

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Krzysztofa Michalskiego pt.  
„Opracowanie systemu oceny efektywności kompleksów nukleazy Cas9, na  
przykładzie kierunkowanej mutagenezy genu *ABA8'OH-1* związanego ze  
spoczynkiem nasion u pszenicy i pszenżyta”**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została wykonana w Laboratorium Kontroli Genetycznie Modyfikowanych Organizmów Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin- Państwowego Instytut Badawczy w Radzikowie. Promotorem pracy jest Pan Prof. dr hab. inż. Janusz Zimny, zaś promotorem pomocniczym Pani dr inż. Anna Linkiewicz. Promotorzy pracy i ich zespół badawczy od lat zajmują się biotechnologią zbóż. Niniejsza praca doktorska wpisuje się w główne nurty badawcze tego zespołu i dotyczy opracowania efektywnej metodyki edytowania genów z wykorzystaniem technologii CRISPR/Cas u poliploidalnych gatunków zbóż. Wykonanie pracy było możliwe dzięki dostępowi do warsztatu badawczego Zespołu i dużemu doświadczeniu w zakresie kultur *in vitro*, a także dzięki współpracy z zagranicznym zespołem z IPK Gatersleben w Niemczech. Doktorant przeprowadził swe prace z wykorzystaniem heksaploidalnej odmiany pszenżyta 'Bogo' i odmiany 'Svilena' heksaploidalnej pszenicy zwyczajnej, wybierając do edytowania gen kodujący hydroksylazę kwasu abscysynowego, w skrócie ABA8'OH-1. Czasami Doktorant stosuje uproszczony skrót nazwy genu ABA8'OH1, na przykład w pierwszej publikacji. Enzym ten rozkłada kwas abscysynowy w ziarniakach zbóż, co prowadzi do przerwania spoczynku nasion i skutkuje ich kiełkowaniem, jeżeli proces ten zachodzi przed żniwami, wówczas dochodzi do porostania ziarna, co negatywnie wpływa na plony. Tak więc prace Doktoranta wpisują się w szersze badania, których celem jest uzyskanie zbóż odpornych na porastanie.

Podjęta przez Doktoranta tematyka pracy jest bardzo ciekawa i dotyczy rozwoju edytowania genów - nowej technologii ukierunkowanej mutagenezy. Edytowanie genów jest złożonym wieloetapowym działaniem: pierwszym etapem prac jest wytypowanie genu do edycji i zaprojektowanie gRNA naprowadzającego nukleazę Cas na gen docelowy, drugim przygotowanie odpowiednich konstrukcji genowych, a trzecim wykonanie edycji i uzyskanie roślin z wyedytowanym genem docelowym. W przypadku zbóż, ze względu na trudną metodykę regeneracji roślin, ten ostatni etap wymaga dużych nakładów pracy. Tak więc podjęcie badań nad opracowaniem skutecznej metodyki sprawdzania konstrukcji genowych Cas9/gRNA uważam za w pełni uzasadnione, a szczególnie w przypadku heksaploidalnych zbóż, takich jak pszenżyto i pszenica, u których geny docelowe występują w postaci homeologów. Taki system pozwala wskazać te konstrukcje Cas9/gRNA, które będą gwarantowały skuteczną edycję genów i będą pozwalały na ograniczenie prac związanych z uzyskaniem roślin. Za szczególnie nowatorską, uważam część pracy dotyczącą pszenżyta. Jak dotychczas nie ma doniesień na temat skutecznego edytowania genów u tego gatunku, którego znaczenie gospodarcze stale wzrasta.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska jest zbiorem trzech publikacji, które są uzupełnione o spis treści, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, streszczenia, słownik skrótów, przegląd literatury, cel badań i hipotezę badawczą, materiały i metody, omówienie wyników, podsumowanie wyników, wnioski i spis literatury. Wszystkie publikacje stanowiące rozprawę są wieloautorskie i Autor przedstawił oświadczenia współautorów. Pierwsze dwie publikacje mają charakter prac badawczych, zaś trzecia jest pracą przeglądową. Publikacje badawcze zostały opublikowane w latach 2021 i 2023, praca przeglądowa została także opublikowana w 2023 roku. Dwie prace badawcze, które stanowią zasadniczą część rozprawy doktorskiej, zostały opublikowane w piśmie *International Journal of Molecular Sciences* (IF=6.208, 140 pkt MEiN), zaś praca przeglądowa w piśmie *Trends in Plant Science* (IF=22.012, 200 pkt MEiN). Doktorant jest pierwszym Autorem prac badawczych. Z informacji podanych w publikacjach i oświadczeniach współautorów wynika, że Doktorant był głównym wykonawcą badań i autorem pierwszych wersji manuskryptów. W przypadku pracy przeglądowej Doktorant jest współautorem dwóch podrozdziałów tej pracy, a dostarczone oświadczenia Doktoranta i czterech współautorów, w tym Autora korespondencyjnego, potwierdzają, że Doktorant przygotował pierwsze wersje tych podrozdziałów. W pracy doktorskiej zawarta jest informacja o tym, że badania zostały wykonane w ramach zadania 13, realizowanego w programie Badań Podstawowych na Rzecz Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej w latach 2014-2020, finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Realizacja pracy była też dofinansowana z Dotacji dla Młodych IHAR-PIB 2018, a praca przeglądowa powstała w wyniku międzynarodowej współpracy w ramach programu COST Action PlantEd.

