

Recenzent: **Dr hab. Monika Piwecka, prof. ICHB PAN**
Zakład Niekodujących RNA
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
Poznań, Polska

Poznań, 2026-02-12

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały

pt. Wpływ białka CTCF na strukturę genomu ssaków i jego rola w utrzymaniu spójności ekspresji genów

Praca doktorska mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały została wykonana w Pracowni Biologii Chromatyny i Epigenomiki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Prace badawcze zostały wykonane pod kierunkiem Dr hab. Aleksandry Pękowskiej, Prof. Instytutu Nenckiego PAN. Tematyka pracy doktorskiej dotyczy określenia funkcji białka wiążącego DNA CTCF w regulacji struktury chromatyny i ekspresji genów podczas różnicowania embrionalnych komórek macierzystych (ESC, ang. *embryonic stem cells*) do progenitorów komórek glejowych i nerwowych, czyli tzw. neuralnych komórek macierzystych (NSC, ang. *neural stem cells*). Ta tematyka wpisuje się w nurt aktualnych badań nad topologią i dynamiką zmian w strukturze chromatyny na ekspresję genów oraz kontrybucji białka CTCF w tych procesach i ich perturbacji w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych.

Rozprawa doktorska została przygotowana w postaci monografii, w języku polskim, z zastosowaniem klasycznego podziału tekstu na: wstęp, cel pracy, materiały, metodykę, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz spis literatury.

Rozdział „**Wstęp**” (27 stron) stanowi dobre wprowadzenie do tematyki badań. Kandydatka przygotowując tę część rozprawy wykazała się znajomością literatury dotyczącej tematyki badań z zakresu organizacji genomu oraz rozpoznanych i opisanych w literaturze struktury i funkcji białka CTCF, jak również metod badania organizacji genomu. W tej i innych częściach rozprawy, Autorka wykorzystwała literaturę opublikowaną w ostatnich latach, co podkreśla fakt, że tematyka badań, którą podjęła jest nowa i aktualna. Autorka dobrze dobrała poziom szczegółowości przedstawianych informacji. Mankamentem utrudniającym odbiór informacji w niektórych fragmentach tego rozdziału (a także innych rozdziałach) były zbyt dosłowne tłumaczenia cytowanych artykułów naukowych napisanych w języku angielskim. W

konsekwencji, niektóre zdania posiadają angielską składnię, brzmią niegramatycznie po polsku i w skrajnych przypadkach zawierają błędy. Np. jest istotna różnica między zapisem „pętle tworzone przez (...elementy wzbogacone w)”, a pętlami „tworzącymi”, jak jest to ujęte w pkt. 1.3 (str. 22). Niektóre zdania pozostały niedokończone (np. w opisie do ryciny 3), inne są niejasne (np. ostatnie zdanie w opisie do Ryciny 5), co również utrudnia interpretację rycin. Ponadto, we ”Wstępie” znalazło się też kilka błędów językowych i formalnych, np. „bar zasad” zamiast „par zasad” (str. 23), w definicji białka CTCF („czynn timer wiążący CCTC” zamiast czynnik wiążący sekwencje CCCTC, str. 26), słowo „komaprtment” pisane jest na 2 różne sposoby (str. 23), zapis, że „enzym Cas9 pozbawiony aktywności nukleazowej (dCas9) jest *skorelowany* z białkiem fluorescencyjnym” (punkt 3, str. 39), „fotoblekniecie” w opisie metody FRET (Tabela 2, str. 41), itp.

Kolejna część rozprawy to „**Cel Pracy**” (1,5 strony). Główne cele pracy doktorskiej zostały sformułowane bardzo jasno i precyzyjnie przez Doktorantkę i są to „określenie roli białka CTCF w regulacji ekspresji genów podczas różnicowania pluripotencjalnych komórek macierzystych (komórek ES) do komórek pnia nerwowego (komórek NS)” oraz „oszacowanie wkładu czynn timer transkrypcyjnego CTCF w dynamikę organizacji trójwymiarowej struktury chromatyny w komórkach ES i NS”. Moje kontrowersje budzi natomiast fragment, w którym Doktorantka przed przejściem do celu/celów pracy odnosi się do „otwartych zagadnień”, czyli motywacji pracy. W tym miejscu wymienione są 3 zagadnienia, w których istniały luki w wiedzy w odniesieniu do funkcji białka CTCF podczas różnicowania komórek pluripotencjalnych w komórki nerwowe. Nie rozumiem i będę wdzięczna za wyjaśnienie kwestii zawartej w punkcie 1 i 2, a mianowicie wpływu poziomu białka CTCF na jego funkcję izolacyjną. Czy jest/była ona niejasna (jak napisano w pkt. 1, str. 43), czy też „zmiany w ekspresji CTCF mogą wpływać na jego funkcję izolacyjną”, jak napisano w otwarciu pkt. 2 (str. 43)?

Rozdziały „**Materiały**” (21 stron) i „**Metodyka**” (30 stron), to łącznie ponad 50 stron opisu i list zastosowanych narzędzi, metod, odczynników, itp. Na podkreślenie i wyróżnienie zasługuje fakt zastosowania w pracy nowoczesnych i zaawansowanych technologicznie narzędzi i metod, w tym linii komórkowych z systemem degronowym, sekwencjonowania RNA, metody ATAC-seq i ChIP-seq czy CRISPR-Sirius. Istotnym mankamentem jest brak opisu metod statystycznych zastosowanych do analizy wyników w pracy, tym bardziej, że opisy Rycin w rozdziale „Wyniki” również bardzo często nie przedstawiają informacji na temat zastosowanych testów statystycznych i opisu, co oznaczają słupki błędów i gwiazdki istotności statystycznej na wykresach (np. na Rycinie 18 czy Rycinie 22).

W podrozdziale 3.2.2. (klonowanie sgRNA) Doktorantka zawarła informacje, że plazmid px458 stosowany przez nią do edycji genomu i tworzenia mutantów delecyjnych w linii komórek ES zawiera sekwencję

kodującą dCas9, co jest informacją niepoprawną. W plazmidzie px458 zawarta jest sekwencja funkcjonalnej nukleazy Cas9, a zastosowanie dCas9 (ang. *dead Cas9*) uniemożliwiłoby edycję genomu.

„**Wyniki**” (łącznie 38 stron) zostały podzielone na 3 części, które odpowiadają trzem celom szczegółowym przedstawionym wcześniej w rozdziale „Cel Pracy”. Są to Część I – „Analiza wpływu CTCF w regulacji ekspresji genów różnicowania”, Część II – „Identyfikacja ncRNA istotnych w topologii chromatyny” (domyślam się, że jest tu literówka w słowie topologia), oraz Część III – „Przyżyciowa analiza kinetyki pętli CTCF w komórkach ES i NS”. Rozdziały „Dyskusja” oraz „Podsumowanie i wnioski” to łącznie 13 syntetycznego omówienia wyników uzyskanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej oraz ciekawa próba nakreślenia kierunków przyszłych badań.

