

dr hab. n. med. Anna Woźniak, prof. UAM

Poznań, dnia 02.06.2020

Centrum NanoBioMedyczne

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Ul. Wszechnicy Piastowskiej 3

61-614 Poznań

### **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Ryczek**

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

**wykonanej pod kierunkiem**

**Promotora prof. dra hab. Ryszarda Słomskiego**

**Promotor pomocniczej dr inż. Magdaleny Hryhorowicz**

**w Katedrze Biochemii i Biotechnologii**

**na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii**

**Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu**

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Natalii Ryczek przygotowana została na podstawie decyzji Rady Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (pismo RND-16/4000/2020 z dnia 07 kwietnia 2020 r. – podpisane przez Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo prof. dr hab. Andrzeja Blecharczyka).

#### **Ocena doboru problematyki badawczej i tematu rozprawy**

Praca doktorska Pani mgr inż. Natalii Ryczek dotyczy problematyki modyfikacji genomu świni na potrzeby ksenotransplantacji. Choroby przewlekłe narządów (np.: serca, wątroby, płuc) mogą w schyłkowej postaci prowadzić do całkowitej ich niewydolności. Wymusza to potrzebę zwiększenia wykonywania przeszczepów. Niestety obserwuje się kolosalne dysproporcje pomiędzy podażą na narządy a popytem na nie. Sytuacja stawia przed nami konieczność poszukiwania dróg alternatywnych. Jedną z nich jest wspomniana ksenotransplantacja, która dotyczy zabiegów polegających na transplantacji, implantacji lub infuzji biorcy (człowiekowi) komórek, tkanek lub organów odzwierzęcych. Wśród kilku podawanych w literaturze modeli zwierzęcych, najkorzystniejszym wydaje się być model świni. Organy tego zwierzęcia wykazują wiele podobieństw do organów człowieka zarówno na

poziomie fizjologii jak i anatomii. Nie bez znaczenia są również zalety hodowlane w postaci względnie liczego miotu i stosunkowo krótkiego okresu dojrzewania. Jednak odległość międzygatunkowa mimo, że zmniejsza ryzyko zakażeń wirusowych, jest przyczyną występowania różnic immunologicznych. Z uwagi na to, powodzenie ksenotransplantacji uwarunkowane jest pokonaniem i/lub zniwelowaniem czynników i mechanizmów odpowiedzialnych za patogenezę odrzucenia ksenograftu. Do procesów odrzucenia przeszczepów zalicza się: odrzucenie nadostre, ostre odrzucenie naczyniowe, ostre odrzucenie komórkowe oraz odrzucenie przewlekłe. Poza odpowiedzią immunologiczną, do czynników powodujących odrzucenie ksenoprzeszczepu zalicza się również dysregulację układu krzepnięcia. Wprowadzenie odpowiednich modyfikacji w genomie świni staje się jedną ze skutecznych metod w przeciwdziałaniu odrzuceniu ksenoprzeszczepów. Na przestrzeni ostatnich trzydziestu lat możemy obserwować intensywny rozwój technik inżynierii genetycznej, które z powodzeniem wykorzystuje się w badaniach nad ksenotransplantacjami. Do technik tych zalicza się mikroiniekcję, transfer jądra komórki somatycznej, rekombinacja homologiczna, wykorzystanie odpowiednich nukleaz oraz system CRISPR/Cas9.

Uważam zatem, że tematyka przedstawiona w pracy doktorskiej jest niezwykle trafna i istotna a podjęcie próby rozwiązania problematyki modyfikacji genomu świni na potrzeby ksenotransplantacji z zastosowaniem konstrukcji genetycznych przygotowanych w technologii CRISPR/Cas9 koresponduje z aktualnymi wyzwaniami realizowanymi przez wiodące ośrodki naukowe.

### **Ocena układu pracy**

Rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Ryczek ma układ typowy dla tego typu prac, składa się z 164 stron wydruku komputerowego i obejmuje 9 rozdziałów: wprowadzenie literaturowe, hipotezy, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski, literatura (241 aktualnych pozycji). Doktorantka zamieściła wykaz osiągnięć naukowych uzyskanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej, w skład którego uwzględniła publikacje (cztery pozycje, w tym jedna z pierwszym autorstwem); rozdziały w monografiach naukowych (osiem pozycji, w tym 6 z pierwszym autorstwem), udział w grantach badawczych (dwie pozycje), staż naukowy (Katedra Biotechnologii Zwierząt Hodowlanych, Uniwersytet Techniczny w Monachium, 05.02.2018-02.03.2018), szkolenia (trzy pozycje), informację o doniesieniach zjazdowych (15 konferencji o zasięgu międzynarodowym, 45 o zasięgu ogólnopolskim). Praca zawiera również spis rycin (46 pozycji), spis tabel (26 pozycji), wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim

i angielskim. Recenzowana praca została zredagowana poprawnie, a sporadyczne usterki językowe (literówki), nie wpływają na jej ocenę, zatem je pomijam.

Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka brała udział w dwóch grantach naukowych MEDPIG i ONKOKAN w ramach prestiżowych konkursów Narodowego Centrum Badań i Rozwoju – INNOMED. Dodatkowo, Jej udział w stażu naukowym i szkoleniach wynikał z kooperacji w ramach Europejskiego Programu Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych (ang. *European Cooperation in Science and Technology – COST*) i programu Wymiany najnowszych osiągnięć w dziedzinie dużych modeli zwierzęcych (ang. *Sharing Advances on Large Animal Models – SALAAM*).

### **Ocena merytoryczna**

Wstęp literaturowy w pierwszej części zawiera zagadnienia współczesnej transplantologii ze szczególnym uwzględnieniem ksenotransplantacji w układzie świnia - człowiek. Doktorantka bardzo skrupulatnie przedstawiła patogenezę odrzucenia ksenoprzeszczepu u człowieka, jednocześnie opisując zawarte w danych literaturowych metody modyfikacji genomu świni, zapobiegające poszczególnym reakjom. Opisano przyczyny przeciwdziałające im tj. modyfikacje dotyczące nadostrego odrzucenie przeszczepu, ostrego odrzucenia wewnątrznacyniowego, ostrego odrzucenia komórkowego, odrzucenia przewlekłego i zaburzeń funkcji układu krzepnięcia. We wspomnianej części wstępu literaturowego znalazły się cytowania najnowszej literatury przedmiotu. Na szczególne uwzględnienie zasługuje fakt, że autorka na potwierdzenie efektywności modyfikacji genomu świni (ekspresja genu *CD55* człowieka u świni z jednoczesną inaktywacją genu *ULBP1* świni) w próbie eliminacji ostrego odrzucenia wewnątrznacyniowego podała cytowanie, którego była współautorem (Nowak-Terpiłowska *et al.*, 2020, *Production of ULBP1-KO pigs with human CD55 expression using CRISPR technology*. *Journal of Applied Animal Research* 48(1): 93-101, IF: 1,092). Autorka opisała również krótko ryzyko infekcji patogenami wirusowymi pochodzącymi od świni, tzw. ksenozoonoz oraz osiągnięcia w badaniach przedklinicznych dotyczących ksenotransplantacji. W drugiej części wstępu literaturowego, Doktorantka zawarła opis rozwoju metod inżynierii genetycznej w aspekcie systemu CRISPR/Cas9, jego głównych zastosowań ale i również potencjalnych ograniczeń systemu. Wstęp stanowi bogate wprowadzenie do podejmowanej w dysertacji tematyki.

W dalszej części Doktorantka sformułowała 6 trafnych hipotez badawczych dotyczących oceny konstrukcji genetycznych trzech generacji systemu CRISPR/Cas9 i klarownie określiła cel główny oraz cele szczegółowe. Autorka w głównym nurcie skupiła się

na wprowadzeniu modyfikacji za pomocą systemu CRISPR/Cas9 obejmujących precyzyjną integrację genu *CD47* człowieka w obrębie *locus Rosa26* świni oraz inaktywację genów *GGTA1*, *CMAH*,  *$\beta$ 4GalNT2*, *vWF* i *ASGR1* świni. Aby tego dokonać zaplanowała konsekwentne wykonanie następujących działań: otrzymanie konstrukcji genetycznych zawierających wytypowane po analizie bioinformatycznej (platforma internetowa Benchling) gRNA w trzech generacjach systemu CRISPR/Cas9; ocena wydajności otrzymywania modyfikacji za pomocą konstrukcji genetycznych w trzech generacjach systemu CRISPR/Cas9 w porównaniu do wydajności modyfikacji po nukleofekcji; wytypowanie na podstawie otrzymanych wyników najlepszych gRNA, które w połączeniu z Cas9 w wydajny sposób umożliwiają wprowadzenie modyfikacji w obrębie wybranych genów; wykonanie charakterystyki wybranych gRNA dla potrzeb analizy miejsc hydrolizy nukleazy Cas9 powstających poza *locus* docelowym dla krótkiego oligonukleotydu.

