



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej

ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel. 61 641 83 03
www.ckdm.ump.edu.pl

Poznań, dn. 24.08.2022

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Kazimierskiej

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

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych.

Recenzję opracowano na podstawie materiałów dostarczonych przez Instytut Genetyki Człowieka PAN z siedzibą w Poznaniu.

Powierzona mi do recenzji praca była realizowana w Zakładzie Patologii Molekularnej w Instytucie Genetyki Człowieka PAN. Promotorem pracy jest dr hab. n med. Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk, prof. IGC.

1. Znaczenie podjętych badań

Tematyka pracy dotyczy bardzo aktualnego zagadnienia, jakim są nowotwory człowieka. Temat ten wpisuje się w ogólnościatowe trendy jednego z najczęściej występujących schorzeń człowieka. Wykorzystanie nowoczesnych, wysokoprzepustowych metod wydaje się jednym z najlepszych, najbardziej efektywnych sposobów walki z nowotworami. Możliwe jednak, że przez wzgląd na ogrom danych, które uzyskuje się w takich analizach, strategie te nie są tak szybkie, jak byśmy sobie tego życzyli. I tak, przedstawiona mi do recenzji praca, wydaje się potwierdzać te prognozy.

2. Ocena pracy

A) Ocena merytoryczna

Praca dotyczy identyfikacji miejsc wiązania czynnika MYC i w konsekwencji analizy możliwości modulacji docelowych genów. Do przeprowadzenia badań wykorzystano biblioteki oparte o CRISPR/Cas9. Wnioskując z podziękowań, praca była realizowana w kooperacji z innymi ośrodkami. W sekcji wprowadzenia Autorka zawarła informacje podstawowe w przedmiotowym obszarze. Począwszy od znaczenia i roli czynników transkrypcyjnych poprzez ich udział w procesach sygnalizacji sygnałów i udziału w metabolizmie komórkowym. Wstęp skupia się przede wszystkim na rodzinie czynników zależnych od MYC. Doktorantka uwzględnia kwestię regulacji epigenetycznej, opisuje poszczególne mechanizmy, w których MYC uczestniczy. Skupia się na nowotworach, metabolizmie glukozy i innych procesach anabolicznych i katabolicznych. W kontekście nowotworzenia, akcentuje rolę ścieżki, w której uczestniczy MYC, w procesach takich jak adhezja i apoptoza. Sprawnie opisuje również geny dotychczas znane jako geny docelowe MYC. W tej części pojawia się jedno z ciekawszych zagadnień jakim jest niewątpliwie terapia celowana. Doktorantka dokonuje również przeglądu współcześnie stosowanych metod, które służą do identyfikacji miejsc oddziaływania/wiązania czynników transkrypcyjnych, do których wlicza CHIP, ATAC-seq, 3C oraz CRISPR/Cas9.

W kolejnej części Autorka formułuje cel pracy, który jest dość jasno sprecyzowany ale brakuje mu trochę osadzenia w realiach klinicznych i wizji znaczenia potencjalnych odkryć dla medycyny. Tym ograniczonym rozmachem charakteryzuje się zresztą cała praca, w tym dyskusja.

Kolejna część pracy to dział opisujący zastosowane materiały i metody. Wydaje się, że bardziej szczegółowego uzasadnienia wymaga wybór linii komórkowych, które posłużyły za model badawczy (K562, ST486, HepG2, MCF7). Sam fakt wyboru MYC jako czynnika selekcyjnego przy doborze linii komórkowych jest argumentem niewystarczającym. Autorka opisuje szczegółowo zastosowane odczynniki i metody. Niemniej jednak, wątpliwości pozostawia opis sposobu liczenia komórek oraz jednostki podane przy szacunku zagęszczenia komórek (str. 42/43) – ta kwestia wymaga wyjaśnienia. Nie wiadomo jakim zabiegom były komórki poddane przed liczeniem – czy stosowano trypsynę, czy analizowano morfologię i integralność błon komórkowych, czy stosowano barwniki lub analizę densytometryczną? Praca zawiera szczegółowy opis projektowania i tworzenia bibliotek z uwzględnieniem klonowania, transdukcji, NGS, CHIP itd. W kwestii metody qPCR nie zostało podane wyjaśnienie dlaczego akurat gen TBP został uznany za referencyjny, czy dokonywano analiz porównawczych stabilności transkryptów innych genów metabolizmu podstawowego?

Część opisująca wyniki zawiera ogromną ilość danych dotyczących kanonicznych i niekanonicznych motywów E-box w sekwencjach kodujących i niekodujących. Analiza bioinformatyczna wskazała bardzo dużą różnorodność procesów docelowych, w których może uczestniczyć MYC. Dodatkowo, istotne znaczenie dla uzyskanych wyników miała analiza mutacji wprowadzonych przez sgRNA. Dalsze badania potwierdziły rolę zaburzenia w sekwencji E-box w przeżywalności komórek. Tu jednak brakuje szczegółów dotyczących sposobu analizy, rodzaju testu. Wskazano jednak geny, których rola może mieć istotne znaczenie w kontekście regulacji przez ścieżkę MYC. Co najważniejsze, wskazano nowe konkretne pozycje/nukleotydy o kluczowej roli dla E-box i mechanizmów zależnych od MYC. W dyskusji Autorka wprowadza uzasadnienie dla przeprowadzonych badań. Wyciąga również wnioski dotyczące proliferacji komórek. Przy braku informacji odnośnie stosowanego markera proliferacji trudno jednak uznać te sugestie za w pełni uzasadnione. Należy pamiętać, że ekspresja genów mierzona poziomem mRNA może ale nie musi mieć odzwierciedlenia w poziomie oraz aktywności białka, co może mieć swoje przełożenie na aktywność metaboliczną – w tym proliferację. Wydaje się, że w dyskusji większą część należałoby poświęcić tkankowej specyficzności procesów ekspresji genu, a w konsekwencji prognozowanym odmiennym efektem metabolicznym. Zdecydowanie też brakuje podkreślenia wagi uzyskanych odkryć i wskazania na wizjonerskie podejście do zagadnień związanych z praktycznym wykorzystaniem uzyskanych wyników i dalszych badań funkcjonalnych. Wydaje się, że punkt trzeci podsumowania traktujący o tkankowej specyficzności jest nieco na wyrost i brakuje tu uzasadnienia w treści pracy.

B) Strona formalna

Praca zawiera się na 120 stronach, na których znajduje się 31 rycin i 21 tabel. Rozprawę rozpoczyna spis treści, wykaz skrótów i, dość zaskakująco, dwa streszczenia, w języku angielskim i polskim. Streszczenia pozostawiają pewien niedosyt w kontekście związku z interesującym tytułem. W pracy znajdują się pojedyncze błędy językowe – głównie w zakresie pomieszania czasu teraźniejszego i przeszłego oraz formy dokonanej/niedokonanej i mowy zależnej (choćby w podsumowaniu i wnioskach).

Wydaje się, że lepszym rozwiązaniem byłoby unikanie skrótów w tytułach poszczególnych rozdziałów/podrozdziałów.

Legнды do rycin powinny być wzbogacone – dotyczy to szczególnie pierwszych dziesięciu rycin.

3. Wniosek końcowy

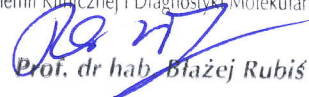
Temat poruszony przez Doktorantkę jest trudny, ciekawy i bardzo ważny. Autorka wykazała się olbrzymim doświadczeniem praktycznym i koncepcyjnym. Sposób prezentacji uzyskanych wyników jest przejrzysty i za wyjątkiem drobnych uwag zamieszczonych powyżej, jest bardzo informatywny. Bogate ilustracje stanowią istotne wzbogacenie treści pracy i pozwalają podążać za koncepcją Autorki. Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską stwierdzam, że mgr inż. Marta Kazimierska przygotowała bardzo ciekawą i wartościową rozprawę.

Przedstawiona mi do recenzji praca 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” w pełni odpowiada wymogom pracy na stopień doktora określonym w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261).

Powyższe wnioski upoważniają mnie do zwrócenia się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Kazimierskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,

Kierownik Katedry i Zakładu
Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej


Prof. dr hab. Błażej Rubiś