



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

reakcji enzymatycznych i ocena ilościowa i jakościowa kwasów nukleinowych obejmująca analizę elektroforetyczną i spektrofotometryczną. Sekwencjonowanie zlecono w Pracowni Sekwencjonowania Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Opis otrzymania modyfikowanych genetycznie komórek *in vitro* zawiera izolację pierwotnych komórek nerkowych świni i prowadzenie ich hodowli *in vitro* oraz wprowadzanie modyfikacji do pierwotnych komórek nerkowych metodami nukleofekcji i selekcji antybiotykowej, ale tylko dla komórek po nukleofekcji plazmidami *pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0*. Izolacja kwasów nukleinowych obejmowała izolację plazmidowego DNA, DNA z pierwotnych fibroblastów nerkowych świni oraz ekstrakcję DNA z bioptatu ucha świni. Następne metody to kolonijna reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) i analiza wprowadzonych modyfikacji genetycznych oraz analiza modyfikacji na podstawie wyników sekwencjonowania. Kolejna opisana metoda to transkrypcja *in vitro*. Brakuje informacji kto jest autorem składu podanych mieszanin tj.: mieszaniny do hydrolizy plazmidowego DNA czy mieszaniny reakcyjnej wykorzystanej do transkrypcji *in vitro*. Generalnie uwaga ta odnosi się do wszystkich opisów mieszanin reakcyjnych podanych w rozdziale Metody- nie wiadomo który protokół jest zaczerpnięty od producenta, który z publikacji a który jest oryginalnym pomysłem Doktorantki. Opis mikroiniekcji jest bardzo ogólny i prawdopodobnie wynika z faktu, że procedura ta nie była wykonywana przez Doktorantkę, o czym Autorka informuje.

Opis w rozdziałach **Material** i **Metody** jest wzbogacony tabelami i jedną ryciną. Wszystkie tabele i rycina są czytelne i ułatwiają zrozumienie technicznego wykonania doświadczeń. Jestem pod wrażeniem bogatego warsztatu metodycznego z jakiego korzysta Doktorantka. Posiada umiejętności z zakresu biologii molekularnej znacznie wyższe niż przeciętne. Sposób opisu wykonanych badań jest zwięzły i klarowny a jednocześnie podane są wszystkie informacje do samodzielnego powtórzenia eksperymentu przez odbiorcę. Podkreślić tutaj trzeba ogromną pracę jaką włożyła Doktorantka w wykonanie części eksperymentalnej doktoratu. Drobne uwagi jakie przedstawiłam nie wpływają na moją wysoką ocenę tych części (rozdziałów **Material** i **Metody**) doktoratu.

WYNIKI, DYSKUSJA i WNIOSKI

Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego zadania uzyskania świni transgenicznej ze zmodyfikowanymi kilkoma genami. Wyłączenie genów *GGTA1*, *CMAH* oraz $\beta 4GalNT2$ świni miało na celu eliminację nadostrego odrzucenia ksenograftów. Przeciwdziałanie zaburzeniom działania układu krzepnięcia miało zostać osiągnięte poprzez wyłączenie genu *vWF* świni w przypadku przeszczepiania płuc oraz wyłączenia genu *ASGR1* świni, w odniesieniu do przeszczepów wątroby. Aby wyeliminować odpowiedź immunologiczną związaną z makrofagami zoptymalizowano wprowadzanie genu *CD47* człowieka do *locus Rosa26* świni.

W przedstawionych badaniach nie udało się otrzymać zwierząt genetycznie modyfikowanych za pomocą konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9 pierwszej generacji mimo, że Zespół jako jedyny w Polsce ma duże pozytywne doświadczenia z zakresu pozyskiwania transgenicznych świń. Według Autorki niepowodzenie otrzymania świń modyfikowanych genetycznie prawdopodobnie wynikało z użycia cząsteczek gRNA, które po połączeniu z Cas9 prowadziły mało wydajnie do hydrolizy DNA w miejscu docelowym w genomie. Ponadto, stosunek molarny wprowadzanych plazmidów, w tym kodującego

nukleazę Cas9 do kodującego gRNA wynoszący 1:1 nie daje efektywnych wyników otrzymywania modyfikacji. Zmiana stosunku molarnego Cas9 do gRNA na 3:1 znacząco zwiększyła tę wydajność w badaniach Seki i Rutz, (2018). Inni autorzy największą wydajność w uzyskiwaniu modyfikacji otrzymali po zastosowaniu stosunku wagowego nukleazy Cas9 do gRNA 1:1, co stanowi w przeliczeniu stosunek molarny tych elementów odpowiednio 1:5 (Kouranova i in., 2016). Zatem problem ustalenia odpowiednich ilości plazmidów kodujących Cas9 i gRNA jest kluczowym w przypadku dostarczania systemu CRISPR/Cas9 pierwszej generacji do zygot zwierząt za pomocą mikroiniekcji. Dlatego tak istotne jest precyzyjne dobranie stosunku ilościowego plazmidów kodujących gRNA oraz nukleazę Cas9.

Jak podaje Autorka wykorzystanie systemu CRISPR/Cas9 drugiej generacji eliminuje problem stosunku ilościowego dostarczanych do komórek lub zygot nukleazy Cas9 oraz gRNA. W drugiej generacji oba te elementy znajdują się w strukturze jednego plazmidu. Zgodnie z badaniami Zhang i Yu, (2008) na drodze do uzyskania zwierząt transgenicznych, mieszanina czterech konstrukcji genetycznych opartych na plazmidzie *MLM3636* (zawierających gRNA: gGGTA1 F1/R1, gCMAH F1/R1, gβ4GalNT2 F1/R1, gvWF F1/R1) oraz plazmidzie kodującym nukleazę Cas9 może być cytotoksyczna dla zygot świni po zabiegu mikroiniekcji. Wyniki Autorki przeczą temu doniesieniu gdyż w wyniku zastosowanej procedury uzyskano urodzenie się 30 osobników potencjalnie transgenicznych co sugeruje, że problem wynika raczej ze stosunku molarnego elementów systemu CRISPR/Cas9 wykorzystanych w mieszaninie do mikroiniekcji.

Uzyskanie świń transgenicznych poprzez mikroiniekcje celem otrzymania integracji genu *CD47* człowieka doprowadziły do urodzenia 21 osobników, niestety żadne z tych zwierząt nie posiadało pożądanej zmiany. Według Autorki niepowodzenie może wynikać z niskiej częstotliwości naprawy dwuniciowego pęknięcia DNA na zasadzie rekombinacji homologicznej w obecności konstrukcji donorowej (HDR) w porównaniu do niehomologicznego łączenia końców DNA (NHEJ). Może też być rezultatem opisanego powyżej problemu odpowiedniego stosunku molarnego elementów systemu CRISPR/Cas9 w mieszaninie do mikroiniekcji.

Przedstawione w niniejszej rozprawie badania wykazały też istotne znaczenie weryfikacji wytypowanych bioinformatycznie gRNA w kontekście wydajności otrzymywania modyfikacji za ich pośrednictwem. Aby dokonać porównania wydajności poszczególnych gRNA w uzyskaniu modyfikacji w komórkach hodowanych *in vitro* wykorzystano system CRISPR/Cas9 trzeciej generacji. Uzyskane wyniki bezdyskusyjnie wykazały, że weryfikacja danych otrzymanych bioinformatycznie jest niezbędna. Z badanych 6 różnych gRNA aż 4 gRNA cechowała znacząco odmienna wydajność ogólna modyfikacji w komórkach hodowanych *in vitro*. Zatem w kontekście otrzymywania jednoczesnych multimodyfikacji genomu świni na cele ksenotransplantacyjne taka ocena poszczególnych gRNA jest kluczowa i konieczna. Konsekwencją jej będzie wyższa efektywność, a w rezultacie redukcja liczby zwierząt potrzebnych do zmodyfikowanych osobników co jest istotne z etycznego punktu widzenia i stanowi cel badaczy zajmujących się badaniami z zakresu ksenotransplantacji. Badania wykonane w ramach niniejszej pracy wpisują się w ten nurt, dlatego wartość otrzymanych wyników oceniam bardzo wysoko.

W kulturach komórkowych *in vitro* potwierdzono obecność jedenastu z dwudziestu jeden (czy dwunastu w dwudziestu dwóch- tabele 25 i 26?) wytypowanych bioinformatycznie

miejsc hydrolizy DNA poza celem, w których pośredniczą gRNA z wybranych jako najlepsze konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9. Dla przykładu: wyniki analizy przeprowadzonej dla konstrukcji genetycznej z gvWF F2/R2 ujawniły obecność dwóch miejsc hydrolizy DNA przez nukleazę Cas9 poza locus docelowym. Jedno locus, w którym powstają niepożądane mutacje zostało określone na podstawie analizy bioinformatycznej jako powstające z największym prawdopodobieństwem. Jest to miejsce znajdujące się poza sekwencjami kodującymi w genomie świni, a powstające zmiany nie były istotne statystycznie. Drugie miejsce, w którym potwierdzono powstawanie mutacji niepożądanych znajduje się w obrębie genu *COMT* świni. Gen *COMT* koduje katecholo-O-metylotransferazę świni (*COMT*, ang. catechol-O-methyltransferase). Z kolei dla *gASGR1 F3/R3* połączonego z nukleazą Cas9 ustalono jedno miejsce hydrolizy DNA powstające poza locus docelowym w obrębie genu *C1orf210* świni. Dlatego Autorka wnioskuje, że po otrzymaniu świń modyfikowanych genetycznie należy sprawdzić wszystkie *loci* w genomie świni, w których potwierdzono obecność mutacji niepożądanych powstających po zastosowaniu konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9. Powyższe badania udowodniły przydatność narzędzia internetowego TIDE do sprawdzania miejsc hydrolizy DNA przez nukleazę Cas9 powstających poza celem.

Cytując Doktorantkę „Do otrzymywania pożądaných modyfikacji genomu świni można wykorzystać modyfikowane genetycznie pierwotne fibroblasty nerkowe świni w procedurze SCNT lub zweryfikowane konstrukcje genetyczne, które za pomocą mikroiniekcji dostarczy się do zygot”. Brakuje mi tu szerszego komentarza Autorki. Nasuwa się wniosek, że brak uzysku zwierząt transgenicznych przy wykorzystaniu mikroiniekcji jest dowodem na to, że droga optymalizacji efektywnej wydajności tej metody jest wciąż otwarta. Tak się dzieje przynajmniej dla konstrukcji systemu pierwszego. Odnosnie wykorzystania drugiego systemu Autorka stwierdziła w jednym z wniosków, że „Konstrukcje genetyczne systemu CRISPR/Cas9 drugiej generacji zawierające badane gRNA wykazały wyższą wydajność otrzymywania modyfikacji dla wszystkich badanych wariantów w porównaniu z całkowitą wydajnością odpowiadających im konstrukcji systemu pierwszej generacji” oraz że „Wykorzystanie do mikroiniekcji wytypowanych jako najlepsze konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9 drugiej generacji skierowanych na *locus Rosa26*, gen *GGTA1*, *CMAH*, $\beta 4GalNT2$, *vWF* oraz *ASGR1* świni powinno zwiększyć wydajność otrzymywania osobników modyfikowanych genetycznie” jednak efektywności tej nie znamy. Przyznaję, że mam pewien niedosyt w kwestii rozważań Autorki na temat efektywności metody, zarówno w odniesieniu do jej wyników własnych jak i efektywności uzyskiwanej przez innych autorów. W mediach bombarduje się nas informacjami o rewelacyjnym narzędziu do edycji genów jakim jest technologia CRISPR/Cas9 a tymczasem realia wskazują na istnienie wielu problemów i wynikających z ich rozwiązywania nowych pytań. Interesująca jest w tej sytuacji ocena Doktorantki w kwestiach 1) faktycznej efektywności metody w odniesieniu do produkcji zwierzęcia transgenicznego u którego stwierdzamy knock-out bądź insercję genu; 2) procentowych szans produkcji nowego białka; 3) szans utrzymania wprowadzonych zmian w następnych pokoleniach; 4) najlepszej obecnie metody (mikroiniekcja czy SCNT) uzyskiwania zwierząt transgenicznych z uwzględnieniem wybranej generacji konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9, sposobu transfekcji, polecanej linii komórkowej oraz liczby modyfikowanych genów jednocześnie.

