

Poznań, 16.08.2022

Dr hab. Marta Olejniczak, prof. ICHB PAN

Zakład Inżynierii Genomowej

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marty Kazimierskiej

zatytułowanej

„Identification of functional MYC binding sites and target genes essential for cancer cell growth based on the CRISPR/Cas9 screening assay”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu w Zakładzie Patologii Molekularnej pod kierunkiem Pani dr hab. n. med. Agnieszki Dzikiewicz-Krawczyk, prof. IGCz.

Przedmiotem badań była identyfikacja sekwencji regulatorowych i genów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny MYC istotnych dla wzrostu komórek nowotworowych. Do identyfikacji miejsc wiązania MYC Pani mgr inż. Marta Kazimierska zastosowała technologię CRISPR-Cas9 i wielkoskalowe analizy przesiewowe. W tym celu zaprojektowała i stworzyła oryginalną bibliotekę sgRNA nakierowaną na potencjalne miejsca wiązania MYC w genomie człowieka. Dodatkowo zastosowała dostępną komercyjnie bibliotekę Brunello do inaktywacji genów produkujących białka i regulowanych przez MYC. Takie dwutorowe podejście pozwoliło na wytypowanie istotnych regionów regulowanych przez MYC wpływających na wzrost komórek nowotworowych.

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim w tradycyjnej formie. Rozpoczyna się od spisu treści, wykazu skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu i celu pracy. Kolejna część obejmuje opis użytych materiałów i zastosowanych metod, omówienie wyników, dyskusję, podsumowanie, wykaz rycin, tabel i źródeł finansowania oraz bibliografię. W pracy umieszczono 31 rycin i 21 tabel. Tego typu format rozprawy nie

wymaga załączenia oświadczenia Doktorantki, dotyczącego jej wkładu w prezentowane badania. W przypadku oceny nieopublikowanych wyników badań i stosowania przez Panią mgr inż. Martę Kazimierską zaimka osobowego „my” (np. we checked, we looked, we performed, in our study, itp.) podczas opisu rezultatów, ocena umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej jest utrudniona. Zakładam więc, że wszystkie przedstawione w rozprawie badania zostały przeprowadzone przez Doktorantkę, za wyjątkiem wspomnianej na str. 43 współpracy przy projektowaniu bibliotek sgRNA. Uprzejmie proszę Panią mgr inż. Martę Kazimierską o wyjaśnienie tej kwestii podczas publicznej obrony pracy.

We Wstępie liczącym 20 stron Pani mgr inż. Marta Kazimierska zaprezentowała ogólną wiedzę teoretyczną w tematyce swoich badań. Scharakteryzowała i sklasyfikowała czynniki transkrypcyjne, ze szczególnym uwzględnieniem protoonkogenu MYC. W ciekawy sposób przedstawiła strukturę białka MYC, jego funkcje i zaangażowanie w procesy związane z nowotworzeniem, takie jak wzrost komórek, regulacja cyklu komórkowego, metabolizm glukozy i glutaminy, czy biosynteza nukleotydów, kwasów tłuszczowych i aminokwasów. Następnie scharakteryzowała metody identyfikacji genów docelowych dla MYC oraz ogólnie dla czynników transkrypcyjnych, w tym metody przesiewowe oparte na technologii interferencji RNA. Warto wspomnieć, że charakterystyce metod towarzyszy ich krytyczna ocena, co świadczy o bardzo dobrej znajomości tematyki badań i metodologii. Ostatnia część Wstępu dotyczy charakterystyki systemu CRISPR-Cas9, jego zastosowania jako technologii edycji genomu, metod dostarczania, modyfikacji systemu, mechanizmów naprawy DNA oraz zastosowania do analizy funkcji czynników transkrypcyjnych.

Podsumowując, Wstęp jest doskonałym wprowadzeniem do tematyki pracy. Doktorantka przedstawiła w nim aktualny stan wiedzy na temat roli czynnika transkrypcyjnego MYC w regulacji wzrostu komórek nowotworowych i uzasadniła potrzebę realizacji dalszych badań w celu lepszego poznania tego procesu.

Pani mgr inż. Marta Kazimierska wymieniła trzy cele szczegółowe swoich badań: zaprojektowanie i stworzenie biblioteki CRISPR nakierowanej na potencjalne miejsca wiązania MYC w czterech liniach komórkowych (K562, ST486, HepG2 oraz MCF7); wykonanie badania przesiewowego w celu identyfikacji miejsc wiązania MYC oraz genów sąsiadujących; potwierdzenie funkcjonalności wybranych miejsc wiązania MYC (tzw. E-boxes) oraz genów docelowych.