Uwagi i pytania szczegółowe do rozdziałów „Wyniki”, „Dyskusja” oraz „Podsumowanie i wnioski”:

1. Brak informacji ile było replikatów/powtórzeń prób, które użyto do przygotowania bibliotek RNA-seq, ATAC-seq i ChIP-seq. Prośba o wyjaśnienie.
2. W otwarciu podrozdziału 1.3 “Wyników” pt. „Utrata pluripotencji komórki wzmacnia rolę CTCF jako izolatora” Doktorantka pisze, że w dalszej części pracy będzie skupiać się na analizie genów ulegających represji po utracie białka CTCF wyłącznie w komórkach NS. Natomiast w następnej kolejności przechodzi do analizy genu *Aldh1a3*, którego poziom ekspresji wzrasta w komórkach NS po utracie CTCF (jak przedstawiono na Rycinie 20b). Z czego wynika ta rozbieżność w opisie?
3. Czy tytuł Ryciny 21 jest adekwatny do jej zawartości?
4. Jeden z fragmentów pracy, który mnie szczególnie zaniepokoił dotyczy analizy miejsc wiązania CTCF w *locus Aldh1a3*. Wyniki eksperymentów Doktorantki pokazują, że jedno z trzech miejsc wiązania CTCF w *locus Aldh1a3* pełni funkcję izolacyjną w komórkach NS. Zaniepokoiło mnie stwierdzenie z „Dyskusji”, że delecja właśnie tego konkretnego miejsca wiązania CTCF skutkowała istotnym wzrostem ekspresji genu *Aldh1a3*, a obszar ten wykazywał cechy strukturalne typowe dla miejsc architektonicznych. (str. 137-138). Co Doktorantka ma na myśli pisząc „cechy strukturalne typowe dla miejsc architektonicznych”? Dodatkowo, jako, że Rycina 21 pokazuje *locus Aldh1a3* w małym powiększeniu i w szerszym kontekście genomowym, czy Doktorantka mogłaby lepiej wyjaśnić na większym powiększeniu, które trzy miejsca wiązania CTCF były analizowane, oraz wskazała miejsca i rozmiary delecji tych rejonów w mutantach typu *knockout*? Nie jest dla mnie jasne gdzie znajduje się mutacja i region, którego delecja skutkowała wzrostem ekspresji genu po różnicowaniu do NS.
5. Wiele spośród lncRNA charakteryzuje się tkankowo-specyficzną ekspresją. Co wiadomo w tym temacie w odniesieniu do *Pantr1*? Czy dostępne dane typu scRNA-seq z mózgu człowieka mówią

cos na temat ekspresji tego lncRNA w różnych typach i podtypach dojrzałych neuronów i komórek glejowych?

6. Czy znana jest lokalizacja subkomórkowa lncRNA *Pantr1* w komórkach NS (np. z eksperymentów wizualizujących ten RNA w zastosowanym przez Panią układzie biologicznym) i/lub komórkach mózgu? Czy ten lncRNA jest zakonserwowany ewolucyjnie u ssaków? Oraz jaka jest ekspresja *Pantr1* w komórkach NS w przeliczeniu na ilość kopii na komórkę? Czy walidowała Pani ten lncRNA pod tym kątem?
7. Czy znana jest dynamika ekspresji CTCF podczas rozwoju mózgu człowieka fazie płodowej i neonatlanej?
8. Jednym z aspektów, który Doktorantka brała pod uwagę przy projektowaniu narzędzia do wizualizacji pętli CTCF-CTCF przyżyciowo w komórkach był wybór odpowiedniego fragmentu genomu, a jednym z kryteriów „odpowiednia” długość pętli. Czy Doktorantka mogłaby doprecyzować co to znaczy „odpowiednia” wielkość pętli? Jakie pętle uważane są za duże, a jakie pętle można uznać za małe? Jaki jest zakres wielkości/długości pętli w genomie człowieka?
9. Czy sformułowanie w „Podsumowaniu i wnioskach” zawarte w punkcie 4 jest poprawne? Cytat: „CTCF wraz z białkami wiążącymi RNA i lncRNA wspiera utrzymanie represji genów neuronalnych w komórkach NS”. Które geny neuronalne hamowane w NS wskutek aktywności CTCF w kompleksie z RBP i lncRNA Doktorantka ma na myśli? Do którego wyniku (bądź wyników) odnosi się ten punkt podsumowania?

Pozostałe uwagi:

- Nomenklatura - tekst rozprawy zawiera niefortunne sformułowania, które często są tłumaczeniem „wprost” z języka angielskiego. Sugeruję bardziej precyzyjne dobieranie słownictwa polskiego, tam gdzie jest to możliwe, zwłaszcza w formalnych rozprawach naukowych. Przykłady: aminokwasy nieesencjalne (ang. *non-essential amino acids*, NEAA w Wykazie skrótów str. 14 oraz w Materiałach), „współ-pierwszy autor” (str. 100), „geny dotknięte utratą CTCF” (str. 100), „kilo pary zasad” (str. 105), „system degronowy na C-końcu genu CTCF” (str. 127) – geny nie mają C końca (!), „integracja dCas9 z genomem” (str. 134) – to białko nie integruje z genomem w żadnym wypadku (!), „denaturujące puryfikacje po UV-crosslinkigu” (str. 145) w odniesieniu do metody CLAP (ang. *covalent linkage and affinity purification*) jest wyjątkowo nieszczęśliwą wersją opisowego przetłumaczenia angielskiej nazwy tej metody, itp.
- Edycja tekstu – wielokrotnie powtarzające się litrowki, niedokończone zdania, brak znaków interpunkcyjnych (przecinków, kropek na końcach zdań), niepoprawna deklinacja rzeczowników – wszystko to sprawia wrażenie, że praca została przygotowana w pośpiechu i niestarannie. Rzuca to niekorzystnie na odbiór i interpretację wyników. Jest to wielka szkoda, ponieważ rozprawa

doktorska to jednak zwieńczenie wieloletniej ciężkiej pracy, jak i w tym przypadku wnioskując po zawartości merytorycznej doktoratu.

