



OCENA ROZRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Marty Elżbiety Kasprzyk

pt. „**Functional dissection of the immunoglobulin heavy chain enhancers and enhancers RNAs in B-cell non-Hodgkin lymphomas**”

wykonanej

w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

pod kierunkiem dr hab. n.med. Agnieszki Dzikiewicz-Krawczyk, prof. IGC PAN

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN z dnia 16 marca 2023 roku.

1. Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marty Kasprzyk pt. „*Functional dissection of the immunoglobulin heavy chain enhancers and enhancers RNAs in B-cell non-Hodgkin lymphomas*” oparta jest na zestawie 2 opublikowanych prac oryginalnych (obydwie z roku 2021) oraz manuskrypcie skierowanego do recenzji. Jedna praca to publikacja o charakterze przeglądowym, dwie pozostałe to prace eksperymentalne. Doktorantka jest pierwszą autorką wszystkich prac stanowiących rozprawę doktorską, co jednoznacznie wskazuje na Jej wiodącą rolę w prowadzonych badaniach. Docenić należy jakość opublikowanych prac, co w pełni odzwierciedla sumaryczny współczynnik oddziaływania obydwu opublikowanych już prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynoszący IF= 11,071.

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim i skonstruowana jest w klasyczny sposób, a wspomniane powyżej prace i ich omówienie stanowią jej trzon. W

rozprawę włączono typowe rozdziały, takie jak Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie do przedstawionych prac oraz spis cytowanej literatury. Dodatkowo Doktorantka załączyła opis swojej dotychczasowej kariery naukowej, z uwzględnieniem konferencji, w których Doktorantka brała udział, otrzymanych nagród i wyróżnień, doświadczenia zdobytego w wyniku odbytych staży (w tym zagranicznych) i szkoleń oraz listę publikacji (8) nie wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej. Ta część wskazuje na ogromną aktywność i zaangażowanie Doktorantki w prowadzenie pracy badawczej.

Uważam, że Wprowadzenie zostało przygotowane przez mgr Kasprzyk niezwykle starannie z wykorzystaniem bardzo dobrych źródeł literaturowych. Rozdział ten został napisany bardzo czytelnym językiem, który doskonale wprowadza w prezentowane prace. Na podkreślenie i uznanie zasługuje również fakt, że wszystkie ryciny znajdujące się w tej części rozprawy zostały przygotowane przez Doktorantkę samodzielnie.

W składzie rozprawy znajdują się także wymagane publikacje oraz odpowiadające im Oświadczenie współautorów określające procentowy udział każdego z nich w przedstawionych pracach. Doktorantka zawarła w opisie informacje na temat źródeł finansowania badań przedstawionych w rozprawie. Precyzyjne stwierdzenia, co do zakresu zaangażowania w dane publikacje wszystkich pozostałych współautorów pozwalają uznać, że wkład doktorantki w przeprowadzenie badań prezentowanych w rozprawie i jej zaprojektowanie – jako kompleksowego podejścia do zagadnienia poznania znaczenia sekwencji wzmacniających oraz wzmacniających RNA dla rozwoju i różnicowania limfocytów B, szczególnie genu łańcucha ciężkiego przeciwciał w chłoniakach nieziarniczych – jest zasadniczy i znacznie przekraczający wkład pozostałych badaczy. Tym samym, można uznać przedstawioną rozprawę doktorską za autorskie dzieło doktorantki.

Badania będące przedmiotem pracy doktorskiej finansowane były ze środków przewidzianych na realizację grantu FNP „First Team” dla Promotorki pracy oraz programu PRO finansowanego przez NAWA, przyznanego mgr Marcie Kasprzyk, w ramach którego Doktorantka odbyła staż w Uniwersyteckim Centrum Medycznym w Groningen w Holandii.

2. Przedmiot i cele rozprawy oraz zastosowana metodyka badawcza

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marty Kasprzyk dotyczy spójnego tematycznie zagadnienia obejmującego badanie roli sekwencji wzmacniających oraz wzmacniających RNA w rozwoju i funkcji limfocytów B w chłoniakach nieziarniczych.

Rola sekwencji wzmacniających w rozwoju i dojrzewaniu limfocytów B jest raczej dobrze poznana to jednak ich zaangażowanie w procesy rozwoju chłoniaka oraz regulacji translokacji onkogenów, pozostają nadal nieznane. Dlatego też Doktorantka, w ramach pracy doktorskiej, wyznaczyła sobie główny cel, jakim była funkcjonalna charakterystyka sekwencji wzmacniających oraz wzmacniających RNA zaangażowanych w patogenezę chłoniaków nieziarniczych. Doktorantka zrealizowała go w następujących etapach:

1. identyfikacja aktywnych transkrypcyjnie regionów w obrębie genu łańcucha ciężkiego immunoglobuliny oraz określenie ich roli w rozwoju chłoniaków nieziarniczych;
2. identyfikacja wzmacniających RNA kodowanych w obrębie badanego genu oraz określenie ich roli w patogenezie choroby;
3. określenie potencjału inhibicyjnego związków niskocząsteczkowych wobec sekwencji wzmacniających *IGH*.

Aby zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zastosowała szereg technik, które moim zdaniem były w pełni odpowiednie do ich realizacji. Zostały one bardzo szczegółowo opisane w odpowiednich rozdziałach „*Materials and methods*” prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

3. Najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy

Rozprawa przedstawia rezultaty wielu obszernych, bardzo dobrze zaplanowanych prac.

Najistotniejsze wyniki uzyskane w wyniku realizacji pracy to:

1. precyzyjna identyfikacja trzech regionów w obrębie sekwencji wzmacniających $E\mu$ oraz 3'RR (3'RR1 oraz 3'RR2) w genie *IGH* za pomocą technologii CRISPRi i wykazanie ich roli w procesie wzrostu komórek w liniach komórkowych chłoniaka Burkitta oraz chłoniaka rozlanego z dużych komórek;
2. potwierdzenie dwukierunkowej transkrypcji w obrębie genu *IGH*, w tym także dla sekwencji wzmacniających w oparciu o sekwencjonowanie RNA zasocjowanego z chromatyną;
3. potwierdzenie, iż sekwencje wzmacniające mogą wpływać na poziom ekspresji onkogenów ulegających translokacji. Doktorantka zastosowała tutaj technologię edycji genomu za pomocą CRISPR/dCas9, otrzymując bardzo przekonujące dane pokazujące, iż zablokowanie regionu kluczowego (ang. *core region*) sekwencji wzmacniających genu *IGH* prowadzi do obniżenia poziomu ekspresji translokowanych onkogenów.

4. Wykazanie, iż zablokowanie kluczowego regionu dla sekwencji wzmacniającej Eμ prowadzi do utraty receptora komórek B (ang. *B-cell receptor*) w chłoniakach typu B zarówno w przypadku komórek wykazujących translokację locus *IGH*, jak i nie wykazujących takiej translokacji.

4. Znaczenie uzyskanych wyników

Prace zaprezentowane w ramach rozprawy doktorskiej i badania wykonane przez Doktorantkę oraz zespół badawczy są bardzo cennym wkładem pokazującym znaczenie funkcjonalne i kliniczne sekwencji wzmacniających oraz wzmacniających RNA w chłoniakach nieziarniczych. Praca mgr Marty Kasprzyk jest przede wszystkim przykładem bardzo dogłębnego poszukiwania mechanizmów działania sekwencji wzmacniających oraz kodowanych przez nie RNA przy wykorzystaniu niezwykle precyzyjnych narzędzi molekularnych, takich jak m.in. CRISPR. Jest to szczególnie ważne, nie tylko z punktu widzenia poszukiwani funkcji czy identyfikacji nowych oddziaływań między cząsteczkami, ale ma ogromne znaczenie w przypadku potencjalnego zastosowania klinicznego. Tylko dogłębne analizy mechanistyczne mogą, moim zdaniem, pozwolić na identyfikację naprawdę obiecujących cząsteczek, a w efekcie - szlaków molekularnych w terapii chorób.

Niezwykle doceniam także dużą ostrożność Doktorantki w formułowaniu dalekosiężnych teorii o wykorzystaniu badanych przez siebie sekwencji w terapii chłoniaków, a poświęcenie największej uwagi na precyzyjne poznanie i opisanie mechanizmów udziału sekwencji wzmacniających oraz wzmacniających RNA w rozwoju chłoniaka.