Badania przesiewowe z użyciem technologii CRISPR-Cas9 są obecnie często wykorzystywane m.in. do poszukiwania funkcji genów, regionów niekodujących, mechanizmów regulujących dane procesy komórkowe. Technologia ta wypiera wcześniej stosowane biblioteki shRNA ze względu na dużą efektywność, względną łatwość projektowania sgRNA i możliwość modyfikowania praktycznie dowolnego *locus* genetycznego. Biblioteki CRISPR składają się z tysięcy plazmidów, zawierających po kilka sgRNA dla każdego genu docelowego. W eksperymencie przesiewowym, komórki docelowe traktuje się połączoną biblioteką w celu stworzenia populacji zmutowanych komórek, które następnie są przeszukiwane pod kątem interesującego fenotypu. Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego zadania stworzenia własnej biblioteki CRISPR. Bazując na publicznie dostępnych danych MYC-ChIP-seq dla 4 linii komórkowych zidentyfikowała potencjalne miejsca wiązania MYC. Regiony te poddała selekcji m.in. pod kątem obecności sekwencji PAM niezbędnej do działania Cas9. Następnie zaprojektowała sekwencje sgRNA, poddała je analizie pod kątem specyficzności wiązania (off-target) i wyselekcjonowane sgRNA wkłonoła do wektorów lentiwirusowych. Ostateczna biblioteka MYC-CRISPR zawierała ponad 45 tys. sgRNA celujących w blisko 25 tys. sekwencji docelowych. Jakość biblioteki została potwierdzona przy pomocy sekwencjonowania nowej generacji. Tym samym pierwszy cel szczegółowy badań został zrealizowany. Sposób tworzenia biblioteki jak również wszystkie etapy selekcji i ewaluacji zostały wybrane prawidłowo. Są one szczegółowo opisane w rozdziale Metody, który jest bardzo wartościową częścią ocenianej rozprawy doktorskiej. Co ważne, stworzona biblioteka została zdeponowana w repozytorium Addgene i jest dostępna dla środowiska naukowego. Jest to bardzo ważne osiągnięcie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Kolejnym etapem badań Pani mgr inż. Marty Kazimierskiej było przeprowadzenie wysokoprzepustowej analizy przesiewowej w 4 liniach komórkowych raka, polegającej na inaktywacji miejsc docelowych dla MYC (biblioteka MYC-CRISPR) oraz znanych genów kodujących białka regulowanych przez MYC (komercyjna biblioteka Brunello). Zastosowanie tej strategii było niezbędne do wytypowania istotnych genów regulowanych przez MYC. W wyniku analizy sekwencjonowania następnej generacji Doktorantka wyselekcjonowała geny oraz sekwencje regulatorowe MYC istotne dla wzrostu komórek rakowych. Większość zmian była specyficzna dla określonego typu komórek. Następnie przy pomocy narzędzi bioinformatycznych (GO oraz GSEA) określiła procesy, w które mogą być zaangażowane wytypowane geny. Część z nich była wspólna dla 4 linii komórkowych i co ciekawe niektóre

były specyficzne dla linii komórkowych, np. naprawa DNA w linii K562 czy regulacja cyklu komórkowego w linii MCF7. Z czego mogą wynikać takie różnice między liniami komórkowymi? W komórkach nowotworowych mechanizmy naprawy DNA są zaburzone, co więcej edycja może prowadzić do śmierci komórki na drodze zależnej od p53. Czy ścieżka p53 jest funkcjonalna w tych liniach komórkowych? Czy może to wpływać na wyniki analiz wysokoprzepustowych? Z czego wynikała analiza 7 dnia po transdukcji?

Kolejnym celem badań Pani mgr inż. Marty Kazimierskiej była walidacja rezultatów analizy wysokoprzepustowej w linii komórkowej K562. Pierwszym etapem była analiza wydajności edycji, którą przeprowadzono metodą TIDE dla 14 sgRNA celujących w 8 sekwencji regulatorowych istotnie zmienionych w analizie wielkoskalowej. Choć metoda TIDE ma swoje ograniczenia i nie wykrywa np. większych delecji, ten ważny eksperyment potwierdził dużą wydajność edycji >90%. Najczęstszym typem mutacji była insercja jednego nukleotydu. Obecnie są dostępne narzędzia do przewidywania wyników edycji (np. FORECasT, InDelphi) uwzględniające m.in. kontekst sekwencyjny miejsca docelowego dla Cas9 czy typ komórek. Taka analiza mogłaby wyjaśnić niektóre obserwacje lub wykluczyć sgRNA, które w wyniku edycji nie zmieniają sekwencji motywu E-box lub generują duże delecje. Ciekawe, czy wydajność i jakość produktów edycji różniła się pomiędzy liniami komórkowymi?

