

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.:

### **„Wykorzystanie systemu ukierunkowanej mutagenazy CRISPR/Cas9 w edycji i badaniach genomów *Brachypodium distachyon* i *B. hybridum*”**

autor rozprawy:

**mgr Karolina Hus**

#### **Ocena formalna**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w formie monografii stanowi opracowanie opisujące oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Składa się ono z typowych rozdziałów przewidzianych dla pracy doktorskiej w naukach przyrodniczych i zawiera spis treści, wykaz wykorzystywanych skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję uzyskanych wyników, wnioski, spis wykorzystanej literatury oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Ponadto zawiera zbiór tablic dokumentujących wyniki i aneks stanowiący dodatek do części metodycznej. Całość obejmuje 236 stron formatu A4. Jedynym autorem rozprawy jest mgr Karolina Hus wykonująca badania do pracy doktorskiej w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego; promotorem jest prof. dr hab. Robert Hasterok, a promotorem pomocniczym dr Alexander Betekhtin. Rozprawa została przygotowana w roku 2020. Badania będące przedmiotem rozprawy były finansowane w ramach projektu badawczego NCN Harmonia-6 nr 2014/14/M/NZ2/00519 w latach 2015-2019, którego kierownikiem był prof. dr hab. Robert Hasterok. Rozprawa spełnia wymogi formalne określone w ustawie.

#### **Opis i ocena merytoryczna rozprawy**

Przedmiotem badań opisanych w rozprawie doktorskiej jest opracowanie efektywnej metody indukowania mutacji w precyzyjnie określonych miejscach genomów roślin z rodzaju *Brachypodium* przy wykorzystaniu systemu CRISPR/Cas9 oraz wykorzystanie go do badania genetycznego uwarunkowania mechanizmu procesu parowania chromosomów w trakcie podziału mejotycznego. Obiektem badawczym były dwa diploidalne gatunki *Brachypodium* tj., *B. distachyon* i *B. stacei* oraz ich tertraploidalny mieszańiec *B. hybridum*. Gatunki *Brachypodium* są blisko spokrewnione z ważnymi gospodarczo zbożami uprawianymi w klimacie umiarkowanym, w tym z pszenicą, jęczmieniem czy owsem. *B. distachyon*, który ma krótki okres wegetacji i jest samopylny oraz posiada niewielki diploidalny genom jest uważany za gatunek mogący służyć jako referencyjny w badaniach zbóż. Drugim gatunkiem o analogicznej funkcji w badaniach może być *B. hybridum* z uwagi na allopoliploidalny genom.

Badania prowadzone z użyciem tych gatunków modelowych mają zatem duże znaczenie z uwagi na potencjalną analogię procesów i mechanizmów zachodzących w spokrewnionych roślinach zbożowych. Dobór materiałów roślinnych w prezentowanych w rozprawie badaniach jest zatem podyktowany ich znaczeniem, a jednocześnie ograniczoną, choć ciągle poszerzaną wiedzą o biologii wymienionych gatunków. Autorka rozprawy podjęła się wykorzystać system CRISPR/Cas9 do indukcji mutacji wybranych genów *Brachypodium*. Mechanizm immunologiczny CRISPR/Cas9 u bakterii i archeonów został poznany zaledwie w ostatnich kilku latach, a jego odkrycie zostało uznane przez wiodące czasopisma Nature i Science jako przełomowe. Opracowane uproszczone narzędzia inżynierii genetycznej oparte o mechanizm CRISPR/Cas i pozwalające na indukowanie mutacji w ściśle określonych miejscach genomu zostały w ciągu kolejnych kilku lat wdrożone do badań eksperymentalnych mikroorganizmów, roślin, zwierząt jak i człowieka. Zastępują one dotychczas stosowane narzędzia edycji genomów, a w przypadku roślin, odmiany będące efektem ich wykorzystania już są dostępne dla rolnictwa. Systemy indukowania mutacji wykorzystujące CRISPR uznawane są obecnie jako podstawowe narzędzia pozwalające na dokonywanie ukierunkowanych zmian w DNA, w tym knock-out genów skutkujący blokowaniem powstawania niefunkcjonalnych białek. Generowanie takich mutantów należy do najważniejszych metod poznawania funkcji genów, białek i ich wariantów. Opracowanie efektywnego sposobu dostarczania systemu edycji genów wykorzystujących CRISPR/Cas9 jest obecnie podstawowym warunkiem, aby można było prowadzić ukierunkowaną mutagenezę. Celem opisanych w rozprawie badań było właśnie zoptymalizowanie metody dostarczania wektorów kodujących elementy systemu CRISPR/Cas9 skutkującej edycją wybranych genów. Gen desaturazy fitoenu (PDS) został wybrany jako docelowy z uwagi na albinotyczny fenotyp mutantów PDS i tym samym przydatny jako marker do wizualnej weryfikacji efektu mutagenazy. Drugim głównym celem było dokonanie mutacji funkcjonalnych przy użyciu wektorów CRISPR/Cas9 i określenie roli genów *CDKG1* i *CDKG2* w procesie parowania chromosomów w trakcie mejozy u roślin *B. distachyon* i *B. hybridum* w warunkach kontrolnych i stresu podwyższonej temperatury. Właściwe parowanie chromosomów jest warunkiem kluczowym zapewniającym stabilność genetyczną i płodność roślin i ma szczególne znaczenie w przypadku allopoliploidalnych zbóż. Określenie roli poszczególnych genów w tym procesie ma duże znaczenie nie tylko poznawcze, ale także może w przyszłości pomóc w tworzeniu rekombinantów poszerzających zmienność genetyczną w materiałach hodowlanych wykorzystywanych przy tworzeniu nowych odmian. Z tych względów, podjęta tematyka badawcza i określone cele przedstawione w rozprawie są uzasadnione i ważne oraz stanowią oryginalne podejście mające na celu zdobycie nowej wiedzy o znaczeniu zarówno poznawczym jak i potencjalnie aplikacyjnym.

