskich z bioinformatyki. Autorka wykazuje przy tym dużą samodzielność

analityczną, dobrą znajomość ograniczeń technologicznych oraz umiejętność krytycznej interpretacji danych.

Najważniejszym osiągnięciem rozprawy jest stworzenie ram metodologicznych/analitycznych umożliwiających badania sncRNA w organizmach o ograniczonych zasobach referencyjnych. Ale równie wysoko oceniam korektę modelu genu *Smed ELAC2*, analizę konsekwencji jego wyciszenia, identyfikację zmian w populacjach tRF oraz próbę funkcjonalnej interpretacji 5' tiRNA-Gly-GCC.

Istotnym walorem pracy jest połączenie aspektów technicznych z biologicznymi konsekwencjami zaburzeń metabolizmu RNA podczas regeneracji. Interesujące są szczególnie obserwacje dotyczące selektywnej dysregulacji tRF, zmian trajektorii różnicowania neoplastów oraz potencjalnej roli regulatorowej 5' tiRNA-Gly-GCC.

Na wysoką ocenę zasługuje również dorobek publikacyjny doktorantki, a szczególnie publikacja w czasopiśmie *Genomics* oraz udział w pracy znajdującej się w drugiej rundzie recenzji w *Nucleic Acids Research*.

Potwierdza to wysoki poziom naukowy badań prowadzonych przez Doktorantkę, ich konkurencyjność międzynarodową, a i dojrzałość badawczą autorki.

Warto podkreślić, że biologiczny aspekt rozprawy wykracza poza klasyczną analizę zmian ekspresji sncRNA u „następnego gatunku” i dotyczy fundamentalnego problemu biologii regeneracji – mechanizmów kontrolujących przejścia pomiędzy stanami komórek macierzystych a programami różnicowania. Szczególnie interesujące są obserwacje sugerujące, że zaburzenia metabolizmu tRNA mogą wpływać na trajektorie różnicowania neoplastów, a więc procesy kluczowe dla utrzymania potencjału regeneracyjnego wyplawka.

Rozprawa wnosi również istotny wkład do rozwijającego się obszaru badań nad biologiczną rolą tRNA-derived fragments. W ostatnich latach coraz częściej wskazuje się, że wybrane tRF mogą pełnić funkcje regulatorowe analogiczne do miRNA lub piRNA, jednak nadal pozostaje otwarte pytanie, które z obserwowanych cząsteczek stanowią rzeczywiście funkcjonalne regulatory, a które są jedynie produktami degradacji RNA. Doktorantka świadomie podejmuje ten problem i przedstawia spójne modele biologiczne, zachowując jednocześnie ostrożność interpretacyjną.

Szczególnie wartościowa wydaje się próba powiązania zmian w poziomie 5' tiRNA-Gly-GCC z określonymi populacjami komórkowymi uczestniczącymi w regeneracji. Analizy sugerujące potencjalne znaczenie tej cząsteczki w komórkach PGRN-dodatnich oraz fagocytach stanowią interesującą hipotezę biologiczną, która może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad rolą sncRNA w komunikacji międzykomórkowej oraz kontroli odpowiedzi regeneracyjnej.



Jednocześnie należy zaznaczyć, że część proponowanych modeli funkcjonalnych ma obecnie charakter hipotez opartych głównie na analizach korelacyjnych, predykcji oddziaływań oraz inferencji aktywności regulatorowej. W szczególności bezpośrednie wykazanie molekularnego mechanizmu działania 5' tiRNA-Gly-GCC wymagałoby dalszych badań eksperymentalnych.

W mojej opinii interesującym zagadnieniem wymagającym dalszej dyskusji jest również kwestia przyczynowości obserwowanych zmian biologicznych. Nie jest bowiem całkowicie jasne, w jakim stopniu zaburzenia regeneracji wynikają bezpośrednio ze zmian poziomu określonych tRF, a w jakim są wtórną konsekwencją ogólnego zaburzenia metabolizmu tRNA po wyciszeniu Smed ELAC2. Nie zmniejsza to jednak wartości pracy, lecz wskazuje naturalny kierunek dalszych badań. Pomimo bardzo wysokiej oceny rozprawy należy wskazać kilka kwestii dyskusyjnych.

1. Najważniejsze zastrzeżenie dotyczy stosunkowo ograniczonej walidacji funkcjonalnej proponowanych mechanizmów działania tRF/tiRNA.
  2. Znaczna część interpretacji opiera się na modelowaniu bioinformatycznym, inferencji aktywności regulatorowej oraz analizach korelacyjnych. W przyszłości wartościowe byłoby uzupełnienie pracy o bezpośrednie testy funkcjonalne.
  3. Badania dotyczące tRF niosą ryzyko nadinterpretacji i nadal pozostają częściowo kontrowersyjne. Nie wszystkie obserwowane fragmenty tRNA muszą pełnić funkcje regulatorowe; część może stanowić produkty uboczne procesów degradacyjnych lub odpowiedzi stresowej.
- Nie zmienia to mojej opinii, że rozprawa prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy zarówno pod względem biologicznym, jak i analitycznym. Doktorantka wykazuje dużą dojrzałość badawczą, umiejętność krytycznej interpretacji danych oraz świadomość ograniczeń współczesnych metod analizy sncRNA. Uzyskane wyniki mają znaczenie nie tylko dla biologii wyławków, lecz także dla szerszego zrozumienia roli małych niekodujących RNA w procesach regeneracyjnych i odpowiedzi komórkowej w zaburzeniach homeostazy RNA.

Na podstawie powyższej oceny stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668 ze zm.) oraz w sposobie postępowania w zakresie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 4/2025/Internet/RN\_140 z dnia 18 marca 2025 3.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pani mgr Anastasii Zaremby do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie zwracam się do Rady Naukowej Instytutu z propozycją nagrodzenia rozprawy.

Dariusz Rakus



Wrocław, 20.05.2026