W większości przypadków edycja regionu regulatorowego dla MYC wpływała na obniżenie poziomu ekspresji regulowanego genu (RT-qPCR), obniżenie siły wiązania MYC do tego regionu (ChIP-qPCR) oraz na spadek przeżywalności komórek K562. Zastosowanie katalitycznie nieaktywnego białka Cas9 działającego na zasadzie blokady miejsca docelowego potwierdziło wyniki dla dzikiego białka Cas9 i wpłynęło na obniżenie przeżywalności komórek K562. Co więcej, wyciszenie ekspresji MYC przy pomocy shRNA wpłynęło na obniżenie poziomu ekspresji badanych genów docelowych w systemie reporterowym. Ten bogaty zestaw eksperymentów potwierdził wyniki analiz wielkoskalowych. Pani mgr inż. Marta Kazimierska zaprezentowała w tej części pracy umiejętność sprawnego posługiwania się wieloma metodami biologii molekularnej oraz kompleksowe podejście do problemu badawczego.

W ostatniej części rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marta Kazimierska przedstawiła analizę wyników badań wielkoskalowych. Wytypowała kilka ważnych ścieżek dla funkcjonowania komórek rakowych i zaproponowała tzw. węzły krytyczne w tych

ścieżkach regulowane przez MYC. Należą do nich między innymi gen *PFAS* – punkt centralny w ścieżce biosyntezy puryn; gen *SNRPD2* - krytyczny dla procesu składania pre-mRNA, czy też gen *MECR* istotny dla procesu biosyntezy kwasów tłuszczowych w mitochondriach. Dodatkowo na podstawie analizy 89 istotnych regionów regulatorowych (E-boxes) określiła ich cechy charakterystyczne, takie jak lokalizacja w promotorach genów ulegających wysokiej ekspresji oraz możliwość wpływu kontekstu sekwencyjnego na efektywność wiązania MYC. Są to bardzo ciekawe odkrycia i obserwacje, które otwierają drogę do dalszych badań. Rozprawa doktorska kończy się ciekawą i krytyczną dyskusją wyników badań wraz z podsumowaniem w postaci listy istotnych genów regulowanych przez MYC w czterech liniach komórek rakowych. W kilku miejscach Autorka wspomina o terapeutycznym zastosowaniu wyników badań. Jak mogłyby wyglądać takie potencjalne podejścia terapeutyczne?

Z obowiązku recenzenta poniżej przedstawiam drobne uwagi edytorskie:

Str. 23 - brak odnośnika literaturowego w zdaniu "Acute MYC protein...."

Str. 27 – odnośnik literaturowy w zdaniu dotyczącym odkrycia CRISPR-Cas9 w *Sp. pyogenes* jest niewłaściwy

Str. 28 - sgRNA nie ma 20 nt,

Str. 28 - Rycina 7 znajduje się przed tekstem i odnośnikiem do niej,

Str. 29 – literówki "directed" (HDR), "allow" a nie "allows"

Str. 43 – „from” a nie „form”

Str. 44 – „supplementary table 1”? str 63 podobnie S2-S5, str. 66

Tabela 6 - pojawiają się shRNA? Brak wyjaśnienia w tekście.

Opisy niektórych rycin są zbyt skrótowe, np. ryc. 20

Ryc. 22 - powinno być chyba > -30

Str. 102 – „in four studied cancer cell lines”

Podsumowując, mgr inż. Marta Kazimierska stworzyła nowoczesne i oryginalne narzędzie do badania procesów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny MYC. Wyniki uzyskane w efekcie analiz wielkoskalowych z wykorzystaniem dwóch bibliotek CRISPR poszerzyły naszą wiedzę na temat regulacji istotnych procesów komórkowych przez ten czynnik w komórkach nowotworowych. Cele badań były ambitne i zostały w pełni zrealizowane. Doktorantka udowodniła, że dysponuje bogatym warsztatem biologii molekularnej i odpowiednią wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych prac badawczych. Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marty Kazimierskiej pt. **„Identification of functional MYC binding sites and target genes essential for cancer cell growth based on the CRISPR/Cas9 screening assay”** spełnia wszystkie wymagania ustawowe dotyczące warunków stawianych kandydatom do stopnia doktora, a dotyczące przygotowania rozprawy doktorskiej.

W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Kazimierskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na nowatorski charakter przedstawionych badań oraz możliwość szerokiego wykorzystania wyników badań oraz biblioteki CRISPR-MYC, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



Marta Olejniczak