

prof. dr hab. inż. Rafał Barański
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie
Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.:
„Opracowanie systemu oceny efektywności kompleksów nukleazy Cas9
na przykładzie kierunkowej mutagenyzy genu *ABA9'OH1*
związanego ze spoczynkiem nasion u pszenicy i pszenżyta”

autor rozprawy:
mgr Krzysztof Michalski

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje wyniki badań realizowanych w Laboratorium Kontroli Genetycznie Modyfikowanych Organizmów IHAR-PIB w Radzikowie. Promotorem jest prof. dr hab. inż. Janusz Zimny, a promotorem pomocniczym dr inż. Anna M. Linkiewicz. Rozprawa została przygotowana w roku 2023. Autor rozprawy wskazuje, że badania były finansowane w ramach projektu badawczego programu Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej finansowanego przez MRiRW w latach 2014-2020 (zadanie 13 pt. „Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych do skrócenia cyklu hodowlanego pszenżyta oraz do poprawy efektywności selekcji – miejscowo-specyficzna mutagenyza z wykorzystaniem miejscowo-specyficznych nukleaz”), a także z dotacji dla Młodych IHAR-PIB przyznanych w roku 2018 (jak przypuszczam beneficjentem był Doktorant) dla realizacji zadania pt. „Ewaluacja aktywności konstruktów TALEN metodą przejściowej koekspresji z markerem fluorescencyjnym”.

Rozprawa doktorska została przedstawiona jako cykl trzech artykułów naukowych opatrzonych wspólnym opracowaniem:

- 1) Michalski K., Hertig C., Mańkowski D.R., Kumlehn J., Zimny J., Linkiewicz A.M., **2021**. Functional validation of Cas9/guideRNA constructs for site-directed mutagenesis of triticale *ABA8'OH1* loci. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 7038. <https://doi.org/10.3390/ijms22137038>
- 2) Michalski K., Ziąbska P., Sowa S., Zimny J., Linkiewicz A.M. **2023**. Evaluation of CRISPR/Cas9 constructs in wheat cell suspension cultures. *Int. J. Mol. Sci.* 24: 2162. <https://doi.org/10.3390/ijms24032162>
- 3) Cardi T., Murovec J., Bakhsh A., Boniecka J., Bruegmann T., Bull S.E., Eeckhaut T., Fladung M., Galovic V., Linkiewicz A., Lukan T., Mafra I., Michalski K., Kavas M., Nicolia A., Nowakowska J., Sági L., Sarmiento C., Yildirim K., Zlatković M., Hensel G., Van Laere K. **2023**. CRISPR/Cas-mediated plant genome editing: outstanding challenges a decade after implementation. *Trends Plant Sci.* 28(10):1144-1165. doi: 10.1016/j.tplants.2023.05.012

Powyższe artykuły zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych tj. dwa z nich w International Journal of Molecular Science wydawnictwa MDPI (IF: 5,924; 140 pkt. wg. listy czasopism MEiN) i jeden artykuł w Trends in Plant Science wydawnictwa Cell Press (aktualny IF: 22,012 i 200 pkt.). W dwóch pierwszych publikacjach

Doktorant jest pierwszym autorem. Opublikowane informacje o roli poszczególnych autorów wskazują, że Doktorant pełnił główną rolę w tworzeniu koncepcji, doborze metod, wykonaniu badań, opracowaniu i przedstawieniu wyników i napisaniu pierwszej wersji manuskryptów. Jest to zgodne z oświadczeniami pozostałych współautorów, którzy albo wskazali mgr K. Michalskiego jako pomysłodawcę i głównego wykonawcę albo opisali swój udział w powstaniu publikacji. W przypadku publikacji trzeciej (w Trends in Plant Science), która ma charakter przeglądowy, brak jest opisu roli współautorów w artykule. Oświadczenia mgr K. Michalskiego i współautorów tego artykułu wskazują, że Autor rozprawy brał aktywny udział w opracowaniu dwóch sekcji artykułu. Rozprawa obejmuje omówienie cyklu publikacji w rozdziałach IV-IX tj. przegląd literatury, cel badań i hipotezy, materiał i metody, omówienie wyników, podsumowanie i wnioski, zajmujące łącznie 19 stron. Ponadto, rozprawę uzupełniają streszczenia w j. polskim i angielskim, spis treści, wykaz skrótów i spis 65 pozycji cytowanej w rozprawie literatury naukowej i opublikowanych głównie w ostatnich latach. Dołączone zostały wydruki artykułów w/w wraz z materiałami uzupełniającymi (supplementary materials) i oświadczenia współautorów.