Wprowadzenie do pracy stanowi przegląd literatury, który jest krótki i syntetyczny. W trzech podrozdziałach Autor omówił ogólnie problematykę porostania pszenżyta i pszenicy, rolę genu ABA8'OH-1 w spoczynku nasion i technologię edytowania genów u roślin. Autor dobrze wyważył zakres treści tego podrozdziału, tak że treści te są uzupełnione i pogłębione w szczegółowych przeglądach literatury publikacji badawczych i w pracy przeglądowej.

W kolejnym podrozdziale Doktorant przedstawił cel pracy, zakres przeprowadzonych badań i hipotezę badawczą. Cel pracy jest dobrze przedstawiony, natomiast hipoteza badawcza mogłaby być lepiej sformułowana pod względem stylistycznym, gdyż obecnie nie wynika z niej to, że dotyczy edytowania genów.

W pierwszym etapie swych badań Autor skupił się na opracowaniu systemu oceny konstruktyw Cas9/gRNA na potrzeby edycji genów u pszenżyta. Autor zastosował trzy typy konstruktyw i trzy strategie ich oceny. Pierwszą z nich była strategia bioinformatyczna, która nie wymaga prowadzenia prac laboratoryjnych i jest rutynowo stosowana. Strategia ta posiada jednak szereg ograniczeń, a przede wszystkim nie uwzględnia kontekstu genomu gatunku docelowego, co jest bardzo ważne w przypadku gatunków poliploidalnych. Druga strategia, którą Autor opracował jest oparta o ekspresję przejściową genów w liściach jęczmienia: genu docelowego pszenżyta w fuzji z niefunkcyjnym genem białka GFP, genu reporterowego kodującego białko Cherry i konstrukcji Cas9/gRNA. Taki układ pozwala ocenić w sposób ilościowy efektywność edycji, która skutkuje odzyskaniem funkcji przez gen kodujący GFP i nabyciem zielonej fluorescencji przez komórki gdzie doszło do edycji. Opracowanie tej metodyki dla pszenżyta było możliwe dzięki nawiązaniu przez Doktoranta współpracy z

zespołem dr. Jochena Kumlehna z IPK Gaterslaben w Niemczech. W trzeciej strategii Doktorant wykorzystał te same konstrukcje Cas9/gRNA do transfekcji protoplastów pszenżyta. Było to możliwe dzięki opracowaniu efektywnej metodyki izolacji protoplastów dla pszenżyta. Efektywność ukierunkowanej mutagenezy analizowano metodami opartymi o amplifikację rejonu docelowego i zastosowanie endonukleazy T7E1 lub głębokiego sekwencjonowania amplikonów - ta druga metoda okazała się bardziej informatywna. Tu chciałbym podkreślić, że wyniki dotyczące prac nad pszenżytem są bardzo dobrze zestawione i opracowane pod względem statystycznym, a praca w której je opublikowano jest bardzo dobrze napisana. Podczas czytania części wynikowej tej pracy nasuwały mi się różne pytania i praktycznie na wszystkie znalazłem odpowiedzi w bardzo dobrze poprowadzonej, wyczerpującej i jednocześnie krytycznej dyskusji. W moim odczuciu najważniejszym wynikiem tych prac jest stwierdzenie, że białko TREX poprawia efektywność edycji. Zwiększenie wydajności edycji jest niewątpliwie korzystne, ale pojawia się pytanie, czy dłuższe delegacje generowane z wykorzystaniem tego systemu mogą mieć wpływ na stabilność genetyczną roślin z wyedytowanym genem docelowym? Ciekawi mnie też, czy Doktorant zna inne elementy konstrukcji genowych, które można wykorzystać w celu poprawienia efektywności edycji genu docelowego.