Autorka rozprawy przedstawia dostępną wiedzę związaną z postawionym problemem badawczym w rozdziale zatytułowanym Wstęp podzielonym na podrozdziały i obejmującym 29 stron. Opisuje w nich bioróżnorodność i znaczenie ekonomiczne traw, charakterystykę rodzaju *Brachypodium* i znaczenie jego gatunków jako roślin modelowych w badaniach zbóż. W dalszej kolejności przedstawia metody biotechnologiczne stosowane w badaniach i hodowli roślin, ukierunkowane na gatunki jednoliścienne. Przedstawione są metody transformacji genetycznej ze szczególnym uwzględnieniem gatunków *Brachypodium*, a także metody edycji genomów, w szczególności CRISPR/Cas9. Istotny nacisk położony został na otrzymywanie i wykorzystanie kultur komórkowych i tkankowych *in vitro*, w tym na

znaczenie skutecznej indukcji kalusa embriogennego oraz jego transformacji w celu uzyskania zmodyfikowanych roślin. Szeroko i dogłębnie zostały przedstawione dotychczasowe osiągnięcia nauki odnoszące się do zjawiska parowania chromosomów. Zagadnienie to jest szczególnie ważne w kontekście rozmnażania gatunków poliploidalnych, zachowania płodności i stabilności genetycznej. Szczegółowy opis regionu Ph1 u pszenicy, funkcji zawartych w nim genów oraz powiązania filogenetyczne uświadamiają złożoność mechanizmu i jego genetycznych determinant oraz wskazuje na aspekty wciąż niewyjaśnione wymagające dalszych badań. Autorka przybliżyła wiedzę o genach *CDK* tego locus, ich paralogach u innych gatunków i potencjalną rolę w omawianym procesie. Rozdział ten stanowi właściwe wprowadzenie w podjętą w rozprawie problematykę badawczą i jakie znaczenie może mieć pogłębienie wiedzy w tym zakresie dla zrozumienia biologii rozwoju i kwitnienia roślin, w tym zbóż. Cały rozdział jest oparty o liczną, aktualną i dobrze udokumentowaną literaturę światową. Ukazuje szeroką wiedzę doktorantki w temacie oraz umiejętność jasnego i zarazem naukowego przedstawienia faktów oraz przypuszczeń wynikających z dotychczasowych badań, których wyniki były publikowane w szerokim spektrum czasopism naukowych o znaczącym oddziaływaniu w świecie.

Jednostronicowy rozdział „Cel pracy” zawiera cztery cele, w skrócie: 1) opracowanie metody edycji, 2) wykazanie użyteczności metody na przykładzie edycji genu *PDS*, 3) uzyskanie roślin z mutacjami funkcjonalnymi genów *CDKG1* i *CDGK2* oraz 4) analizę wpływu tych mutacji na proces parowania chromosomów w dwóch temperaturach. Chociaż cele są jasno sformułowane i poprawne, uważam, że wystarczyłoby sformułować dwa główne cele, tj. opracowanie metody edycji genów oraz określenie roli genów *CDKG*. Pozostałe cele są poboczne i służą do osiągnięcia celów głównych. Również niepotrzebny jest w tym rozdziale ogólnikowy wstęp oraz zakończenie stanowiące właściwie stwierdzenie zdecydowanie bardziej przypominające konkluzję z badań.