Rozdział przegląd literatury obejmuje trzy podrozdziały. W pierwszym, w oparciu o pięć źródeł literaturowych, Autor przedstawia problem porastania tj., przedźniwnego kiełkowania ziarniaków zbóż. Przypuszczam, że w zamyśle Autora podrozdział ten miał stanowić uzasadnienie celowości podjęcia badań nad ograniczeniem porastania, a zatem szkoda że zabrakło choćby podstawowych informacji o gatunkach docelowej mutagenezy, tj. pszenicy i pszenżycie, a także bardziej wnikliwych informacji o skali i częstości występowania oraz skutków ekonomicznych porastania, zwłaszcza u tych gatunków. Drugi podrozdział dostarcza podstawową informację o mechanizmie porastania, a zwłaszcza zidentyfikowanych u zbóż genach kodujących hydroksylazy ABA. Uzasadnia on wytypowanie genu *ABA8'OH-1* jako celu ukierunkowanej mutagenezy. W ostatnim podrozdziale skrótowo omówiony został mechanizm natywnego systemu CRISPR/Cas i jego zastosowanie do ukierunkowanej mutagenezy ze wskazaniem konieczności weryfikacji aktywności kompleksów rybonukleoproteinowych (RNP) gRNA:Cas. Cały rozdział jest oparty o dobrze dobrane źródła naukowe z ostatnich lat opublikowane w czasopiśmie naukowych o zasięgu międzynarodowym. Jest jednak w moim przekonaniu stanowczo zbyt skrótowy i ogólnikowy.

Rozdział V zawiera cel badań opisanych w rozprawie, który sformułowany został w sposób wskazujący na dwa powiązane ze sobą cele. Pierwszy to opracowanie systemu oceny efektywności kompleksów gRNA:Cas9 do edycji genów pszenicy i pszenżyta na przykładzie wytypowanego genu docelowego *ABA8'OH-1*. Drugi to porównanie tego systemu z powszechnie stosowanymi systemami oceny *in vitro*. Nie zrozumiałe jest dla mnie uzupełnienie tego rozdziału o pięciopunktową listę co zostało zrobione w ramach badań zamiast podania celów pośrednich, które uzasadniałyby plan układu badawczego, schemat postępowania i dobór eksperymentów. W rozdziale tym postawiona jest także jedna hipoteza badawcza, która jest jednak dość oczywista i nie wymaga zatem weryfikacji, pomijając fakt, że jest nieprecyzyjnie sformułowana. W rozdziale VI Autor przybliży zastosowane metodyki w trakcie badań i opisane szczegółowe w załączonych publikacjach. Podanie tych informacji w sposób spójny i bez zbędnego powielania ułatwia zrozumienie toku postępowania w trakcie badań i weryfikację poprawności doboru narzędzi, protokołów i analizy danych.

Kolejny rozdział jest krótkim omówieniem załączonych publikacji. Pomimo skrótości, rozdział ten dostarcza niezbędnych informacji do zrozumienia jakie wyniki zostały uzyskane i opublikowane w dwóch pierwszych artykułach rozprawy. W przypadku trzeciego artykułu informacja ogranicza się właściwie do wskazania, które podrozdziały zostały przygotowane przez Doktoranta.

Artykuł w IJMS z 2021 roku zawiera wyniki badań dotyczące oceny skuteczności zaprojektowania dwóch gRNA i przeprowadzenia przez nie sterowanej ukierunkowanej mutagenyzy w genie *ABA8'OH1*. Z uwagi na brak dostępnych efektywnych metod pozwalających uzyskać w stosunkowo łatwy sposób edytowanych roślin pszenżyta, weryfikacja poprawności doboru gRNA jest kluczowa dla powodzenia następczych doświadczeń nad uzyskaniem materiału z wygenerowanymi mutacjami. Dlatego badania zostały tak zaplanowane aby uzyskać informacje o skuteczności gRNA przy użyciu alternatywnego systemu oceny opartego o naprawę genu reporterowego przejściowo ekspresjonowanego w komórkach liści jęczmienia. Zaproponowany system jest wyrafinowanym przykładem ukazującym nie tylko skuteczność narzędzi CRSIPR/Cas do ukierunkowanego indukowania mutacji, ale także możliwość przeprowadzania korekty informacji genetycznej, czyli tego co w przypadku człowieka określa się terminem terapia genowa. Wyniki wskazały, że oba zaprojektowane gRNA pozwalają na przywrócenie funkcjonalności genu kodującego białko żółtej fluorescencji na podstawie obserwowanych sygnałów fluorescencji. Konstrukty zawierające te gRNA i gen Cas9 zostały ponadto wprowadzone z użyciem glikolu polietylenowego do protoplastów pszenżyta. Jednocześnie dostarczono gen kodujący białko zielonej fluorescencji. Skuteczność transfekcji została oceniona na podstawie obserwacji zielonej fluorescencji komórek, a ukierunkowanej mutacji na podstawie trawienia z użyciem niespecyficznego endonukleazy T7E1 oraz wysokoprzepustowego sekwencjonowania. Ciekawe i wartościowe wyniki dostarczyły eksperymenty, w których zastosowano konstrukty kodujące gRNA i Cas9 oraz egzonukleazę TREX2. Wykazano, że chociaż oba zaprojektowane gRNA generowały mutacje, to jeżeli były one dostarczone w konstrukcjach umożliwiających jednoczesną ekspresję Cas9 i TREX2 to znacząco wzrastała efektywność mutagenyzy. Co więcej, w takim przypadku efektywność była porównywalna dla obu gRNA, podczas gdy dostarczanie konstrukcji bez genu TREX2 skutkowało nawet kilkukrotną różnicą efektywności mutagenyzy w zależności od użytego gRNA. Za szczególnie cenne należy uznać wyniki ukazujące, że homeologi *ABA8'OH1* pszenżyta były mutowane z różną częstością, w tym obserwowano preferencyjne zachodzenie mutacji w subgenomie A. W przypadku stosowania konstrukcji z TREX2, dla obu gRNA obserwowano zbliżoną efektywność mutagenyzy we wszystkich trzech subgenomach. Wyniki wskazały, że wzrost efektywności dzięki ekspresjonowaniu TREX2 był głównie związany z generowaniem dłuższych delecji i potwierdziły obserwacje raportowane wcześniej dla innych gatunków.

Drugi artykuł opublikowany w IJMS w 2023 przedstawia wyniki doświadczeń w których wymienione powyżej dwa konstrukty z sekwencjami TREX2 wprowadzono za pośrednictwem *Agrobacterium* do komórek pszenicy utrzymywanych w kulturze zawieszinowej. Dodatkowo zastosowano modyfikację tych konstrukcji dzięki której selekcję transformantów można było dokonać w obecności antybiotyku higromycyny lub alternatywnie herbicydu fosfotrycyny. Po weryfikacji skuteczności transformacji, selekcji

rozwijających się agregatów komórkowych w obecności czynnika selekcyjnego i analizie molekularnej ekspresji genu Cas9, dla obu gRNA zostało potwierdzone zajście mutacji w obrębie miejsca docelowego zlokalizowanego w genomie A i D, a w przypadku jednego z nich także w genomie B. Tym samym wykazano, że zaprojektowane narzędzia do edycji genu *ABA8'-OH1* są skuteczne dla celu indukowania mutacji także u pszenicy. Wykazano także, że system selekcji wykorzystujący fosfotrycynę jest bardziej efektywny niż z użyciem higromycyny, przynajmniej w przypadku zastosowanych stężeń czynników selekcyjnych.

Podsumowując mogę stwierdzić, że przeprowadzone badania dotyczyły istotnego problemu w kilku aspektach. Po pierwsze badania podyktowane były chęcią przeciwdziałania niepożądanemu zjawisku występowania porastania zbóż poprzez dokonanie modyfikacji w mechanizmie genetycznym regulującym ten proces. Po drugie podjęto próby modyfikacji u gatunków tzw. trudnych z uwagi na ich złożone, poliploidalne genomy i ograniczone zasoby dostępnych sekwencji oraz oporność rozwoju w kulturach *in vitro*. Podjęte badania zaplanowano z zastosowaniem różnych metod i narzędzi pozwalających przeprowadzić interpretację wyników w sposób wielostronny. Układ badawczy i dobór metod był zasadny dla uzyskania informacji o poprawności projektowanych gRNA i oceny efektywności uzyskania mutacji w genach docelowych, a ponadto potwierdzenia aktywności TREX2 w trakcie ukierunkowanej mutagenезy. Ostatecznie uzyskano wyniki potwierdzające możliwość weryfikacji skuteczności projektowania i konstruowania gRNA z zastosowaniem systemu modelowego naprawy ramki odczytu genu reporterowego. Zidentyfikowano homeologi genu *ABA8'OH1* w subgenomach pszenżyta i opublikowano ich sekwencje. Przeprowadzono udaną ukierunkowaną mutagenезę tych genów u pszenicy i pszenżyta. Stwierdzono możliwość podniesienia efektywności edycji tych genów poprzez wspomoczenie systemu gRNA:Cas9 angażując egzonukleazę TREX2 i scharakteryzowano różnice w sekwencji u mutantów uzyskanych z udziałem TREX2 i bez jej udziału. Uzyskane wyniki dają podstawy do kontynuowania badań zmierzających do uzyskania roślin będących mutantami genu *ABA8'OH1* i osłabienia tendencji do porastania ziarniaków. Opracowane protokoły w trakcie prezentowanych badań będą mogły być także stosowane przy edycji kolejnych genów pszenicy czy pszenżyta.

W skład rozprawy wchodzi także trzecia wieloautorska (22 autorów) publikacja, w której mgr K. Michalski jest głównym autorem wydzielonych dwóch sekcji opatrzonej tytułami „Testing the functionality and efficiency of editing constructs” oraz „Advanced CRISPR/Cas variants”. Zawsze stałem na stanowisku, że artykuły przeglądowe stanowiące część rozprawy doktorskiej, czy habilitacyjnej, choć nie zawierają z reguły nowych wyników badań, mogą być cennym uzupełnieniem całości dostarczając obszernych opracowań teoretycznych, w których zebrane są, podsumowane i w krytyczny sposób przedyskutowane dotychczas uzyskane wyniki badań i wiedza z nich wynikająca. W przypadku niniejszej rozprawy, obie sekcje są krótkimi, kilkunastozdaniowymi fragmentami obszernego artykułu zawierającymi dość ogólne stwierdzenia. Zawarta została także tabela z zestawieniem 21 publikacji i wykazem jakie w nich były stosowane warianty Cas, dodatkowe komponenty konstruktów genetycznych, na czym polegała opisywana modyfikacja i z jaką efektywnością zachodziła. Dokonany został zatem przegląd najnowszej literatury i obie sekcje można uznać za uzupełnienie przeglądu literatury zawartego na początku rozprawy, który jak wcześniej wspominałem jest bardzo ograniczony. Przeprowadzenie głębszej analizy i krytyczne

omówienia przytaczanych publikacji w rozdziale przegląd literatury rozprawy byłoby jednak bardziej zasadne, pozwoliłoby bowiem Doktorantowi wykazać się zdolnością do analitycznego opracowania danych literaturowych i ich głębszego omówienia, a nie tylko powołanie się na suche zestawienie tabelaryczne.

Recenzja jest także okazją do polemiki. Nie kwestionując zasadności i planu badań oraz uzyskanych wyników, które są niewątpliwie ważne dla przyszłych badań nad ukierunkowaną mutagenезą i doskonaleniem odmian zbóż, mam odmienne zdanie dotyczące zaliczania podstawowej analizy bioinformatycznej jako metody oceny wyboru gRNA, jak to zostało przedstawione przez Autora rozprawy (w streszczeniu i omówieniu wyników). Analiza sekwencji miejsca docelowego, wskazanie potencjalnych off-targetów projektowanych gRNA, czy analiza konformacji gRNA są podstawowymi elementami procedury projektowania gRNA i są one powszechnie stosowane aby zapewnić jak największe prawdopodobieństwo wyboru funkcjonalnych gRNA. W dalszej kolejności wytypowane i skonstruowane gRNA mogą być oczywiście weryfikowane eksperymentalnie, co zostało dokonane także i w niniejszej rozprawie. Zbyt daleko idące jest zatem twierdzenie Autora, że rozprawa opisuje badania nad zastosowaniem i optymalizacją systemów oceny efektywności kompleksów gRNA/Cas9 *in silico*.

W rozprawie kilkakrotnie mowa jest o porównaniu systemów oceny efektywności wykorzystywanych narzędzi do indukowania mutacji. Takie i kolejne porównania zostały nawet sformułowane jako zrealizowane zadania. Należy zauważyć, że badania były prowadzone albo w oparciu o transfekcję protoplastów pszenżyta albo transformację komórek pszenicy z użyciem *Agrobacterium*. Dodatkowo, wykorzystany był układ modelowy z użyciem trzeciego gatunku tj. jęczmienia. Zastosowanie różnych metod w różnych gatunkach uniemożliwia dokonania porównań, przynajmniej zgodnie z przyjętymi zasadami prowadzenia wiarygodnych badań naukowych. Nie oznacza to, że nie można wyników takich eksperymentów zestawiać i wyciągać poprawnych wniosków, ale na pewno nie można twierdzić, że taki zestaw badań służy do celów porównawczych. Tym bardziej, że ocena efektywności indukowania mutacji była określana różnymi metodami w zależności od układu doświadczalnego. U pszenżyta stosowano analizę z zastosowaniem T7E1 i sekwencjonowania wysokoprzepustowego, a u pszenicy sekwencjonowanie Sangera. Analizowano albo produkty amplifikacji poszczególnych homeologów albo wszystkich razem. Oceny dokonywano na podstawie obserwacji fenotypu (fluorescencja YFP u jęczmienia) albo analizy genotypu (analiza sekwencji u pszenżyta i pszenicy). Uzyskane wyniki w oczywisty sposób dostarczały innych informacji, których nie da się bezpośrednio ze sobą porównać. Należy je traktować jako wzajemnie uzupełniające się, co niewątpliwie podnosi ważność wyników przeprowadzonych eksperymentów.

Na koniec zobowiązany jestem wskazać, że w rozprawie znalazło się kilka błędów językowych i dość niefortunne określenia, które należałoby zamienić na bardziej naukowe np.: „namnożone produkty PCR”, „sztuczna fuzja cząsteczek RNA” czy „zastosowanie TREX2 przesunęło charakter mutacji w kierunku delekcji”.

Chciałbym także prosić Doktoranta o wyjaśnienie w trakcie publicznej obrony następujących kwestii:

1. Z uwagi, że przedstawiona rozprawa nie zawiera wyników dotyczących konstruktywów TALEN proszę o wyjaśnienie faktu umieszczenia informacji o źródle finansowania tj. Dotacji dla Młodych IHAR-PIB, która została przyznana na badania z użyciem TALEN.
2. Jak należy rozumieć stwierdzenie, że „... powszechne stosowanie systemów edycji genomowej w oparciu o nukleazy Cas9 okazało się trudne do osiągnięcia” podczas gdy zaledwie w kilka lat po opracowaniu takich metod odmiany roślin z edytowanymi genami są uprawiane, a ich produkty dostępne komercyjnie dla konsumentów.
3. W artykule opublikowanym w IJMS w 2023 przedstawiona jest efektywność edycji dla każdego układu doświadczalnego w każdej z trzech linii komórkowych (agregatach komórkowych). O ile dobrze zrozumiałem, podane wartości procentowe informują jednak jak duża frakcja komórek w agregacie zawiera mutacje. Jeśli tak, to jest to ocena jednorodności agregatów, tj. w jakim stopniu składają się z komórek z mutacją, a w jakiej bez mutacji, co jest efektem tego czy agregat powstał z rozwoju jednej czy może kilku blisko leżących komórek. Co więcej, w trakcie kilkutygodniowej kultury mogło dojść do kolejnych mutacji z uwagi na ciągłą ekspresję Cas9. Proszę o komentarz i wyjaśnienie czy można te wartości procentowe porównywać z wartościami efektywności podanymi w publikacji z 2021 gdzie badano mutacje w niezależnych od siebie protoplastach.
4. Kontynuując, jaki może być związek pomiędzy zastosowaniem systemu selekcji komórek transgenicznych a efektywnością indukowania mutacji przez gRNA:Cas9?
5. Czym można wytłumaczyć różną podatność homeologów na ukierunkowaną mutagenezę w przypadku stosowania kompleksów gRNA:Cas9, podczas gdy po włączeniu do systemu egzonukleazy TREX2 takich różnic nie obserwowano?

Konkluzja

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Michalskiego pt. „Opracowanie systemu oceny efektywności kompleksów nukleazy Cas9 na przykładzie kierunkowej mutagenazy genu *ABA9'OH1* związanego ze spoczynkiem nasion u pszenicy i pszenżyta” spełnia kryteria określone w art.13 ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789), uwzględniając rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie profesora (Dz.U. z 2018 r. poz. 261), zgodnie z art. 179 ustawy z 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669).

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie o dopuszczenie mgr Krzysztofa Michalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 19 października 2023



prof. dr hab. inż. Rafał Barański