



Balice, 2 czerwca 2020

Dr hab. Jolanta Opiela
Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Ryczek

pt.: „**Modyfikacje genomu świni na potrzeby ksenotransplantacji z zastosowaniem konstrukcji genetycznych przygotowanych w technologii CRISPR/Cas9**”

Techniki inżynierii genetycznej są ogromnym osiągnięciem naukowym ostatnich lat. Obecnie laboratoria na całym świecie korzystają już z bardzo precyzyjnych technik edytowania genów. Takie możliwości daje technika CRISPR/Cas9. Zastosowanie systemu CRISPR/Cas9 wpłynęło na ponowny wzrost zainteresowania ksenotransplantacjami, bowiem metoda ta umożliwia precyzyjną modyfikację genomu zwierzęcia. Badania przeprowadzone w ramach ocenianej pracy doktorskiej wpisują się w problematykę związaną z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9 do otrzymywania multimodyfikacji genomu świni na cele ksenotransplantacyjne. Niestety metoda CRISPR poza konkretną zmianą, którą może wprowadzić, wprowadza także liczne losowe zmiany w DNA, których skutków znaczenia nie zawsze jesteśmy w stanie przewidzieć. Ten aspekt metody również jest podjęty w niniejszej rozprawie.

W ocenianej pracy Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego wyzwania jakim jest modyfikacja genomu świni na potrzeby ksenotransplantacji z zastosowaniem konstrukcji genetycznych przygotowanych w technologii CRISPR/Cas9.

Ocena pracy

Wstęp jest opracowaniem liczącym 27 stron i zawiera przejrzyste skonstruowany blok informacji podzielony na 7 wątków. Autorka rozpoczyna od naszkicowania problemów współczesnej transplantologii, poprzez opis ksenotransplantacji i patogenezy odrzucenia ksenoprzeszczepu z wyjaśnieniem 5 etapów odpowiedzi immunologicznej na przeszczep to jest: nadostrego odrzucenia przeszczepu, ostrego odrzucenia wewnątrznaczyniowego i komórkowego, odrzucenia przewlekłego i zaburzenia funkcji układu krzepnięcia. Następnie podejmuje istotny z punktu ksenotransplantacji temat ryzyka infekcji patogenami wirusowymi pochodzącymi od świni. Rozdział podsumowuje opis osiągnięć w badaniach przedklinicznych dotyczących ksenotransplantacji oraz opis rozwoju inżynierii genetycznej w badaniach nad ksenotransplantacjami. Szczególną uwagę poświęcono systemowi

CRISPR/Cas z opisem działania poszczególnych składowych systemu, mechanizmu naprawy dwuniciowych pęknięć DNA oraz zastosowań i ograniczeń systemu. Wyrażam uznanie za przystępny przekaz zwłaszcza niełatwej tematyki edycji genomu. Wynika to z pewnością z dużego już doświadczenia publikacyjnego Pani mgr inż. Ryczek. Doktorantka jest pierwszym autorem 6 rozdziałów w monografiach naukowych i współautorem dwóch monografii naukowych oraz czterech prac oryginalnych w czasopiśmie o IF powyżej 1. Prace te są ściśle związane z tematyką doktoratu. Uważam za godne podkreślenia aktywne działanie Doktorantki w zakresie rozpowszechniania wiedzy naukowej.

W rozdziale Hipotezy Doktorantka formułuje 6 hipotez badawczych w ramach celu ogólnego jakim jest ocena konstrukcji genetycznych trzech generacji systemu CRISPR/Cas9.

Z kolei w rozdziale Cel pracy jako główny cel badań podano wprowadzenie modyfikacji za pomocą systemu CRISPR/Cas9 obejmujących precyzyjną integrację genu *CD47* człowieka w obrębie *locus Rosa26* świni oraz inaktywację genów *GGTA1*, *CMAH*, β *4GalNT2*, *vWF* i *ASGR1* świni. W ramach celu głównego wytypowano kilka celów szczegółowych adekwatnych do kolejnych etapów doświadczenia rozumianego jako realizowanie celu głównego. Zauważam tutaj pewien brak konsekwencji w sformułowaniu celu pracy w odniesieniu do wcześniej przedstawionych hipotez. Podane cele szczegółowe byłyby czytelniejsze gdyby zostały jasno rozdzielone jako np. cel CZEŚCI 1. doświadczeń, których celem było sprawdzenie hipotezy i tu numery hipotez. Celem CZEŚCI 2. doświadczeń było zweryfikowanie hipotezy, zgodnie z którą ... itd.

W związku z przedstawionymi hipotezami mam pewien niedosyt dotyczący informacji podanych we wstępie. Brak w nim opisu dotyczącego konstrukcji genetycznych czy plazmidów pierwszej, drugiej oraz trzeciej generacji systemu CRISPR/Cas9. Czym różnią się od siebie wymienione klasy? Pożądane informacje znalazłam dopiero w rozdziałach Wyniki i Dyskusja.

We wstępie zabrakło też opisu stosowanych obecnie analiz bioinformatycznych. Pierwsza informacja na ten temat jest podana dopiero na str. 134 dyskusji „Istnieje wiele różnych narzędzi internetowych, które umożliwiają projektowanie gRNA. Czynnikiem limitującym są dostępne bazy danych związane z genomami różnych organizmów. Tak więc wyboru odpowiedniego narzędzia do predykcji miejsc docelowych hydrolizy DNA przez Cas9 dokonuje się w oparciu o wybrany model badawczy (Cui i in., 2018; Doench i in., 2016)”. Czytelnik nie ma wiedzy na temat stosowanego narzędzia TIDE i platformy Benchling- czy są to powszechnie używane narzędzia czy stosunkowo ‘świeże’ czy może nowo powstałe, które wymagają przetestowania- wykazania wiarygodnego przewidywania efektu edycji.

Rozdział **Materiały** liczący 7 stron, opisuje użyty materiał biologiczny, szczepy bakteryjne, wektory, ważniejsze odczynniki, zestawy, enzymy, standardy wielkości, oligonukleotydy wykorzystywane w pracy i ważniejszą aparaturę. Nie mam uwag do tej części pracy.

Stosowane **metody** poprawnie opisano na 17 stronach. Rozdział ten zawiera opis analiz bioinformatycznych w tym wybór krótkich oligonukleotydów (gRNA), zaprojektowanie starterów do reakcji PCR i konstrukcji donorowej zawierającej gen *CD47* człowieka. Ponadto przygotowanie konstrukcji genetycznych w systemie CRISPR/Cas9 czyli hybrydyzacje oligonukleotydów, reakcje *Golden Gate*, hydrolizę plazmidowego DNA, ligację, przygotowanie kompetentnych komórek bakterii *Escherichia coli*, transformacje bakterii i selekcje transformantów. Kolejne opisane metody to oczyszczenie produktów