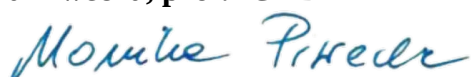
Wnioski końcowe

Podsumowując, praca doktorska mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały zawiera wiele elementów nowatorskich, zarówno w kontekście dostarczenia nowej wiedzy, jak i w aspekcie technologicznym, tzn. zastosowania zaawansowanych narzędzi biologii molekularnej i ich optymalizacji oraz integracji do tworzenia nowych metod np. wizualizacji dynamiki pętli CTCF-CTCF przyżyciowo w komórkach. Eksperymenty zostały starannie i elegancko zaplanowane, a praca jest zrobiona z dużym rozmachem pod względem wykorzystania różnorodnych linii komórkowych oraz metod. Dodatkowo, uważam, że eksperymenty są dobrze kontrolowane, np. przy analizie mutantów delecyjnych, Doktorantka każdorazowo izolowała i analizowała 2-3 homozygotyczne linie klonalne. Praca dostarcza kilku nowych odkryć, w tym za najbardziej cenne uznaję integrację badań multiomicznych w celu zrozumienia różnorodności i plastyczności funkcjonalnej CTCF w trakcie różnicowania komórek embrionalnych do komórek układu nerwowego oraz określenie udziału niekodującego RNA *Pantr1* i białek RBP w modulowaniu funkcji CTCF w komórkach NS. Ponadto, przedstawione wyniki oraz opracowywana przed Doktorantką metodyka otwierają wiele interesujących kierunków badawczych, w tym w kontekście zrozumienia funkcji kompleksów CTCF w oddziaływaniach z RBP i lncRNA w regulacji struktury chromatyny i swoistości tych procesów i oddziaływań w zależności od typu komórki czy etapu zróżnicowania.

Doktorantka jest równorzędną pierwszą autorką pracy eksperymentalnej opisującej część wyników wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Praca ta została opublikowana w 2025 roku w bardzo dobrym czasopiśmie naukowym *Nature Cell Biology*. Doktorantka jest również współautorką artykułu przeglądowego na temat funkcji białka CTCF w kontrolowaniu ekspresji genów w rozwoju i chorobie, który został opublikowany w *EMBO Reports* w 2022 roku i jest on cytowany ponad 100 razy od tego czasu. Ponadto w dorobku naukowym Doktorantki znajdują się 2 inne opublikowane pozycje, które współtworzyła: praca przeglądowa dot. zmian w chromatynie w chorobach neurologicznych opublikowana w czasopiśmie *Pharmaceuticals* (2021 rok) oraz praca badawcza dot. oddziaływań patogen-gospodarz w zakażeniach glistą psią opublikowana w czasopiśmie *Pathogenes* (2021 rok).

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Dr hab. Monika Piwecka, prof. ICHB PAN



16 luty 2026

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały pt.
„Wpływ białka CTCF na strukturę genomu ssaków i jego rola w utrzymaniu spójności
ekspresji genów”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały została wykonana pod kierunkiem, prof. Instytutu Nenckiego PAN Aleksandry Pękowskiej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie.

Ocena wartości naukowej:

Rola czynnika CTCF w regulacji ekspresji genów jest przedmiotem intensywnych badań od wielu lat. Dyskusja nad znaczeniem tego białka nabrała szczególnej intensywności po odkryciu, że stanowi ono istotny element organizacji chromatyny — w pewnych warunkach ogranicza ekstruzję chromatyny (ang. *loop extrusion*) przez pierścień kohezynowy, wyznaczając miejsca zakotwiczenia pętli. Wpływ CTCF, a także samych pętli chromatynowych, na aktywność genów zależy od wielu czynników, m.in. orientacji sekwencji wiążącej, lokalnego otoczenia epigenetycznego, aktywności okolicznych elementów regulatorowych oraz dostępności czynników transkrypcyjnych. Praca mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały w istotnym stopniu pogłębia nasz rozumienie w jaki sposób CTCF wpływa na ekspresję genów i kształtuje trójwymiarową organizację genomu.

Cel pracy:

Celem pracy było zbadanie, w jakim stopniu białko CTCF wpływa na poziom ekspresji genów w mysich komórkach macierzystych embrionalnych (mESC) oraz reguluje jego zmiany w trakcie różnicowania do komórek pnia nerwowego (NS), a także określenie, w jakim stopniu odpowiada za organizację trójwymiarowej struktury chromatyny oraz jej zmiany podczas różnicowania.

Cele szczegółowe: 1.) opisanie wpływu CTCF na ekspresję genów podczas wczesnego rozwoju układu nerwowego 2.) zidentyfikowanie lncRNA kluczowych dla regulacji aktywności CTCF we wczesnym rozwoju układu nerwowego ssaków 3.) opracowanie metody pozwalającej na wizualizację w czasie rzeczywistym dynamiki interakcji pomiędzy miejscami wiązania CTCF, stanowiącymi końce pętli chromatynowych. **Tematyka pracy jest ważna, ponieważ mimo, iż wiadomo, że CTCF jest ważnym białkiem regulatorowym, regulacja ekspresji genów przez CTCF w trakcie różnicowania się komórek i rozwoju jest w dalszym ciągu nie w pełni zrozumiana.**

Metody badawcze:

Wykonanie pracy badawczej wymagało opanowania i zastosowania różnorodnych metod. Eksperymenty opierały się na kilku typach modyfikowanych genetycznie linii mysich komórek macierzystych embrionalnych, w tym komórkach z degenem CTCF: CTCF był znakowany fluorescencyjnym tagiem GFP oraz tagiem AID, który kierował białko do degradacji. Komórki z degenem różnicowano do stadium progenitorów neuronalnych. Wybrane miejsca wiązania CTCF, zlokalizowane na końcach pętli chromatynowych, usunięto za pomocą metodologii CRISPR/Cas9. Wykonano serię eksperymentów genomowych badających dostępność chromatyny (ATAC-seq), wzbogacenie wybranych modyfikacji histonów (ChIP-seq z przeciwciałami przeciw H3K27ac, H3K4me3) oraz CTCF, oraz analizę transkryptomu (mRNA-seq). Analiza bioinformatyczna została wykonana przez innych członków zespołu i nie jest opisana w pracy. Zaprojektowano również system przyżyciowej wizualizacji dwóch loci genomowych w czasie rzeczywistym, oparty na technologii CRISPR-Sirius oraz strategii klonowania CARGO, umożliwiającej dodatkowe wzmocnienie sygnału poprzez celowanie w jedno locus dziesięcioma sgRNA zlokalizowanymi tuż obok siebie. Komórki z tak oznakowanymi końcami jednej z pętli chromatynowych obrazowano za pomocą mikroskopu konfokalnego, a lokalizację dwukolorowych sygnałów, odzwierciedlających końce pętli, analizowano na podstawie trójwymiarowych stosów (stacków) obrazów z wykorzystaniem oprogramowania Fiji. **Bardzo wysoko oceniam jakość wykonanych eksperymentów, adekwatność doboru metod oraz ich różnorodność. Ich wykonanie świadczy o opanowaniu warsztatu metodologicznego wymagającego dużego stopnia niezależności.**