5. Komentarze

Ze względu na fakt, iż rozprawa doktorska stanowi w większości zbiór opublikowanych i zrecenzowanych już badań, pozwolę sobie jedynie na drobne pytania i komentarze:

1. Za pomocą technologii CRISPR1 zidentyfikowano regiony kluczowe w obrębie sekwencji wzmacniających *IGH* (publikacja nr 2). Wykazano, iż regiony te mają wpływ na tempo proliferacji komórek poprzez udział czynnika MYC. Czy analizowano lub planowana jest analiza znaczenia badanych sekwencji oraz wzmacniających RNA w cyklu komórkowym lub w mechanizmie oporności lekowej?
2. Które z tzw. cech nowotworowych (ang. *hallmarks of cancer*) mogłyby, w odniesieniu do analizowanych sekwencji, być najbardziej obiecującym celem terapii?
3. Czy badano lub rozważano badanie globalne wpływu sekwencji wzmacniających na profil ekspresji genów, w tym RNA czy miRNA? Czy badanie wpływu sekwencji

wzmacniających oraz eRNA na wzór metylacji DNA mogłoby w tym podejściu być zasadne?

4. Czy w kontekście przyszłych badań, planowane są testy *in vivo*?
5. Związek 30666 (publikacja nr 3) przetestowano w szeregu linii komórkowych. Uzyskano dane potwierdzające jego wpływ na aktywność sekwencji wzmacniających oraz na wzrost komórek chłoniaka typu B. Obserwowano zmiany w poziomie ekspresji eRNA pochodzącego z regionów E μ oraz 3' RR1 i 3'RR2 po podaniu związku. Po 24 godzinach poziom ekspresji uległ obniżeniu, natomiast po 48 godzinach – wracał niemal do poziomu wyjściowego, z wyjątkiem 2 linii komórkowych. Czy Doktorantka mogłaby spróbować wyjaśnić tę przejściową zmianę dla większości linii komórkowych oraz jej brak dla pozostałych dwóch?
6. Głównym wnioskiem dla potencjalnego mechanizmu działania związku 30666 jest jego wpływ na przebieg cyklu komórkowego i zatrzymanie komórek w fazie sub-G1. Sugeruje to, że związek ten mógłby być zaangażowany w indukcję apoptozy, a nie w proliferację. Ponieważ w badaniu tym wykorzystano tylko analizę cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowowej, czy dla potwierdzenia tej tezy, przeprowadzono albo rozważano badanie markerów poszczególnych faz cyklu czy punktów kontrolnych (np. cyklin) lub markerów proliferacji i apoptozy inną metodą, np. qRT-PCR? Moim zdaniem, stanowiłoby to bardzo dobre uzupełnienie uzyskanych wyników.

6. Podsumowanie

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr Marty Elżbiety Kasprzyk na uwagę zasługuje wysoka jakość przeprowadzonych badań. Bardzo podoba mi się wykorzystanie precyzyjnych narzędzi molekularnych do poznania mechanizmów działania i funkcji sekwencji wzmacniających oraz wzmacniających RNA, a w konsekwencji do wskazania potencjalnych cząsteczek terapeutycznych w chłoniakach nieziarniczych. Praca doktorska jest w efekcie kompleksowym i rzetelnym podejściem do badanego problemu. Dodatkowo, uzyskane wyniki, zostały potwierdzone dobrze dobranymi pracami eksperymentalnymi zaprojektowanymi w bardzo, moim zdaniem, elegancki sposób. Dlatego też uważam, iż rozprawa doktorska i składające się na nią prace są bardzo cennym i rzetelnym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego, stanowiąc zarazem podstawę do kontynuowania badań w tej tematyce.

7. Wniosek końcowy

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marty Elżbiety Kasprzyk spełnia wszystkie warunki stawiane kandydatom w Ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz.85 z późniejszymi zmianami). Zwracam zatem się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Marty Elżbiety Kasprzyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze walory merytoryczne recenzowanej rozprawy oraz jakość prac stanowiących jej trzon, wnoszę do Rady Naukowej o jej wyróżnienie.

Poznań, 01.10.23

dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICHB PAN