Rozdział Materiał i metody obejmuje 52 strony oraz dwustronicowy aneks z dwoma tabelami, które z uwagi na fakt, że stanowią jedyną zawartość aneksu do rozprawy mogłyby równie dobrze być włączone do tekstu głównego lub, co byłoby zapewne bardziej zasadne, składy stosowanych roztworów i pożywek zawarte na 13 stronach rozdziału powinny wzbogacić aneks. Rozdział Materiał i metody jest opisany bardzo starannie, szczegółowo przedstawione są wszystkie procedury wraz z uzasadnieniem ich stosowania. Nie ulega wątpliwości, że na jego podstawie można powtórzyć wszystkie eksperymenty oraz że stanowi cenny materiał źródłowy dla kolejnych osób potrzebujących przeprowadzić takie same analizy i procedury. Pomimo tego zabrakło w moim odczuciu opisu sposobu izolacji zarodków. Izolacja zarodków o wielkości 0,3-0,7 mm nie jest czynnością prostą i wymaga odpowiedniego doświadczenia. Nie do końca prawdziwe jest też stwierdzenie, że warunkiem użyteczności enzymu restrykcyjnego do wykrywania mutacji jest tylko jedno miejsce trawienia w obrębie amplikonu. Tabela 4 powinna zawierać wartości wyrażone w jednostkach molowych, nie objętości. Dobór zarówno materiałów jak i metod jest poprawny dla osiągnięcia stawianych celów, układy doświadczalne zostały także właściwie zaplanowane. Podobnie jak rozdział Wstęp, ten rozdział jest opisany w sposób logiczny, przejrzysty i zrozumiały, a zrozumienie procedur ułatwiają dołączone czytelne ryciny; rzetelność przedstawionych protokołów wymaga uznania.

Uzyskane wyniki badań zostały zebrane w trzech podrozdziałach. Pierwszy poświęcony ukierunkowanej mutagenезie z użyciem systemu CRISPR u *B. distachyon* obejmuje 9 stron i 19 tablic. Autorka przedstawia dokumentację i omówienie wyników

doświadczeń, w których wprowadza do protoplastów skonstruowane przez siebie wektory DNA przy użyciu metody chemicznej z roztworem glikolu polietylenowego (PEG). Eksperymenty te miały na celu potwierdzenie, że wektory zostały dobrze skonstruowane, a ekspresja zawartych w nich genów i gRNA prowadzi do edycji genów docelowych. Spośród testowanych wektorów mutacje potwierdzono tylko w genie *CDKG2*, co skutkowało zmianą ramki odczytu. Pozostałe wektory były jednak również poprawnie skonstruowane, gdyż w dalszych eksperymentach, w których wykorzystano *Agrobacterium* do transformacji *Brachypodium*, uzyskano mutanty genów *PDS*, *CDKG1* i *CDKG2*. Bez sukcesu była jedynie transformacja mająca na celu uzyskanie podwójnego mutantu *CDKG*. Wszystkie materiały po transformacji były analizowane molekularnie. Zastosowano metodę PCR i RFLP oraz sekwencjonownie. Wyniki analiz bioinformatycznych potwierdziły zajście mutacji punktowych i krótkich delecji w miejscach docelowych. Co więcej, Autorka wykazała, że otrzymane mutanty są homo- lub heterozygotyczne pod względem mutacji, a w przypadku *B. hybridum* zmiany wykryte zostały w genach zlokalizowanych w genomach pochodzących od obydwu komponentów rodzicielskich. Na szczególną uwagę zasługuje wykorzystanie protoplastów do szybkiej weryfikacji skuteczności edycji. Badania z użyciem protoplastów są trudne i zawsze wymagają dopracowania protokołu ich izolacji, transfekcji i dalszej kultury. Wszelkie wyniki potwierdzające możliwość pracy z protoplastami są niezwykle cenne zwłaszcza w przypadku gatunków, dla których nie ma opracowanych efektywnych metod ich izolacji i kultury.