Uzyskane wyniki:

W części pierwszej wyników opisano analizę zmian ekspresji genów w mysich komórkach embrionalnych w stanie pluripotentnym (ES) oraz po zróżnicowaniu do progenitorów neuronalnych (NS) po usunięciu CTCF metodą indukcji degonu. Analiza porównawcza ES/NS potwierdziła tożsamość obu typów komórek. Łącznie zidentyfikowano 1250 genów o istotnie zmienionej ekspresji, co jest wynikiem wysokim względem literatury i może wynikać z dłuższej inkubacji z IAA. Co istotne, tylko 81 genów zmieniało ekspresję zarówno w ES, jak i w NS. Analizy ATAC-seq, ChIP-seq H3K27ac oraz rozmieszczenia CTCF sugerują, że CTCF nie wpływa znacząco na ogólną aktywność elementów regulatorowych. Interpretacja ta jest zasadna, choć diagramy Venna wskazują, że komórki CTCF +/- różnią się występowaniem nawet ~20% specyficznych wzbogaceń („pików”). Usunięcie CTCF w ES prowadziło głównie do spadku ekspresji, natomiast w NS częściej obserwowano jej wzrost; warto jednak podkreślić, że w obu typach komórek deregulowane są zasadniczo różne zestawy genów. Bioinformatycznie wykazano, że geny o podwyższonej transkrypcji w NS leżą bliżej siebie oraz najbliższych aktywnych enhancerów, co wspiera hipotezę wzrostu ekspresji na skutek lokalnej utraty izolacji od sąsiednich elementów regulatorowych. Wniosek ten wzmacnia porównanie z opublikowanymi danymi Hi-C: geny o podwyższonej ekspresji często znajdują się w pętlach sąsiadujących z większą liczbą aktywnych enhancerów. Dalsza analiza skupiła się na NS oraz genie dehydrogenazy

aldehydowej Aldh1a3, ważnym w rozwoju układu nerwowego. Za pomocą CRISPR/Cas9 usunięto trzy miejsca wiązania CTCF znajdujące się w rejonie tego genu. Ich usunięcie nie wywołało zmian w pluripotentnych ES, natomiast delecja jednego z tych miejsc, zlokalizowanego przy końcu 3', spowodowała znaczny wzrost ekspresji w progenitorach neuronalnych NS. Co sugeruje, że miejsce to pełni funkcję izolatora interakcji. **Podsumowując doktorantka wykazała, że CTCF jako izolator jest ważnym czynnikiem ograniczającym ekspresję genów neuronalnych w komórkach macierzystych. Eksperymenty zostały dobrze zaplanowane, a wyniki jasno przedstawione w logicznej sekwencji, w której wnioski z poprzedniego eksperymentu uzasadniają wykonanie następnego. Uzyskano nowy, ciekawy wgląd w mechanizmy działania CTCF, a także biologię komórek nerwowych.**

Część druga wyników: wcześniejsze badania grupy Prof. Pękowskiej wykazały, że białka wiążące RNA wpływają na aktywność regulatorową CTCF i jest to oddziaływanie zależne od obecności RNA. Doktorantka przetestowała hipotezę, że lncRNA Pantr1, ulegające ekspresji u neuronalnych progenitorów, uczestniczy w regulacji ekspresji genów poprzez oddziaływanie z CTCF. **Eksperymenty, wykonane we współpracy z współ-pierwszą autorką manuskryptu publikującego opisywane dane, wykazały, że u komórki pozbawionych Pantr1 CTCF słabiej interaguje z Ddx5 oraz FUS, a także interakcje pętli CTCF-CTCF są osłabione. Obserwacje te, pokazują po raz pierwszy, że niektóre lncRNA jak Pantr1 wpływają na interakcje chromatyny poprzez modulację oddziaływań CTCF a tym samym na regulację genów.**

Część trzecia wyników opisuje, opracowanie systemu przyżyciowej wizualizacji wybranych loci oparty o CRISPR-Sirius, pozwalający śledzić interakcje elementów regulatorowych i potencjalne pętle CTCF-CTCF. **Opracowanie systemu wymagało ukończenia z sukcesem wielu etapów i świadczy o talencie oraz doświadczeniu doktorantki. Powstałe narzędzie wygląda bardzo obiecująco.**

Wyniki poddane zostały wnikliwej, wyczerpującej dyskusji z bogatymi odniesieniami do literatury, doktorantka zaproponowała również model działania Pantr1. Zabrakło jednak nawiązania do wcześniejszych analiz ekspresji genów w komórkach z degronem CTCF, w których wykazano dużo mniejsze różnice w ekspresji. Porównanie tych wyników, linii komórkowych oraz warunków indukowania degronu byłoby cennym uzupełnieniem pracy.

Zastosowanie uzyskanych wyników badań.

Wyniki otrzymane przez mgr inż. Milewską Puchałę zostały już opublikowane w jednym z najbardziej prestiżowych czasopism naukowych i jestem przekonany, że spotkają się z dużym zainteresowaniem społeczności naukowej, a także będą punktem wyjścia do kolejnych badań. Uzyskane dane bioinformatyczne będą mogły być re-analizowane przez inne grupy badawcze, a stworzone linie komórkowe, plazmidy, oligonukleotydy przyczynią się do dalszych badań nad rolą CTCF i trójwymiarowej organizacji genomu w regulacji ekspresji genów.

Ocena formalnej strony pracy:

Rozprawa doktorska ma klasyczny układ, tzn. całość stanowi obszerny, jednolity i autonomiczny tekst opracowany przez doktorantkę, opisujący wszystkie elementy niezbędne do jej zrozumienia. Część przedwstępna obejmuje stronę tytułową, informację o finansowaniu, streszczenia w języku polskim i angielskim, a także spis treści oraz wykaz skrótów. Wprowadzenie (wstęp) liczy niespełna 30 stron i omawia epigenetyczną regulację ekspresji genów, mechanizm działania oraz znaczenie białka CTCF dla regulacji procesów komórkowych. Część ta kończy się przeglądem metod stosowanych w badaniu funkcji CTCF oraz analizie trójwymiarowej organizacji genomu. Materiały wykorzystane w badaniach opisano bardzo szczegółowo, wraz ze wskazaniem producentów i numerów katalogowych. Również metody przedstawiono w sposób wyczerpujący, często z uzasadnieniem przyjętej strategii analizy. Rozdziały „Materiały i metody” stanowią około 30% objętości pracy i umożliwiają dogłębne prześledzenie, w jaki sposób doktorantka uzyskała zaprezentowane następnie wyniki. Rozdział „Wyniki” podzielono na trzy części odpowiadające celom szczegółowym pracy; każda z nich kończy się podsumowaniem. Wyniki przedstawiono jasno i przejrzysto oraz bogato zilustrowano rycinami, do których tekst konsekwentnie się odnosi. Zaprezentowane rezultaty i wnioski zostały krytycznie omówione w rozdziale „Dyskusja”, łączącym ustalenia z całej rozprawy z danymi opublikowanymi przez innych badaczy. Na końcu tej części przedstawiono podsumowanie pracy. Bibliografia obejmuje 183 pozycje, zarówno artykuły przeglądowe, jak i oryginalne prace badawcze. Dobór literatury jest trafny, a cytowane publikacje pochodzą z cenionych czasopism naukowych. Rozprawę zamyka lista publikacji doktorantki. **Układ pracy jest przejrzysty i ułatwia nawigację pomiędzy poszczególnymi częściami. Treść w sposób wyczerpujący przedstawia prowadzone badania: podaje kluczowe informacje stanowiące podstawę rozważań, szczegółowo opisuje materiały i metody, a następnie jasno prezentuje wyniki oraz poddaje je krytycznej dyskusji. Tekst często odwołuje się do literatury ujętej w bibliografii i jest uzupełniony wysokiej jakości rycinami.**

Pytania i uwagi krytyczne:Pytania:

- dlaczego analizowano progenitory neuronalne, a nie bardziej zróżnicowane neurony korykalne jak w cytowanej publikacji Bonev et al. Cell 2017?
- dlaczego wybrano inkubację z IAA przez 24 godziny? proszę o porównanie z innymi badaniami analizującymi różnice w ekspresji u degranów CTCF mESCs

Uwagi krytyczne niewymagające odniesienia:

- analiza bioinformatyczna powinna zostać w pracy opisana, choćby skrótowo; jest ona dostępna w opublikowanym artykule, ale nie jest on oficjalnie częścią rozprawy doktorskiej
- opis analizy obrazu w części metodologicznej jest skąpy
- brak informacji o liczbie replikatów RNA-seq

- w części opisującej materiały odniesienia do literatury powinny pojawiać się częściej; np. na s. 81, we wprowadzeniu do systemu CRISPR-Sirius, brakuje referencji; podobnie brak źródła na s. 106: "opóźnienie rozwojowe przy utracie jednego allelu CTCF"
- niekonsekwencja w wymienianiu wektorów: px458 nie figuruje wśród materiałów.
- referencja literaturowa dotycząca konstrukcji wektorów CARGO jest błędna lub jej brakuje: powinno być Gu et al., Science 2018** (grupa Joanny Wysockiej), a podano Gu et al., Briefings in Bioinformatics 2018.
- Ryc. 17a: w opisie osi brakuje wartości procentowych – trzeba się ich domyślać.
- Niewyjaśniona wartość: „znormalizowana odległość fizyczna”.
- s. 104: analiza bioinformatyczna "pętli" wprowadzane bez większych wyjaśnień, jedynie w legendzie ryciny.
- mało referencji, np. s. 106: "opóźnienie rozwojowe przy utracie jednego allelu CTCF"
- s. 110: błędna numeracja odwołań do rycin – na dole strony powinno być Ryc. 21, jest Ryc. 20.
- brak odniesienia w tekście do Ryc. 24c.

Podsumowanie:

Stwierdzam, że rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Celem pracy było zbadanie, w jakim stopniu białko CTCF wpływa na poziom ekspresji genów w mysich komórkach macierzystych embrionalnych (mESC) oraz reguluje jego zmiany w trakcie różnicowania do komórek pnia nerwowego (NS). Zaplanowano kompleksowe badania - unikalny zbiór skomplikowanych eksperymentów, które w satysfakcjonujący sposób zrealizowały postawiony cel. Dowodzi to umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez magistrantkę. Uważam ponadto, że poprawne przeprowadzenie tych złożonych badań przez doktoranta świadczy o jego wysokim poziomie wiedzy ogólnej z dziedziny nauki biologiczne.

Podsumowując uważam, że praca doktorska mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. Zmianami). **Wniosuję za tym z pełnym przekonaniem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczeniu mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**

Dodatkowo, z uwagi na wysoką wartość zaprezentowanych badań, potwierdzoną m.in. przez akceptację wyników w prestiżowym czasopiśmie Nature Cell Biology, różnorodność i innowacyjność użytych technik, świadczących o niezależności naukowej i wysokim poziomie merytorycznym doktoranta **sugeruję oficjalne wyróżnienie pracy mgr inż. Milewskiej-Puchały.**

Dr hab. Michał Gdula

strona 5 z 5

Laboratory of Bioinformatics and Computational Genomics LB!GO
Faculty of Mathematics and Information Science, Warsaw University of Technology
ul. Koszykowa 75, 00-662 Warsaw, Poland

Warszawa,
12.02.2026

Laboratory of Functional and Structural Genomics LFSG
Centre of New Technologies, University of Warsaw
Banacha 2c Street, 02-097 Warsaw, Poland

mobile: [+48504726203](tel:+48504726203), e-mail: Dariusz.Plewczynski@pw.edu.pl, www: <https://plewczynski-lab.org>

Warszawa, 12/02/2026

Prof. dr hab. Dariusz Plewczyński
Laboratorium Bioinformatyki i Genomiki Obliczeniowej,
Wydział Matematyki i Nauk Informatycznych,
Politechnika Warszawska
Laboratorium Genomiki Funkcjonalnej i Strukturalnej
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski

RECENZJA rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały

*Wpływ białka CTCF na strukturę genomu ssaków i jego rola
w utrzymaniu spójności ekspresji genów*

Ukończonej w
Pracowni Biologii Chromatyny i Epigenomiki
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

pod opieką promotor
dr hab. Aleksandry Pękowskiej,
prof. Instytutu Nenckiego PAN

w dyscyplinie biologii molekularnej

Przestrzenna (3D) organizacja genomu stanowi jeden z kluczowych poziomów regulacji ekspresji genów w komórkach ssaków. W ujęciu hierarchicznym – od terytoriów chromosomowych, poprzez domeny TAD, aż do pętli chromatynowych – architektura ta umożliwia i ogranicza kontakty pomiędzy promotorami oraz wzmacniaczami, a jej zaburzenia (np. na poziomie granic TAD lub funkcji CTCF) wiązane są z deregulacją transkrypcji oraz fenotypami chorobowymi.