W drugim etapie swych badań Autor skupił się nad opracowaniem systemu testowania konstrukcji Cas9/gRNA na potrzeby edycji genów u heksaploidalnej pszenicy, wykorzystując konstrukcje testowane wcześniej na pszenżycie. Szkoda, że w tej części pracy nie zostały wykorzystane konstrukcje z endonukleazą TREX, byłoby to wartościowym potwierdzeniem wyników uzyskanych dla pszenżyta. Dla pszenicy Autor opracował system oparty o zawiesiny komórkowe i stabilną transformację z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens*, obecnie *Rhizobium radiobacter*. Weryfikacja miejsc edycji i off-target została wykonana na poziomie linii kalusowych za pomocą PCR i sekwencjonowania amplikonów metodą Sangera. Opracowany system jest stosunkowo prosty, ale wymaga dobrego opanowania kultur tkankowych pszenicy i jest czasochłonny. Uzyskane wyniki pokazały, że efektywność edycji była zależna od lokalizacji subgenomowej genu docelowego, inaczej niż w przypadku pszenżyta, gdzie tak nie było. Autor zauważa, że ta różnica pomiędzy pszenżytem i pszenicą może wynikać z tego, że transfekcja protoplastów zastosowana u pszenżyta jest bardziej wydajna niż transformacja z wykorzystaniem *A. tumefaciens* zastosowana dla pszenicy lub z różnej organizacji subgenomowej chromatyny u tych gatunków. Autor wskazał także, że bardziej skuteczne jest prowadzenie selekcji transformowanych komórek w obecności fosfotricyny w porównaniu z higromycyną. W moim odczuciu stwierdzenie dotyczące selekcji nie jest zbyt nowatorskie, gdyż od dawna uważa się, że u zbóż system oparty o fosfotricynę lub bialafos jest bardziej skuteczny niż systemy oparte o antybiotyki. Jestem ciekawy dlaczego w doświadczeniach nad pszenicą Autor wykorzystał odmianę 'Svilena' i jaka była ploidalność kalusa uzyskanego w kulturach pylników, który wykorzystano do zainicjowania zawiesiny komórkowej poddawanej transformacji. Czy kalus ten i zawiesina były haploidalne? Czy podjęto próbę regeneracji roślin z uzyskanych linii komórkowych z wyedytowanym genem kodującym hydroksylazę kwasu abscysynowego?

Zwieńczeniem prac badawczych Doktoranta było przygotowanie dwóch podrozdziałów do pracy przeglądowej podsumowującej osiągnięcia technologii CRISPR/Cas. Doktorant przygotował pierwsze wersje tych podrozdziałów. Podrozdziały te dobrze wkomponują się

w całą pracę przedstawiającą najważniejsze osiągnięcia technologii CRISPR/Cas i wskazującą kierunki jej dalszego doskonalenia. Praca ta została opublikowana w uznanym opiniotwórczym piśmie 'Trends in Plant Science' publikującym prace dotyczące najbardziej aktualnych kierunków badań nad roślinami. W pierwszym podrozdziale przedstawione zostały metody oceny efektywności konstrukcji Cas/gRNA, a w drugim nowe nukleazy opracowane na potrzeby edytowania genów u roślin. Na uwagę zasługuje szczegółowe zestawienie tabelaryczne tych nukleaz. Uważam, że podrozdziały te są bardzo dobrym zwieńczeniem pracy badawczej Doktoranta, a udział Doktoranta w przygotowaniu tak ważnej pracy przeglądowej, w gronie międzynarodowych ekspertów, uznaję za Jego duże osiągnięcie.

Autor przedstawił pięć wniosków wynikających z przeprowadzonych badań. Wnioski te są zgodne z celem pracy i weryfikują postawioną hipotezę badawczą. Myślę, że wniosek pierwszy mógłby być lepiej sformułowany i wskazywać najlepszą konstrukcję genową do wykorzystania w dalszych pracach nad uzyskaniem pszenżyta i pszenicy odpornych na porastanie. Ponadto w numerację wniosków wkradł się błąd edytorski, wniosek 3 jest oznaczony literą 'i', a w moim odczuciu powinien być oznaczony liczbą '3'.

Podsumowując, stwierdzam że Doktorant wykazał się szerokim spektrum umiejętności i znajomością szeregu metod badawczych, które skutecznie wykorzystał aby osiągnąć cel swej pracy doktorskiej. Potrafił skutecznie wykorzystać i połączyć metody inżynierii genetycznej, genetyki molekularnej, mikroskopii i bioinformatyki z zaawansowanymi technikami kultur tkankowych i komórkowych. Realizując swą pracę doktorską pokazał, że potrafi prowadzić badania i skutecznie publikować ich wyniki. Ponadto pokazał, że jest otwarty na nowe wyzwania i potrafi pracować w międzynarodowym środowisku naukowym. Uważam, że Doktorant jest świetnie przygotowany do prowadzenia prac badawczych w obszarze współczesnej biotechnologii roślin.

### **Wniosek końcowy**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. Krzysztofa Michalskiego pt. „Opracowanie systemu oceny efektywności kompleksów nukleazy Cas9, na przykładzie kierunkowanej mutagenyzy genu *ABA8'OH-1* 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.



Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski