



UNIWERSYTECKIE CENTRUM KLINICZNE  
WARSZAWSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO  
Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych  
ul. Banacha 1a 02-097 Warszawa

Warszawa, 28.09.2022

**Opinia o rozprawie doktorskiej 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”**

Przesłana do oceny praca jest sporządzona w języku angielskim i składa się ze 120 stron i typowych dla tego typu opracowań części tj. ze streszczenia (w języku polskim), abstraktu, wstępu, celu pracy, materiałów, metod, wyników, dyskusji, wniosków/podsumowania wyników, spisu rycin i tabel oraz piśmiennictwa. Praca jest poprzedzona szczegółowym spisem treści oraz wykazem najważniejszych skrótów używanych w publikacji. Zawiera 21 tabel, 31 rycin i 148 pozycji piśmiennictwa.

Wstęp wprowadza czytelnika w problem, którego rozwiązaniu poświęcona jest cała praca – identyfikacji genów regulowanych przez MYC, istotnych dla wzrostu komórek nowotworowych. Liczy 20 stron, doktorantka omawia w nim poszczególne zagadnienia, wiedza o których konieczna jest dla zrozumienia problemu badawczego: istotę czynników transkrypcyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem czynników z rodziny bHLH oraz czynnika MYC. Ten ostatni jest opisany w sposób bardzo szczegółowy, w kontekście jego struktury, funkcjonowania jako czynnik transkrypcyjny i onkogen, procesów, którymi kieruje oraz genów docelowych, przez niego regulowanych zidentyfikowanych za pomocą dotychczasowych metod. Wynika z tego potrzeba poszukiwania metody kompleksowej, przesiewowej oceny podstawowych genów docelowych dla MYC, która mogłaby być zastosowana w różnych nowotworach. Szczegółowo omówiono metodologię poszukiwania docelowych genów dla czynników transkrypcyjnych, skupiając się na immunoprecypitacji chromatyny i nadekspresji/wyłączeniu poszczególnych czynników transkrypcyjnych, ATAC-seq i metodach opartych na 3C. Kulminacją wstępu jest precyzyjnie, ale przystępnie opisana metoda edycji genomu za pomocą CRISPR/Cas9 – jej mechanizm działania, mechanizmy naprawy DNA i

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa  
NIP: 522-00-02-529, REGON: 000288975-00030  
KRS: 0000073036  
tel. 22 599 28 18  
fax 22 599 28 98  
e-mail: [hematologia@wum.edu.pl](mailto:hematologia@wum.edu.pl)  
[www.uckwum.pl](http://www.uckwum.pl)

modyfikacje metody CRISPR/Cas9. Powyższe rozważania doprowadzają nas do omówienia możliwości zastosowania CRISPR/Cas9 do badania funkcji czynników transkrypcyjnych. Wstęp jest napisany w bardzo pieczołowity sposób, porusza szczegółowo trudne zagadnienia w sposób zrozumiały także dla osób niezwiązanych bezpośrednio z dziedziną.

Cel pracy został jasno określony jako identyfikacja na skalę genomu funkcjonalnych miejsc wiążących MYC i docelowych genów wpływających na wzrost komórek nowotworowych, wykorzystując metodę CRISPR/Cas9. Cele szczegółowe obejmują zaprojektowanie i wygenerowanie biblioteki MYC-CRISPR odpowiadającej miejscom wiążącym MYC w wybranych, czterech liniach komórkowych, zaprojektowanie wysokowydajnej metody przesiewowej badania miejsc wiążących MYC i odpowiadających im genów w komórkach nowotworowych oraz potwierdzenie funkcjonalności wybranych miejsc i docelowych genów. Cele są konkretne, mierzalne, osiągalne i istotne. Zdaniem recenzenta, w tej sekcji niepotrzebnie znalazła się rycina 8 „Experimental approach”, która powinna raczej należeć do sekcji „Metody”.

W sekcji „Materiały” dokładnie opisano materiały i odczynniki wykorzystywane do hodowli komórkowych, hodowli bakteryjnych, enzymy, bufony, roztwory, wykorzystywane do elektroforezy i zestawy dostępne komercyjnie oraz wyposażenie.

