Prof. dr hab. Daniel Lipiński
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Dojazd 11
60-632 Poznań
daniel.lipinski@up.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Natalii Dzięgiel

w związku z postępowaniem o nadanie Jej stopnia doktora
w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika

Poniższa recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Natalii Dzięgiel została przygotowana na podstawie decyzji Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego, która na posiedzeniu w dniu 5 listopada 2020 r. powołała moją osobę na recenzenta wyżej wymienionej dysertacji.

Oceniana rozprawa doktorska wykonana pod opieką naukową prof. IZ dr hab. Jacka Jury, jest obszernym opracowaniem wyników prac prowadzonych przez doktorantkę w celu opracowania metody transfekcji zygot królika z wykorzystaniem funkcjonalizowanych nanocząstek złota, która może być zastosowana do transformowania komórek zwierzęcych. Niezależnie od tego, iż problematyka tak zwanych manipulacji genetycznych wzbudza wiele kontrowersji, oraz że praca naukowo-badawcza w tej dziedzinie staje się coraz trudniejsza ze względu na tworzone na całym świecie akty prawne ograniczające prawa badacza, nie ulega wątpliwości, że rozwoju technologii transformowania organizmów nie da się powstrzymać. Nie wszystkie kierunki wykorzystania owoców rozwoju biologii i genetyki molekularnej wydają się uzasadnione. Nie wdając się w rozważania z zakresu etyki (rozumianej antropocentrycznie), recenzent uważa, że kryteria oceny ludzkiej działalności w zakresie inżynierii genetycznej muszą uwzględniać pojmowane *bona fide* prawa przyrody. Działalność człowieka nie powinna na przykład wpływać negatywnie na zróżnicowanie genetyczne w obrębie biosfery, a nawet w obrębie zasobów genowych gatunków zwierząt hodowlanych i roślin uprawnych. Jakkolwiek problem jest ważny i bardzo frapujący, nie jest celem niniejszej recenzji prowadzenie dyskusji na ten temat. Szczęśliwie, oceniana praca doktorska nie zmusza recenzenta do rozpatrywania tego dyskusyjnego aspektu inżynierii genetycznej. Można bowiem uznać, że projekt badawczy, na podstawie którego powstała niniejsza praca mieści się w nurcie postępu technologicznego, któremu po wnikliwej analizie merytorycznej nie powinno się stawiać wyżej wymienionych zarzutów.

Ocena merytoryczna pracy

W rozdziale pod tytułem „Cel pracy" doktorantka postawiła sobie precyzyjnie i jasno sformułowany główny cel badawczy - opracowanie metody transfekcji zygot królika z

wykorzystaniem nanocząstek złota z modyfikacją powierzchniową z polietylenoiminy. W opinii recenzenta brakuje w tym miejscu celów szczegółowych, których osiągnięcie wynikałoby wprost z zaplanowanych w pracy sześciu następujących po sobie doświadczeń. Pojawiają się natomiast w tej części dysertacji elementy charakterystyczne dla streszczenia lub dyskusji. Analiza wyników przedstawionych w ocenionej pracy pozwala na stwierdzenie, że założony cel główny pracy został osiągnięty. Dla osiągnięcia założonego celu Kandydatka zastosowała metody właściwe i adekwatne. Godna pochwały jest systematyczność i staranność metodyczna umożliwiająca autorce pracy w pełni udokumentować kolejne etapy realizowanych procedur. Poszczególne części pracy zawierają to, czego powinno się od rozprawy doktorskiej oczekiwać. Wprowadzenie literaturowe jest obszerne, jasno i w uporządkowany sposób wprowadza czytelnika w problematykę następującej po nim części doświadczalnej. W jego obrębie uwagi krytyczne można mieć w zasadzie tylko do kilku jego fragmentów. Na stronie 7 autorka napisała „Transfekcja metodą mikroiniekcji DNA prowadzi do losowej integracji transgenu, co przekłada się na duże prawdopodobieństwo uzyskania mozaik…". O ile mozaicyzm może być rzeczywiście związany z mikroiniekcją, to jednak jego przyczyną nie jest losowa integracja transgenu, a fakt iż do integracji może dochodzić na różnych etapach rozwoju zarodka, a sama losowa integracja transgenu niekoniecznie musi być związana z zastosowaną metodą. Wprowadzenie bowiem metodą mikroiniekcji konstrukcji genowej przygotowanej w technologiach wykorzystujących nukleazy miejscowo-specyficzne umożliwia uzyskiwanie precyzyjnych modyfikacji. W opinii recenzenta systemy warunkowej lub indukowanej ekspresji genów Cre-LoxP oraz Flp-FRT wbrew temu co autorka pisze na stronie 10 nie powinny być zaliczane do metod celowania genowego. Zanim bowiem docelowy gen zostanie usunięty z genomu modyfikowanego organizmu, mechanizm rekombinacji homologicznej musi zostać wykorzystany do wprowadzenia kopii genu oflankowanej sekwencjami LoxP lub FRT. Dopiero w kolejnym pokoleniu możliwe jest usunięcie genu, co jest efektem działania rekombinazy Cre lub Flp. Na stronie 12 autorka napisała „W przypadku zastosowania systemu CRISPR/Cas9 do uzyskiwania transgenicznych zarodków, stosuje się iniekcję do przedjądrzy zygoty". Zdanie jest prawdziwe pod warunkiem, że do iniekcji stosuje się DNA. Warto jednak zwrócić w tym miejscu uwagę, że w przypadku materiału genetycznego w formacie RNA, najczęściej stosujemy jego iniekcję do cytoplazmy. W opinii recenzenta rozdział pod tytułem „Wstęp" zyskałby na atrakcyjności, gdyby autorka wzbogaciła go o schematy ilustrujące omawiane mechanizmy modyfikacji genetycznej i tabele podsumowujące zalety i wady opisywanych metod transgenezy.