Odniosę się teraz do szczegółów prezentacji wyników, które przedstawiono na ogółem 58 stronach. Opatrzono są 42 rycinami i sześcioma tabelami. Jakość graficzna, kolorystyka,

opis pod rycinami i wykresami, sposób naniesienia danych statystycznych nie budzą żadnych zastrzeżeń. Ryciny przedstawiające wyniki analizy PCR np. wykrywanie konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9 pierwszej generacji z gRNA wybranymi w pierwszym etapie badań w transformowanych koloniach bakteryjnych metodą kolonijnej PCR czy wyniki analizy produktów transkrypcji *in vitro* po otrzymaniu konstrukcji genetycznych w formie RNA czy przykładowe wyniki oceny jakościowej ekstraktów DNA uzyskanych z bioapatów uszu świń potencjalnie modyfikowanych genetycznie po mikroiniekcji czy detekcje modyfikacji w obrębie *locus Rosa26* i integracji genu *CD47* człowieka za pomocą PCR są znakomitej jakości. Moje uznanie budzi doskonała dokumentacja analizy jakościowej badanych konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9 trzech generacji oraz dokumentacja wykrywania konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9 pierwszej, drugiej i trzeciej generacji z gRNA wybranymi w drugim etapie badań w transformowanych koloniach bakteryjnych metodą kolonijnej PCR. Doktorantka posiada umiejętność wyprowadzania i hodowania pierwotnej linii fibroblastów nerkowych świni, czego dowodem jest poprawna morfologia komórek w hodowli *in vitro* pokazana na jednej z rycin. Bardzo dobrej jakości są zdjęcia ilustrujące wydajność nukleofekcji prowadzonej na pierwotnych fibroblastach nerkowych świni, szczególnie połączenie widoku w świetle widzialnym z widokiem uzyskanym z zastosowaniem lampy do detekcji fluorescencji. Znakomita jest dokumentacja analizy miejsc docelowych modyfikacji dla badanych konstrukcji genetycznych metodą rozdziału elektroforetycznego produktów PCR oraz analizy potencjalnych miejsc powstawania mutacji niepożądanych za pomocą rozdziału elektroforetycznego produktów PCR. Kilkanaście rycin prezentuje profile insercyjno-delecyjne oraz prawdopodobieństwo insercji poszczególnych nukleotydów uzyskanych w programie TIDE dla analizowanych konstrukcji genetycznych z badanymi sześcioma gRNA w trzech wariantach F1/R1, F2/R2, F3/R3 oraz kilka rycin prezentuje profile insercyjno-delecyjne otrzymane dla potencjalnych miejsc powstawania niepożądanych mutacji po zastosowaniu konstrukcji genetycznej zawierającej gRNA wybranych jako najlepsze do wprowadzenia zmian w sekwencji badanych *loci* genomu świni czyli gRosa26 F1/R1, gGGTA1 F1/R1, gCMAH F3/R3, gβ4GalNT2 F3/R3, gvWF F2/R2 i gASGR1 F3/R3. Wyniki prezentowane w tabelach są źródłem bardzo interesujących danych i właśnie taki sposób prezentacji gwarantuje ich poprawny i klarowny odbiór. Jedynie tabela 22 ze spisem wykonanych mikroiniekcji z dostarczonymi konstrukcjami genetycznymi systemu CRISPR/Cas9 pierwszej generacji pozostawia niedosyt w kwestii zawartych w nich danych. Brakuje przedstawienia takich danych jak liczba powtórzeń mikroiniekcji do przedjądra i do cytoplazmy. Informacja ta jest interesująca gdyż zgodnie z danymi literaturowymi mikroiniekcje do cytoplazmy są efektywniejsze i ciekawa jestem czy Doktorantka potwierdza tę obserwację. Poza tym ważna byłaby informacja ile świniom wykonano transplantacje zarodków i w jakiej liczbie. Ile zygot pobrano od superowulowanych dawczyń poszczególnych ras: Landrace, Duroc, Hampshire i PBZ990? Ile wybranych zygot przeniesiono do jajowodów biorczyń podczas zabiegu chirurgicznego? Rozumiem, że tego typu danymi dysponuje prof. Jacek Jura jednak w przypadku przygotowania pracy do druku podejrzewam, że informacje te mogą być wymagane.

W tym miejscu chciałabym pochwalić Doktorantkę za szybkie reagowanie na nowości naukowe. W niniejszych badaniach podjęto próbę dostarczenia systemu CRISPR/Cas9 do

zygot świni w formie RNA celem zwiększenia wydajności otrzymywania zwierząt modyfikowanych genetycznie. Za pomocą transkrypcji *in vitro* otrzymano mRNA dla Cas9 oraz sgRNA z gASGR1 F1/R1. Doniesienia wykazujące słuszność tego podejścia pojawiły się już w trakcie wykonywania pracy doktorskiej (Cebrian-Serrano i in., 2017; Chu i in., 2016; Redel i in., 2018).

Reasumując poza drobną uwagą powyżej, nie mam zastrzeżeń odnoszących się do merytorycznej strony uzyskanych wyników, które oceniam bardzo wysoko.

Dyskusja przeprowadzona jest w prawidłowy sposób. Wskazuje na dużą znajomość tematyki przez Doktorantkę jak i na bardzo dobrą znajomość literatury światowej. W tym rozdziale cytowane prace opublikowano w większości w ostatnich pięciu latach co jest też dowodem na aktualność prowadzonych przez Doktorantkę badań. Rozdział Dyskusja zawarty na 14 stronach koncentruje się na osiągniętych wynikach i ich interpretacji na tle prac innych Autorów. Piśmiennictwo bardzo bogate, obejmuje 241 pozycji literatury. Myśli formułowane są jasno a wywody przeprowadzono logicznie. Dojrzałość Doktorantki w realizacji dysertacji wynika z pewnością z faktu, że jest członkiem znakomitego zespołu badawczego kierowanego przez prof. Ryszarda Słomskiego posiadającego najwyższe kompetencje w tematyce modyfikacji genomu dużych zwierząt gospodarskich. Dyskusja kończy się sformułowaniem dziewięciu wniosków znajdujących pełne odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach.

Reasumując uważam, że Autorka wykonała wyjątkowo ambitną pracę, starannie zrealizowaną i bardzo wartościową. Odnosi się to zarówno do samego zakresu przeprowadzonych badań, których wykonanie wymagało opanowania wielu trudnych i różnorodnych metod, jak też uzyskanych wyników, które oceniam jako niezwykle wartościowe dla poznania problemów związanych z wprowadzeniem modyfikacji genomu za pomocą systemu CRISPR/Cas9.

Upoważnia mnie to stwierdzenia, iż przedstawiona mi do oceny dysertacja spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr inż. Natalii Ryczek do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto ze względu na aktualność i wysoką rangę podjętej problematyki, opanowanie i zastosowanie nowoczesnych metod badawczych a przede wszystkim uzyskanie wartościowych wyników, proponuję wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Jolanta Opule