Sekcja „Metody” obejmuje pieczołowicie opisane hodowle komórkowe, wybór stężenia puromycyny dla każdej linii komórkowej, projektowanie i klonowanie biblioteki MYC-CRISPR, amplifikację biblioteki Brunello, klonowanie indywidualnych konstruktów sgRNA, izolację plazmidów DNA, wielko i wąskoskalową produkcję cząsteczek lentiwirusowych, ocenę ilościową ich wytwarzania i efektywności transdukcji, przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania NGS, sekwencjonowania NGS i analizy wyników, metody oceny skuteczności edycji genów za pomocą CRISPR/Cas9, izolacji RNA i qRT-PCR, oceny żywotności komórek, immunoprecypitacji chromatyny, test aktywności lucyferazy, specjalistyczne analizy dotyczące ontologii genów, cech związanych z zasadniczymi sekwencjami „E-box”, ustanowienie monoklonalnych linii komórkowych oraz analizę statystyczną. Bardzo użyteczne, zdaniem recenzenta, byłoby krótkie wprowadzenie do sekcji „Metody”, którego rozwinięciem byłyby opisane sekcje. Jego częścią mogłaby być rycina 8 z opisem.

Wyniki opisane są na 42 stronach i zgodnie z najlepszymi standardami stanowią główną część rozprawy. Opisano przygotowanie lentiwirusowej biblioteki sgRNA MYC-CRISPR nakierowanej na miejsca wiązania MYC (E-box) aby uszkodzić ich sekwencję. Zbiór sekwencji E-



box został oparty na dostępnych danych z MYC-ChIP-Seq w czterech liniach nowotworowych zależnych od MYC. Przeprowadzono badanie przesiewowe z użyciem biblioteki MYC-CRISPR oraz Brunello, by uszkodzić geny kodujące białka. Wyniki otrzymane z obu bibliotek wykazały sekwencje E-box oraz geny docelowe istotne dla wzrostu wszystkich komórek nowotworowych, jak i specyficzne dla danego typu nowotworu. Uzyskano 354-1,992 geny oraz 56-97 sekwencji E-box istotnych dla wzrostu komórek nowotworowych, podczas gdy 3-9 sekwencji E-box i 5-18 genów było wzbogaconych. 20-32% istotnych motywów E-box było zlokalizowanych w pobliżu genów istotnych dla komórek nowotworowych, a 42-49% genów zlokalizowanych w ich pobliżu to znane cele dla MYC. Analiza procesów w jakie zaangażowane są istotne geny oraz te położone w pobliżu istotnych sekwencji E-box wykazała m.in. metabolizm, syntezę rybosomów, splicing i translację. Podejście z użyciem biblioteki MYC-CRISPR zostało zwalidowane na linii komórkowej. Wyniki zilustrowano licznymi, czytelnymi, dopracowanymi rycinami oraz tabelami, zawierającymi m.in. informacje o zidentyfikowanych sekwencjach. Należy podkreślić różnorodność podejścia do przedstawienia trudnych do interpretacji wyników.

Dyskusja jest przedstawiona jasno, rzetelnie i niezwykle dojrzałe na 5 stronach. Doktorantka unika powtarzania opisu wyników, a zamiast tego rzuca się w wir ich interpretacji, zatrzymując się dłużej przy kwestiach metodycznych czy wynikach najbardziej ją intrygujących czy pozornie niespójnych. Podobnie Doktorantka uniknęła najczęstszego błędu związanego z myleniem Wstępu z Dyskusją. Dyskusja dowodzi najwyższego poziomu ekspertyzy i wirtuozerii badawczej.

Sekcja „Podsumowanie wyników” zastępuje w pracy częściej stosowaną sekcję „Wnioski” ale wydaje się być bardziej adekwatna do danej pracy. Na podstawie tej sekcji należy stwierdzić, że postawione wstępnie cele zostały jednoznacznie osiągnięte, a przedstawione prace i ich rozmach znacznie wręcz postawione cele przekraczają.

Reasumując, uważam że mgr inż. Marta Kazimierska przedstawiła do oceny pracę doktorską wybitną tak pod względem jej koncepcji, znajomości podstaw teoretycznych, wirtuozerii metodycznej, niezwykle bogatą w oryginalne wyniki, które potrafiła niezwykle trafnie zinterpretować. Wytworzyła innowacyjne narzędzie oparte na metodzie CRISPR/Cas9 modyfikujące motywy E-box, dzięki któremu zidentyfikowała „pięty Achillesowe” linii komórek nowotworowych zależnych od czynnika transkrypcyjnego MYC.

Rozprawa odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ust. 1 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Tym samym, wnioskuję do Wysokiej Rady

Instytutu Genetyki Człowieka, Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym do publicznej obrony rozprawy doktorskiej. Ze względu na wybitny, moim zdaniem, poziom pracy zgłaszam wniosek o jej wyróżnienie.

Prof. dr hab. med. Grzegorz Władysław Basak

**Prof. dr hab. med. GRZEGORZ BASAK**  
**INTERNISTA, HEMATOLOG,**  
**TRANSPLANTOLOG KLINICZNY**  
**1853664**