Stosowane metody i zastosowane materiały opisane są dość dokładnie i czytelnie. To samo można powiedzieć o rozdziale opisującym uzyskane wyniki. Do tej części pracy recenzent ma jednak kilka uwag. W doświadczeniu 3 autorka do oceny efektywności transfekcji zygot królika zastosowała kompleksy Au-PEI/DNA w stosunku ilościowym 2:1. O ile sam stosunek ilościowy wydaje się być właściwy, o tyle stężenie nanocząstek Au-PEI – 50 ng/µl, zastosowane w doświadczeniu 3 może już budzić pewne zastrzeżenia. Autorka dokonała zapewne wyboru sugerując się wynikami doświadczenia 1, mającego na celu określenie wpływu wodnego roztworu nanocząstek Au-PEI na rozwój zarodków. Intuicja podpowiada, że wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek Au-PEI, powinien spadać odsetek uzyskanych blastocyst i jednocześnie rosnąć odsetek zarodków degenerujących. Tymczasem dla stężenia nanocząstek 50 ng/µl, uzyskane wyniki znacznie odbiegają od oczekiwań. Nasuwa się zatem pytanie czy nie należałoby w tym przypadku doświadczenia 1 powtórzyć? Recenzent nie ma większych zastrzeżeń do doświadczenia 2, chociaż w jego ocenie do określenia najkorzystniejszego stosunku nanocząstek Au-PEI do DNA warto by było zastosować żel

poliakrylamidowy o wyższej rozdzielczości. Doświadczenie 4 potwierdziło zasadność stosowania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego jako czynnika prekondycjonującego zygoty królika do rozwoju w hodowli *in vitro*. Brakuje natomiast informacji czy zygoty poddane zostały iniekcji kompleksem Au-PEI. W opisie doświadczenia 4 na stronie 37 autorka pisze, że zygoty poddane były jedynie działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego ale na schemacie doświadczenia 4 na stronie 39 pojawia się informacja, o zastosowaniu iniekcji kompleksem Au-PEI/DNA. W rozdziale opisującym wyniki autorka już o iniekcji nie wspomina. Odnośnie doświadczenia 5 zastrzeżenia budzi natomiast opis wyników. Odsetek zarodków w różnych stadiach rozwojowych autorka przedstawiła jednocześnie na wykresie 5 i w tabeli 6. Ale w obu przypadkach wyniki różnią się od siebie. Przykładowo na wykresie 5 odsetek zarodków degenerujących w grupie VIII wynosi 60 % a w tabeli 6 już 70 %.