Drugi podrozdział opisujący fenotyp roślin z mutacją genu *PDS* stanowi za ledwie jeden akapit z dołączoną tablicą, który równie dobrze mógłby być połączony z wcześniejszym rozdziałem. Łącznie obie części mogłyby stanowić zawartość rozdziału odpowiadającą wynikom powstałym w rezultacie sformułowanego przez recenzenta pierwszego celu głównego. Niezależnie od sposobu prezentacji, otrzymanie albinotycznych roślin jest sukcesem wartym odnotowania. Stanowi kolejny przykład możliwości weryfikacji efektywności użytej metody na podstawie łatwej obserwacji zmian fenotypowych.

Ostatni podrozdział tej części rozprawy poświęcony został analizie wpływu mutacji w genach *CDKG* na proces parowania chromosomów w trakcie mejozy. Autorka przebadła mutanty pod względem płodności i wykazała, że wszystkie były płodne i wytworzyły nasiona zdolne do kiełkowania. Dzięki temu obserwacje procesu mejozy mogła prowadzić na roślinach pokolenia T1. Analizy prowadziła dla niezmutowanych form *B. stacei*, *B. distachyon* i *B. hybridum* oraz dla mutantów *CDKG* dwóch ostatnich gatunków. Dzięki wykorzystaniu barwienia DAPI oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* wykazała, że proces mejozy przebiegał w sposób prawidłowy zarówno u mutantów *CDKG1* jak i *CDKG2* niezależnie czy były to mutanty *B. distachyon* czy *B. hybridum*. Ponadto, wykazała, że podwyższona temperatura do 30°C, w której uprawiano rośliny również nie powodowała widocznych zaburzeń mejozy. Tym samym uzyskała wyraźne przesłanki wskazujące, że proces parowania chromosomów u dwóch gatunków *Brachypodium* jest niezależny od funkcjonowania kinaz kodowanych przez *CDKG1* i *CDKG2*. Uzyskanie podwójnego mutantu dałoby możliwość pełnego potwierdzenia słuszności tego wniosku. Wyniki mikroskopii fluorescencyjnej udokumentowane zostały na 9 barwnych tablicach ukazujących wybarwione chromosomy w trzech fazach podziału mejotycznego tj. pachytenu, diakinezy i metafazy I. Są one wysokiej jakości i ukazują duże doświadczenie zdobyte przez Doktorantkę w technikach hybrydyzacyjnych i mikroskopii fluorescencyjnej.

Wyniki zostały poprawnie zaprezentowane, omówione i zinterpretowane. Na uznanie zasługują starannie przygotowane tablice, które opatrzone zostały bardzo szczegółowymi opisami ułatwiającymi pełne zrozumienie ich zawartości. Szkoda, że opisy te nie zostały jednak umieszczone bezpośrednio pod rycinami, tam gdzie było to możliwe, co znacznie ułatwiłoby analizę przedstawionych obrazów. Niektóre rozdziały elektroforetyczne są jednak niskiej jakości utrudniając jednoznaczną interpretację uzyskanych wyników (np. Tablice 2, 3, 8, 11), a w przypadku Tablicy 5a uzyskany wynik jest nielogiczny jeżeli ścieżki zostały właściwie opisane.

Ostatni rozdział zawiera dyskusję otrzymanych wyników, w której zawarte są interpretacje Autorki uzyskanych wyników w odniesieniu do aktualnej literatury tematu oraz omówienie ich znaczenia. Literatura cytowana w całej rozprawie jest bardzo liczna i obejmuje ok. 250 pozycji głównie anglojęzycznych i opublikowanych w ostatnich latach. Zapoznanie się z tak licznymi pozycjami i ich właściwe przytaczanie wymagało dogłębnego zapoznania się Doktorantki z przedstawianymi zagadnieniami. Warto także zauważyć, że Autorka nie bała się uwzględnić w Dyskusji, a także częściowo w rozdziale Wyniki, krytycznej oceny niektórych uzyskanych wyników, co podnosi ich wiarygodność i jednocześnie wskazuje problemy do rozwiązania w przyszłości.

Do najważniejszych oryginalnych osiągnięć Doktorantki zaliczyłbym:

- uzyskanie wektorów CRISPR/Cas9 do indukcji ukierunkowanych mutacji genów *PDS*, *CDKG1* i *CDKG2*;
- zaadoptowanie metody kultur protoplastów *Brachypodium* do edycji genów;
- uzyskanie płodnych mutantów genów *CDKG* u *B. distachyon* i *B. hybridum* i ich potomstwa;
- scharakteryzowanie wariantów allelicznych zmutowanych genów *PDS* oraz *CDKG1* i *CDKG2*;
- wskazanie braku wpływu kinaz cyklozależnych *CDKG1* i *CDKG2* na proces parowania chromosomów w trakcie mejozy u *B. distachyon* i *B. hybridum*;
- wykazanie braku wpływu stresu podwyższonej temperatury na proces parowania chromosomów.