W tym kontekście białko CTCF jest jednym z centralnych „organizatorów” architektury chromatyny: uczestniczy w definiowaniu granic domen oraz w stabilizacji pętli CTCF-CTCF w mechanizmie wytlaczania pętli (loop extrusion), współdziałając z kompleksem kohezyny.

Rozprawa mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały podejmuje problem aktualny i istotny: jak – przy relatywnie stabilnym krajobrazie miejsc wiązania CTCF – zmienia się funkcja regulacyjna CTCF podczas różnicowania, i w jaki sposób może to przekładać się na stabilność tożsamości komórkowej oraz spójność ekspresji genów. Już streszczenie/abstrakt rozprawy jasno formułuje tezę o kontekstowej (zależnej od typu komórki) dynamice funkcji transkrypcyjnej CTCF, mimo stabilnej lokalizacji miejsc wiązania.

Przedmiotem oceny, jest to czy rozprawa doktorska, w moim przekonaniu, w pełni spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2004 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r., poz. 665 ze zm.). Dodatkowo oceniam czy rozprawa prezentuje oryginalność rozwiązane go problemu naukowego, ogólną wiedzę teoretyczną i praktyczne/techniczne umiejętności kandydata w dziedzinie informatyki, a także umiejętność prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały została ukończona w Pracowni Biologii Chromatyny i Epigenomiki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, pod opieką promotor dr hab. Aleksandry Pękowskiej, prof. Instytutu Nenckiego PAN.

Autorka sformułowała w swojej rozprawie cel główny: określenie roli CTCF w regulacji ekspresji genów podczas różnicowania (w modelu ES → NS), a następnie rozwinęła go w trzy cele szczegółowe:

- określenie roli CTCF w regulacji ekspresji genów podczas wczesnego rozwoju układu nerwowego,

- identyfikacja lncRNA kluczowych dla regulacji aktywności CTCF we wczesnym rozwoju nerwowym ssaków,
- konstrukcja narzędzia wizualizacji do badania dynamiki interakcji pomiędzy kotwicami pętli CTCF-CTCF.

Rozprawa ma przejrzystą strukturę: zawiera wstęp, materiały i metody, a następnie część wyników podzieloną na trzy logiczne części (I: funkcja CTCF w regulacji ekspresji, II: rola ncRNA/lncRNA w topologii chromatyny, III: podejście mikroskopowe – kinetyka pętli w żywych komórkach), po czym następują dyskusja oraz podsumowanie i wnioski.

Taki układ jest spójny z przyjętym celem: od (i) fenotypu transkrypcyjnego po wyciszeniu CTCF, przez (ii) hipotezę o roli RNA/partnerów białkowych w „dojrzewanu” architektury chromatyny, aż po (iii) próbę wytworzenia narzędzia umożliwiającego bezpośredni wgląd w dynamikę zjawiska w czasie rzeczywistym.

Trzon pracy stanowi wykorzystanie systemu degronowego CTCF pozwalającego na indukowalną, precyzyjną deplecję białka, a następnie profilowanie transkryptomu i „regulomu” w dwóch stanach komórkowych (ES i NS).

Na szczególne podkreślenie zasługuje szeroki i adekwatny zestaw metod:

- RNA-seq (NovaSeq, paired-end), ATAC-seq, ChIP-seq (m.in. H3K27ac, H3K4me3 oraz CTCF) – jako spójny pakiet do równoległej oceny zmian ekspresji i aktywności elementów regulatorowych,
- inżynieria genomu (CRISPR-Cas9) do funkcjonalnego testowania wybranych miejsc wiązania CTCF w konkretnym locus (Aldh1a3),
- elementy analizy struktury chromatyny (w pracy przywołano i wykorzystano dane/wnioski z Hi-C, a w części dotyczącej Pantr1 omawiane są mapy Hi-C dla efektu delecji),
- testy interakcji białko–białko/białko–RNA (m.in. wątek PLA dla interakcji CTCF z Ddx5/FUS w kontekście Pantr1),
- budowa narzędzia obrazowania opartego o CRISPR-Sirius/SunTag i wielosgRNA (CARGO), dla analizy loci w żywych komórkach.

W opisie metodyki Autorka uczciwie zaznacza podział pracy (np. bioinformatyczne analizy wykonywane przez członków zespołu specjalizujących się w bioinformatyce), co jest standardem w interdyscyplinarnych projektach multi-omics.

Oryginalność rozprawy polega nie tylko na implementacji powyższego zestawu technik, ale na ich konsekwentnym powiązaniu: deplecja CTCF → efekt transkrypcyjny i brak bezpośredniego efektu na aktywność CRE → test mechanizmu na locus *Aldh1a3* → poszukiwanie czynnika modulującego (RNA/lncRNA) → próba uzyskania narzędzia do obserwacji dynamiki. W mojej ocenie jest to dobrze uzasadniona „ścieżka przyczynowa” projektu.

Wyniki pracy doktorskiej zostały opublikowane w pięciu artykułach:

1. Dehingia B., **Milewska-Puchała M.**, Janowski M., Rafiee MR., Abbas M., Piotrowska A., Senge J., Blaut P., Walsh D., Severino J., Chaudhury D., Iqbal S., Montiel-Manriquez R., Jankowska S., Zare P., Huber W., Xu J., Casellas R., Zimmermann T., Dłotko P., Krijgsveld J., Pękowska A. RNA binding proteins mediate the maturation of chromatin topology during differentiation. **Nature Cell Biology** 2025
2. Dehingia B., **Milewska M.**, Janowski M. & Pękowska A. CTCF shapes chromatin structure and gene expression in health and disease. **EMBO Reports** (2022), e55146; <https://doi.org/10.15252/embr.202255146>.
3. Janowski M., **Milewska M.**, Zare P., & Pękowska A., Chromatin Alterations in Neurological Disorders and Strategies of (Epi) **Genome Rescue. Pharmaceuticals** 2021, 14(8), 765.
4. Długorz E., **Milewska M.**, Bąska P., **Pathogens**, 2021, vol. 10, no. 8, pp. 1-15, Article number 949

Doktorantka wykazuje aktywność publikacyjną obejmującą zarówno prace oryginalne, jak i przeglądowe. Wśród publikacji znajduje się m.in. praca dotycząca dojrzewania topologii chromatyny w różnicowaniu (*Nature Cell Biology*, 2025) oraz artykuł przeglądowy dotyczący roli CTCF w zdrowiu i chorobie (*EMBO Reports*, 2022).

Dodatkowo na uwagę zasługuje fakt, że Autorka świadomie wykorzystuje elementy dorobku przeglądowego w rozprawie (np. schematy/ilustracje dotyczące mechanizmu wytłaczania pętli, z zachowaniem informacji o źródle i wkładzie).

Na poziomie merytorycznym dorobek ten potwierdza, że Doktorantka porusza się swobodnie zarówno w obszarze badań mechanistycznych (genomika funkcjonalna/epigenomika/3D genom), jak i w syntezie koncepcyjnej tematu.

Poniżej postaram się w skrócie podsumować **kluczowe osiągnięcia badawcze doktorantki**, które zostały przedstawione przez autora i recenzenta.

Część I – CTCF a ekspresja genów i aktywność elementów regulatorowych

Jednym z najbardziej nośnych wniosków pracy jest obserwacja, że utrata CTCF zmienia ekspresję genów, ale bez bezpośredniego wpływu na aktywność elementów regulatorowych (w sensie globalnie mierzonej dostępności chromatyny/aktywacji enhancerów).

Co ważne, Autorka nie poprzestaje na opisie „listy DEG”, ale proponuje model funkcjonalny:

- geny obniżone po deplecji CTCF były wcześniej silnie ekspresowane i posiadały wiązanie CTCF w promotorze;
- geny podwyższone charakteryzowały się niską ekspresją bazową i brakiem CTCF w promotorze;
- w konsekwencji CTCF w promotorach może wspierać transkrypcję przez pośredniczenie w kontaktach z odległymi wzmacniaczami, natomiast w regionach międzygenowych działać izolatorowo.

Na poziomie fenotypu w dwóch stanach komórkowych kluczowa jest konkluzja o komórkowo-specyficznym kierunku deregulacji: w ES dominują geny o obniżonej ekspresji, podczas gdy w NS częściej obserwuje się geny o zwiększonej ekspresji.

Wynik ten jest istotny biologicznie – wskazuje, że przejście różnicowania nie tylko „utrwała” architekturę, ale może przeprogramowywać rolę CTCF w równowadze między aktywacją a represją programów genowych (w tym neuronalnych). Autorka omawia również grupy genów deregulowanych w obu typach komórek (m.in. związane z mitochondriami, wiązaniem jonów, adhezją, cytoszkieletem), co wspiera tezę o niebanalnym, systemowym wymiarze efektów utraty CTCF.

Funkcjonalny test locus *Aldh1a3*

W mojej ocenie mocną stroną rozprawy jest przejście od analizy globalnej do testu mechanistycznego na konkretnym przykładzie. Autorka wykonała delecje trzech miejsc wiązania CTCF w obrębie locus *Aldh1a3* (CRISPR-Cas9) i w sposób uporządkowany zweryfikowała ich znaczenie.

Najważniejszy rezultat: w komórkach NS delecja jednego, specyficznego miejsca (#1) prowadzi do ~2,4-krotnego wzrostu ekspresji *Aldh1a3*, podczas gdy w ES analogiczny efekt nie występuje.

Autorka interpretuje to w kategoriach izolatorowej funkcji CTCF: miejsce to blokuje kontakt promotora z potencjalnymi wzmacniaczami aktywnymi w NS, a orientacja motywu sprzyja modelowi zależnemu od kohezyny.

Ten fragment pracy dobrze realizuje kryterium „oryginalnego rozwiązania problemu naukowego”: pokazuje, że nawet przy stabilnym wiązaniu CTCF w genomie, funkcja danego miejsca (i jego konsekwencje transkrypcyjne) może ujawniać się dopiero w określonym kontekście epigenetycznym i rozwojowym.

Część II – lncRNA jako modulatory funkcji CTCF (Pantr1 vs Neat1)

Wątek RNA jest przedstawiony jako hipoteza wynikająca z obserwacji zwiększonej asocjacji CTCF z białkami wiążącymi RNA (np. Ddx5, FUS) w trakcie przejścia ES → NS, oraz zależności tych asocjacji od obecności RNA.

Autorka opisuje racjonalną strategię identyfikacji lncRNA potencjalnie zaangażowanych w ten proces oraz wybór *Pantr1* jako kandydata o rosnącej ekspresji w komórkach nerwowych i nasilonej interakcji z CTCF.

Szczególnie ważne są przedstawione dane funkcjonalne: testy PLA wykazały, że delecja *Pantr1* obniża poziom interakcji CTCF-Ddx5 oraz CTCF-FUS, a ponadto – na mapach Hi-C – obserwowano osłabienie pętli CTCF-CTCF (w opisie pracy zaznaczono wkład eksperymentalny współautorki/projektu w wykonaniu części analiz).

Zaletą tej części jest też próba rozstrzygnięcia „specyficzności” mechanizmu: Autorka wskazuje, że inne lncRNA obecne w NS (np. *Neat1*) nie kompensują efektu i w jej analizach delecja *Neat1* nie wpływała na interakcje CTCF z badanymi RBP, co wzmacnia tezę o wyspecjalizowanej roli *Pantr1*.

łącznie, część II buduje przekonującą narrację, że lncRNA mogą działać nie tylko jako regulatory transkrypcji „w klasycznym sensie”, ale również jako czynniki wpływające na stabilność kompleksów białkowych i – pośrednio lub bezpośrednio – na architekturę 3D genomu.

Część III – narzędzie do obserwacji kinetyki pętli w żywych komórkach

Trzecia część ma charakter bardziej „technologiczno-wdrożeniowy” i – co ważne – Autorka jasno przedstawia zarówno osiągnięcia, jak i ograniczenia. Z jednej strony, zaprojektowano system wizualizacji oparty o CRISPR-Sirius, pozwalający (w założeniu) na jednoczesne monitorowanie dwóch miejsc w obrębie tego samego locus, z wykorzystaniem stabilnych linii komórkowych oraz modułów PCP/MS2 itp.

Autorka opisuje też użycie metody CARGO do konstrukcji wielosgRNA i integrację z systemem CRISPR-Sirius, co jest podejściem racjonalnym do wzmocnienia sygnału i zwiększenia prawdopodobieństwa detekcji.

Z drugiej strony, w praktyce pojawiają się ograniczenia: docelowo planowano jednoczesne oznaczenie obu kotwic (5' i 3'), ale tylko jedna kotwica dała sygnał o wystarczającej intensywności i stabilności do wiarygodnej analizy; dodatkowo weryfikacja konstruktów ujawniła rozbieżności (8 sgRNA, z czego 4 unikatowe).

Moim zdaniem, mimo tych ograniczeń, część III ma wartość: (i) pokazuje samodzielność Autorki w projektowaniu i optymalizacji rozwiązania, (ii) ustanawia fundament pod real-time pomiary architektury chromatyny, których brak jest istotną barierą w badaniach dynamiki pętli. Zresztą Autorka wprost wskazuje, że implementacja w stabilnych liniach zwiększa powtarzalność i umożliwia długoterminowe obserwacje, przewyższając klasyczne podejścia wymagające utrwalania.

Rozdział „Podsumowanie i wnioski” jest bardzo syntetyczny, ale merytorycznie trafny.

Autorka porządkuje wyniki w czterech тезach:

- komórkowo-specyficzny efekt utraty CTCF na ekspresję genów (ES vs NS),

- izolatorowa rola CTCF w locus Aldh1a3 w NS,
- możliwość wzmacniania funkcji CTCF przez lncRNA i RBP podczas różnicowania (Pantr1 / Ddx5 / FUS),
- rola CTCF (wraz z RBP i lncRNA) w utrzymaniu represji genów neuronalnych i stabilizacji tożsamości NS przez konsolidację TAD/pętli.

Z punktu widzenia recenzji doktorskiej są to wnioski, które:

- są logicznie powiązane z danymi przedstawionymi w częściach I–III,
- mają walor ogólny (wykraczający poza jeden locus),
- budują spójną hipotezę o „dojrzewaniu” architektury chromatyny jako procesie modulowanym przez kompleksy białko–RNA.

Uwagi krytyczne

Uwagi, które formułuję, mają charakter porządkujący i nie wpływają na ogólnie wysoką ocenę pracy:

Część III – z perspektywy celów rozprawy – ma charakter etapu rozwojowego. Autorka jasno wskazuje ograniczenia (m.in. stabilność sygnału tylko dla jednej kotwicy, problemy konstrukcyjne wektora). Warto, aby w trakcie obrony Doktorantka doprecyzowała plan walidacji/ulepszeń systemu, tak aby w pełni umożliwiał ilościowy pomiar dynamiki pętli CTCF-CTCF.

W tekście i spisie treści pojawiają się drobne literówki (np. „toipologii” zamiast „topologii”), które warto skorygować w wersji archiwalnej rozprawy.

Ponieważ część analiz bioinformatycznych wykonywali specjaliści zespołu, zasadne byłoby (o ile nie wynika to już z pełnej wersji manuskryptu/publikacji) krótkie, bardziej „autorskie” podsumowanie najważniejszych decyzji analitycznych w rozprawie (np. w formie tabeli/ramki: zbiory danych, pipeline, kluczowe parametry), aby ułatwić czytelnikowi szybkie odtworzenie logiki analizy.

Pytania do Doktorantki

CTCF jako promotorowy „facylitator” vs izolator: Jakie czynniki – w świetle Pani danych – najbardziej determinują, czy dane miejsce wiązania CTCF będzie działało „pro-transkrypcyjnie” (kontakt promotor–wzmacniacz), czy

izolatorowo? Czy kluczowy jest stan epigenetyczny (np. H3K27ac/otwartość), czy raczej skład kompleksów (RBP/lncRNA)?

Locus *Aldh1a3*: Jak interpretuje Pani brak efektu delekcji miejsca CTCF w ES przy jednoczesnym silnym efekcie w NS? Które eksperymenty (np. CRISPRi wzmacniaczy, Capture-C/4C, testy reporterowe) byłyby Pani zdaniem najbardziej rozstrzygające dla identyfikacji funkcjonalnych enhancerów działających w NS w tym locus?

Mechanizm *Pantr1*: Czy uważa Pani, że *Pantr1* działa przede wszystkim jako (a) „pomost” stabilizujący interakcje CTCF-RBP, (b) element wpływający na lokalną strukturę kwasów nukleinowych (np. R-loop/G-quadruplex), czy (c) regulator rekrutacji kohezyny? Jakie podejście eksperymentalne pozwoliłoby na rozróżnienie tych scenariuszy?

Specyficzność *Pantr1* vs *Neat1*: Jakie cechy (sekwencja, lokalizacja subjądrowa, dynamika ekspresji, powinowactwo do RBP) mogą tłumaczyć to, że *Neat1* nie kompensuje efektu *Pantr1* w kontekście interakcji CTCF-RBP?

System obrazowania: Jakie kryteria walidacji przyjąłaby Pani, aby jednoznacznie potwierdzić, że obserwowany sygnał odpowiada konkretnemu locus (a nie np. agregacji kompleksu dCas9-RNA)? Jak planowałaby Pani doprowadzić system do stabilnej, dwukanałowej detekcji obu kotwic pętli?

Wnioski końcowe

Rozprawa mgr inż. Małgorzaty Milewskiej-Puchały stanowi spójne, merytorycznie dojrzałe opracowanie problemu badawczego o wysokiej aktualności w epigenomice i biologii 3D genomu.

Praca:

- prezentuje logicznie zaprojektowane badania,
- wnosi oryginalny wkład poznawczy (kontekstowość funkcji CTCF; mechanistyczny test locus; rola lncRNA/RBP),
- potwierdza kompetencje Doktorantki do samodzielnego prowadzenia badań z wykorzystaniem zaawansowanych metod genomiki funkcjonalnej i biologii molekularnej.

Rozprawa doktorska spełnia zgodnie z powyższymi warunkami określone w Art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Ponadto uważam, że rozprawa ta w pełni realizuje powszechnie i ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę informatyczną kandydata w zakresie biologii molekularnej i technik trójwymiarowej genomiki, oraz demonstrowa zdolność do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

W związku z powyższym, mam przyjemność przedłożyć Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN moją recenzję dotyczącą dopuszczenia Panią mgr inż. Małgorzatę Milewską-Puchałę do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ponadto, ze względu na wysoki poziom merytoryczny pracy, jej aktualność oraz powiązanie z dorobkiem publikacyjnym w bardzo dobrych czasopismach, jak również klarowność rozprawy, jej staranne przygotowanie oraz czytelny sposób prezentacji tematyki badawczej, metodyki i wyników, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



Dariusz Plewczynski, PhD, Professor of Exact and Natural Sciences; Principal Investigator

Phone: +48 22 554 36 54 or +48 22 234 7219

e-mail: d.plewczynski@cent.uw.edu.pl or Dariusz.Plewczynski@pw.edu.pl www: <https://plewczynski-lab.org>

Laboratory of Functional and Structural Genomics LFSG

Centre of New Technologies, University of Warsaw; Banacha 2c Street, 02-097 Warsaw, Poland

Laboratory of Bioinformatics and Computational Genomics LB!GO

Faculty of Mathematics and Information Science, Warsaw University of Technology; ul.

Koszykowa 75, 00-662 Warsaw, Poland