Co do dyskusji, recenzent ma jedną uwagę. W rozdziale tym autorka omawia kilka problemów (choć są one połączone ze sobą, co oczywiste, wspólną ideą przewodnią). Otóż dyskusja stałaby się bardziej atrakcyjna, a na pewno nieco łatwiejsza w lekturze, gdyby autorka podzieliła ją przy pomocy prostego zabiegu zastosowania śródtytułów. W ten sposób można by systematycznie przedyskutować poszczególne aspekty podsumowywanej pracy – jak zresztą autorka uczyniła, jednak w sposób bardziej wyrazisty – łatwiejszy dla czytelnika.

Reasumując, rozprawę doktorską mgr Natalii Dzięgiel należy pod względem merytorycznym ocenić wysoko, zaś zgłoszone powyżej zastrzeżenia nie wskazują na błędy merytoryczne, lecz tylko na pewne niedoskonałości w opisie uzyskanych wyników. Badania opisane w ramach dysertacji zmierzają do uzyskania bardziej efektywnej metody wprowadzania DNA do komórek, co może być wykorzystane zarówno w transgenezie zwierząt jak i w zastosowaniach biomedycznych. Oprócz wartości poznawczej, w znacznej części charakteryzują się wysoką wartością pod względem aplikacyjnym.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest opracowaniem obejmującym łącznie 94 strony tekstu. Praca jest ilustrowana dwiema rycinami (obie oznaczone jako rycina 1), zawiera ponadto 9 tabel, 8 fotografii (w tym dwie opisane jako fotografia 1), 5 wykresów i 5 schematów opisujących przebieg wykonanych w pracy doświadczeń. Spis cytowanej literatury przedmiotu obejmuje 165 dobrze dobranych pozycji. Recenzent nie zgłasza zastrzeżeń do układu pracy. Rozprawa zawiera wszystkie elementy, jakie powinny znaleźć się w opracowaniu tego typu.

Do obowiązków recenzenta należy również zwrócenie uwagi na dość liczne drobne błędy i niedociągnięcia, których doktorantka nie zdołała się ustrzec. Należało by wskazać na te spośród nich, które powinny być poprawione w czasie przygotowywania pracy, lub jej części do druku w czasopiśmie naukowym, co jak można domniemywać nastąpi wkrótce.

- Przy zapisywaniu wartości należy zostawić odstęp między wartością liczbową a oznaczeniem jednostki miary;
- W tabeli 4 udział procentowy blastocyst wynosi 40 %, a nie 0,4 %;
- Na schematach opisujących przebieg doświadczenia odnośnie warunków hodowli *in vitro* powinno być 5 % CO_2 a nie 5 % O_2;

- Sformułowania „kwas DNA" i „reakcja PCR" gdzie „A" i „R" oznaczają odpowiednio kwas i reakcję są przykładami pleonazmów, których powinniśmy unikać;
- Na rycinie 1, strona 32 autorka pisze „... kontrola negatywna, gdzie jako matrycy użyto wody." Woda nie może być matrycą w PCR, matrycą może być DNA lub cDNA;
- Na wykresach 1 i 2, w opisach autorka wymienia stężenia Au-PEI, w tym stężenie 10 ng/µl, którego nie stosowała w doświadczeniu;
- W tabeli 4, na fotografiach 1-4 oraz kilku innych miejscach rozprawy autorka pisze o zarodkach transgenicznych. Należałoby w tych miejscach pisać jedynie o zarodkach z ekspresją genu kodującego białko fluorescencyjne, gdyż integracja transgenu nie została potwierdzona, nie możemy zatem uznać zarodków za transgeniczne;
- W tabeli 5 suma udziałów procentowych zarodków w poszczególnych stadiach rozwojowych powinna wynosić 100 %, tymczasem dla Grupy VII wynosi 116,61 % a dla grupy K – 102,99 %.

Podsumowując ocenę formalną pracy należy stwierdzić, że liczba zauważonych usterek istotnie wpływających na tą ocenę jest niewielka.

Podsumowanie

Zarówno treść, jak i forma rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Dzięgiel świadczą o tym, że doktorantka dobrze opanowała warsztat badawczy i posiada duży zasób wiedzy. Opisana praca w jasny i wyrazisty sposób opisuje wkład pracy naukowej mgr inż. Natalii Dzięgiel w projekt badawczy o istotnym znaczeniu naukowym i aplikacyjnym. Zdaniem recenzenta, **praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Natalii Dzięgiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Poznań, 5 lipca 2021 r.

Prof. dr hab. Daniel Lipiński