Należy także podkreślić, że część wyników została już opublikowana w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science* (tom 11: nr 614) o wysokim współczynniku wpływu  $IF = 4,402$  w 2020 roku, co świadczy o jakości i ważności prezentowanych w rozprawie badań. Zgodnie z opublikowaną deklaracją, Mgr Karolina Hus miała znaczący wkład w powstanie artykułu.

Cała rozprawa została przygotowana bardzo starannie. Autorka stosuje język bogaty w terminologię naukową oraz poprawnie używa reguł pisowni. Praca jest także bardzo starannie przygotowana pod względem redaktorskim.

### **Uwagi i pytania**

W rozprawie zdarzają się pojedyncze skrótomy myślowe np. moim zdaniem zbyt pobieżne, uproszczone i niejasne jest omówienie efektywności transformacji i efektywności selekcji transformantów (str. 11). Autorka pomimo dużej staranności nie uniknęła błędów wynikających z użycia niewłaściwej terminologii lub sformułowań kolokwialnych takich jak: kruche komórki (str. 6) czy sztuczne otrzymywanie mieszańców (str. 196), antybiotyku bialofos (str. 8) – Bialofos jest herbicydem, analiza przejściowa (str. 8) – zapewne chodziło

o ekspresję przejściową, stosowanie liczby pojedynczej „karoten” przy opisywaniu produktów biosyntezy szlaku karotenoidowego, hodowla roślin (str. 32, 61) – zamiast uprawa roślin, używanie słowa prążek (str. 35, 91, 143) – zamiast produkt PCR lub amplikon, marchewka (str. 195) – zamiast marchew, FSH (str. 195) – zamiast F3H. Zastanawia także konsekwentne (z wyjątkiem jednego miejsca) używanie określenia kopia genu, a nie allel. Niedociągnięcia te mają charakter epizodyczny i nie wpływają na pozytywną ocenę całej rozprawy.

Kilka aspektów jest w mojej opinii wartych dyskusji. Prosiłbym o ustosunkowanie się podczas obrony do poniższych kwestii.

1. Czy w kolekcji 5000 mutantów *B. distachyon* Bd21 (str. 12) insercje T-DNA faktycznie były w pełni losowe tj. równomiernie rozłożone w całym genomie ?
2. Jaki sposób mogłaby Doktorantka zaproponować aby czasowo włączać i wyłączać aktywność locus Ph1 (str 22) ?
3. W kilku miejscach rozprawy pojawiają się sformułowania mówiące, że gen PDS jest zaangażowany w proces biosyntezy chlorofilu. Prosiłbym Doktorantkę o omówienie jaki jest związek pomiędzy ekspresją genu PDS a występowaniem albinotycznego fenotypu roślin.
4. Przy użyciu testu z wykorzystaniem protoplastów potwierdzono edycję, która zaszła przy użyciu tylko jednego z pięciu testowanych wektorów, podczas gdy w dalszych badaniach potwierdzono, że wszystkie wektory były skuteczne. Proszę o komentarz dotyczący zasadności stosowania w przyszłości tak mało wiarygodnego testu?
5. Zaledwie kilka genetycznie modyfikowanych roślin zostało zidentyfikowanych w obrębie populacji potencjalnych transformantów. Prosiłbym o komentarz dotyczący skuteczności systemu selekcji transformantów zastosowanego w pracy doktorskiej.
6. Wśród uzyskanych mutantów nie zidentyfikowano roślin chimerycznych, prosiłbym o informacje ile klonów amplifikowanych fragmentów genów docelowych poddawano sekwencjonowaniu i ile z nich było dobrej jakości oraz czy brak identyfikacji chimer mogło być spowodowane zbyt małą liczbą sekwencjonowanych produktów.

### **Podsumowanie**

Przedstawiona rozprawa jest wartościowym opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Całość badań jest logicznie zaplanowana i zrealizowana z użyciem właściwych metod w celu uzyskania zakładanych celów, a wyniki poszerzają dotychczasową wiedzę. Przedstawiona rozprawa wskazuje także, że mgr Karolina Hus wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie biologia oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Konkludując, uważam że praca spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 20 sierpnia 2020



prof. dr hab. Rafał Barański