W rozdziale Materiały, Doktorantka opisuje materiał biologiczny pochodzący od świń: bioptaty uszu i nerki. Bioptaty uszu były pobrane od świń urodzonych w wyniku mikroiniekcji i wykorzystane jako źródło DNA do potwierdzenia modyfikacji. Natomiast z nerki pozyskiwano fibroblasty przeznaczone do nukleofekcji. Nasuwa się pytanie dlaczego do wyprowadzenia linii komórkowej fibroblastów wybrano właśnie nerkę? Idąc dalej, dlaczego z małżowiny usznej pobierano bioptat, natomiast nerkę pobierano całą? W dalszej części rozdziału Materiały, Autorka wymienia szczep bakteryjny (który również stanowi materiał biologiczny, lecz został ujęty w osobnym podrozdziale 4.2 zamiast w podrozdziale 4.1 Materiał biologiczny), stosowane wektory, ważniejsze odczynniki, zestawy i enzymy wykorzystywane do analiz, sekwencje oligonukleotydów oraz ważniejsza aparatura. W kolejnym dziale opisano szeroko (18 stron) metodykę, dzieląc go na podrozdziały, które dają klarowne rozeznanie czytającemu: analiza bioinformatyczna, przygotowanie konstrukcji genetycznych w systemie CRISPR/Cas9, oczyszczanie produktów reakcji enzymatycznych, ocena ilościowa i jakościowa kwasów nukleinowych, sekwencjonowanie, otrzymanie modyfikowanych genetycznie komórek *in vitro*, izolacja kwasów nukleinowych, reakcja łańcuchowa polimerazy, analiza modyfikacji na podstawie wyników sekwencjonowania, transkrypcja *in vitro*, mikroiniekcje. Zapis Autorki, w podrozdziale 5.6.2 Prowadzenie hodowli komórkowych, o ocenie ilości komórek w naczyniach hodowlanych za pomocą mikroskopu odwróconego *Axiovert 200*, budzi moją wątpliwość. Obserwacja mikroskopowa komórek w naczyniu hodowlanym służy ocenie jakościowej a nie ilościowej. Byłoby to możliwe, gdyby utrwalony obraz komórek kwantyfikować na pomocą odpowiedniego oprogramowania komputerowego, po

wcześniejszym barwieniu komórek. Można użyć sformułowania Autorki również w przypadku, gdybyśmy liczyli za pomocą mikroskopu odwróconego Axiovert 200 komórki umieszczone w komorze np.: Bürkera. W podrozdziale 5.6.3.1 Nukleofekcja, warto by było uniknąć sentencji: „Aparat włączono i wybrano program T-007.” a wpisać raczej zdanie, które pięknie wybrzmiało dopiero w podrozdziale 6.3.3. Transfekcja za pomocą nukleofekcji: „Transfekcję prowadzono za pomocą programu T-007 dedykowanego dla transfekcji keratynocytów noworodkowych człowieka, umożliwiającego wysoką żywotność komórek w trakcie tego procesu”. O solidnie opanowanym przez Doktorantkę warsztacie osoby pracującej w bardzo wymagających i sterylnych warunkach hodowli *in vitro* świadczy fakt, że Pani Natalia z wielką dbałością dobierała nie tylko programy nukleofekcji, ale również i fakt, że do odklejania komórek rosnących w sposób adherentny stosowała delikatny acz skuteczny enzym akutazę, a nie powszechnie i często bez refleksji stosowaną trypsynę.

Istnieje wiele technik przeprowadzania transfekcji komórek zwierzęcych. Jedne z nich charakteryzują się dość dużą śmiertelnością komórek i stosunkowo wysoką efektywnością, inne – odwrotnie, niższą efektywnością ale wykorzystują naturalne właściwości błon komórkowych. Z uwagi na dyskusyjny charakter tego zagadnienia, proszę o uzasadnienie wyboru techniki transfekcji komórek (nukleofekcja) podczas publicznej obrony. Dodatkowo, proszę o udzielenie odpowiedzi na pytanie, co Pani sądzi o metodach transfekcji z zastosowaniem nanoczątek?

Rozdział opisujący wyniki zasługuje na wyróżnienie. Doktorantka już w pierwszych akapitach trafnie uzasadnia wybór genów, których modyfikację zaplanowała. Wybrano trzy geny *GGTA1*, *CMAH* oraz  *$\beta$ 4GalNT2* świni kodujące enzymy, które biorą udział w syntezie antygenów powierzchniowych w komórkach (epitopu Gal, kwasu Neu5Gc w glikoproteinach błony komórkowej oraz antygeny Sd(a)). Wyłączenie tych trzech genów świni jest odpowiedzialne za ograniczenie wystąpienia odrzucenia nadostrego ksenograftów. Drugą grupę stanowiły dwa geny: pierwszy (*vWF*) kodujący czynnik von Willebranda, drugi (*ASGRI*) kodujący podjednostkę pierwszą receptora asialoglikoproteinowego świni. Wybrano również *locus Rosa26* świni jako odpowiednie miejsce do wprowadzania transgenów, w tym przypadku wybrano gen *CD47* człowieka, którego produkt przeciwdziała odpowiedzi immunologicznej ze strony makrofagów. Opis wyników jest obszerny ale niezwykle klarowny, przedstawiony w konsekwentny sposób, część z nich jest umieszczona w postaci rycin (43 pozycje) i tabel (6 pozycji) co ułatwia ich analizę. Sposób prowadzenia analiz świadczy o rzetelności naukowej badacza. Autorka założyła nie tylko wybór odpowiednich *loci*, gRNA, otrzymanie konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9 pierwszej generacji, mikroiniekcję (bez uzyskania

organizmów modyfikowanych) ale także wybór dodatkowych gRNA (zwiększających prawdopodobieństwo sukcesu przyszłych modyfikacji *in vivo*), otrzymanie dodatkowych konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9 drugiej i trzeciej generacji i modyfikowanie genomu świni *in vitro* również metodą nukleofekcji. Ponadto, Doktorantka dokonała wnikliwej analizy miejsc docelowych modyfikacji i miejsc poza *locus* docelowym, co znacznie podwyższa wartość pracy. Cenne informacje dla nas wszystkich można zaczerpnąć z porównania analizy bioinformatycznej i analizy laboratoryjnej przy wyborze najlepszych gRNA, co może mieć decydujący wpływ na powodzenie badań w przyszłości. Taką staranność planowania badań i interpretacji ich wyników zdobywa się dzięki opiece naukowej doświadczonych w pracy eksperymentalnej promotorów.

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaję:

1. Otrzymanie konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9 trzech generacji.
2. Mikroiniekcja i modyfikacja genomu świni *in vitro*.
3. Analiza modyfikowanych genetycznie komórek świni z uwzględnieniem miejsc docelowych i poza *locus* docelowym.
4. Porównanie analiz bioinformatycznych i analiz laboratoryjnych z zakresu wyboru gRNA i miejsc modyfikacji poza *locus* docelowym.

W dyskusji pani mgr inż. Natalia Ryczek umiejętnie konfrontuje wyniki swojej pracy z wynikami publikowanymi w aktualnej literaturze anglojęzycznej. Sposób jej przedstawienia świadczy o dużej znajomości zagadnienia. Rozprawę doktorską kończy 9 poprawnie skonstruowanych wniosków, które korespondują z założeniami pracy. Rozdział przedstawiający literaturę ukazuje 241 pozycji. Streszczenia w języku polskim i angielskim są poprawne, choć zalecałabym ich skrócenie.

### **Wniosek końcowy**

W podsumowaniu, praca doktorska pani mgr inż. Natalii Ryczek została poprawnie napisana i zredagowana, zgodnie z wymaganiami stawianymi tego typu opracowaniom a sama praca ma charakter aplikacyjny. Wiedza Doktorantki w opisywanej tematyce jest rozległa i ugruntowana, o czym świadczy sposób i jakość podawanych przez Nią informacji. Warsztat badawczy zasługuje na szczególne uznanie. Pragnę zaznaczyć, iż wskazane w recenzji uchybienia mają charakter sugestii i przyczynku do przemyśleń podczas prezentowania wyników w przyszłości. Pracę oceniam pozytywnie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pani mgr inż. Natalii Ryczek pt.: „Modyfikacje genomu świni na potrzeby ksenotransplantacji z zastosowaniem konstrukcji genetycznych przygotowanych w technologii CRISPR/Cas9" spełnia wszystkie wymagania określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 z 2003 r., poz. 595, z późn. zm). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, o dopuszczenie pani mgr inż. Natalii Ryczek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze wysoką ocenę rozprawy, współautorstwo w czterech publikacjach w czasopismach naukowych oraz nową dla nauki wiedzą o dużym potencjale użytkowym, zwracam się do Rady Dyscypliny z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

*Anna Wójcik*