



## INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn 5; skr. poczt.55 tel. (4889) 523-46-86; (4889) 524-03-13  
fax (4889) 524-01-24; e-mail: [institute@pan.olsztyn.pl](mailto:institute@pan.olsztyn.pl); [www.pan.olsztyn.pl](http://www.pan.olsztyn.pl)

Olsztyn 30.04.2020.

### Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Jerzego Wiatera pt. „Wieloparametryczna charakterystyka transgenicznych świń na potrzeby ksenotransplantacji z uwzględnieniem analiz histochemicznych, molekularnych oraz testów funkcjonalnych *in vitro*”, wykonanej w Zakładzie Biologii i Obrazowania Komórki, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem dr hab. Marka Romka.

Ksenotransplantacja czyli przeszczep międzygatunkowy jest od wielu dziesiątków lat nadzieją transplantologii, a badania poszukiwania przyczyny odrzucenia ksenoprzeszczepu przez organizm człowieka są prowadzone przez wiele zespołów naukowych na całym świecie.

Świnia domowa (*Sus scrofa f. domestica*), ze względu na parametry fizjologiczne wielu narządów oraz tempo i łatwość rozmnażania, pomimo odrębności filogenetycznej, jest uważana za potencjalnego, optymalnego dawcę dla człowieka. W Polsce pierwsze prace nad uzyskaniem świń transgenicznych pod kątem przydatności do transplantacji, zapoczątkowały zespoły prof. Zdzisława Smorąga i prof. Ryszarda Słomskiego, pracujące nad uzyskaniem transgenicznych świń na potrzeby ksenotransplantacji już od 20 lat, a oceną uzyskanych narządów zajmował się od 2015 roku Doktorant, stąd problematyka jak i tytuł rozprawy doktorskiej nie budzi zdziwienia w pełni uzasadniając podjęcie, przedstawionego w pracy doktorskiej tematu badawczego.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Jerzego Wiatera posiada typowy dla rozpraw doktorskich układ (w starym stylu) i składa się z 8 rozdziałów: Wprowadzenie (Wstęp), Hipotezy, cele i zadania badawcze, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Spis literatury. Dysertacja obejmuje 127 stron.

Cała praca jest bogato ilustrowana za pomocą 8 tabel, 4 schematów i 34 rycin zawierających dobrej jakości mikrofotografie skrawków skóry i wątroby oraz dokumentacją analiz badanych białek.

W obszernym „Wprowadzeniu”, Autor definiuje pojęcie ksenotransplantacji i opisuje towarzyszące ograniczenia. Przedstawia krótki rys historyczny zagadnienia poszukiwań optymalnego dawcy, a następnie skupia się na świni domowej (*Sus scrofa*) jako potencjalnym dawcy narządów dla człowieka. Opisuje barierę immunologiczną w układzie świnia-człowiek i wyszczególnia trzy sposoby aktywowania układu dopełniacza oraz przedstawia kolejny problem w ksenotransplantacji, oprócz epitopu Gal $\alpha$ (1, 3)Gal tzn. niezgodność tkanek świni z tkankami ludzkimi na poziomie klasy MHC. Autor przedstawia sposoby uzyskania zwierząt transgenicznych z obniżoną lub całkowicie zmienioną ekspresją epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal oraz prezentuje możliwości uzyskania osobników podwójnie transgenicznych. Następnie szczegółowo opisuje organy oraz narządy ludzkiego ciała – skórę i wątrobę oraz ich znaczenie kliniczne dla ksenotransplantacji. Rozdział ten jest doskonałym kompendium aktualnej wiedzy na temat ksenotransplantacji i może stanowić materiał na oddzielną publikację przeglądową.

Cele badawcze pracy, wyprowadzone z przedstawionych hipotez są następujące:

1. Wykluczenie ewentualnego negatywnego wpływu przeprowadzonych modyfikacji genetycznych świni na budowę skóry i wątroby oraz na funkcje komórek skóry hodowanych *in vitro*.
2. Określenie, które z przeprowadzonych metod modyfikacji genetycznej świni domowej, najwydajniej obniża ekspresję epitopów Gal $\alpha$ (1, 3)Gal na powierzchni komórek skóry i wątroby.

Do badań wykorzystano materiał biologiczny (próbki skóry i wątroby) świń modyfikowanych genetycznie aż w sześciu wariantach, różniących się wprowadzonymi konstruktami genetycznymi lub nokautem genu oraz materiał pobrany od świń niemodyfikowanych genetycznie jako kontroli.

Do badań komórkowych *in vitro* użyto keratynocytów i komórek ADFCs, przypominających fibroblasty, wyizolowanych ze skóry świni, a ocenę morfologiczną i analizę porównawczą skóry i wątroby wykonano rutynowo barwieniami H&E.

Do analiz immunohistochemicznych skóry i wątroby świń modyfikowanych genetycznie i kontrolnych wykorzystano skrawki mrożeniowe o grubości 6  $\mu$ m. Wykonano również badania

immunocytochemiczne, lektyno-histochemiczne, analizę ilościową skrawków i komórek znakowanych fluorescencyjnie.

Obszerny, bo liczący ponad 40 stron rozdział „Wyniki” został podzielony na 3 części: Skóra-tkanka, Skóra-komórki i Wątroba.

Doktorant szczegółowo opisuje analizę histologiczną skóry, immunolokalizację rekombinowanych enzymów  $\alpha$ 1-fruktozylotransferazy (rh $\alpha$ 1,2-FT),  $\alpha$ -galaktozydazy A (rh $\alpha$ -Gal A) oraz ludzkiego leukocytarnego antygeny E (HLA-E) w skórze na poziomie białka metodą WB oraz lokalizację epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal w skórze. Sygnał pochodzenia rh $\alpha$ 1,2-FT był równomiernie zlokalizowany w całym przekroju naskórka, natomiast rh $\alpha$ -Gal A znajdował się w warstwie skóry właściwej, podobnie jak HLA-E.

Przedstawiona na Ryc. 4.6 ilościowa analiza immunofluorescencji, wykonana za pomocą mikroskopu konfokalnego, wykazała śladowy sygnał rh $\alpha$ 1,2-FT i rh $\alpha$ 2-Gal A w tkance grupy kontrolnej oraz niską ekspresję HLA-E.

Analiza metodą WB próbek skóry od świń TG, 2 x TG i 3 x TG oraz grupy kontrolnej wykazała obecność obu enzymów i HLA-E we wszystkich próbkach badanych zwierząt transgenicznych oraz słaby i bardzo słaby sygnał rh $\alpha$ 1,2-FT i rh $\alpha$ 2-Gal A oraz wyraźne tło HLA-E u kontroli, co obrazuje załączona Ryc. 4.7E, a nie jak podano na str. 53 - Ryc. 4.9F. Również analiza ilościowa potwierdzająca powyższe obserwacje przedstawiona jest na Ryc. 4.8 a nie 4.10.

Lokalizacja epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal w skórze i analiza statystyczna przedstawiona jest na Ryc. 4.9 A-E i 4.10, odpowiednio. Lektyna G5-IB4 silnie wyznakowała całość skrawków w grupie kontrolnej (4.9 A), natomiast w próbkach pochodzących od świń pojedynczo lub podwójnie transgenicznych oraz GTKO ZN obserwowano znacznie słabszy sygnał w porównaniu z grupą kontrolną, a różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi nie były istotne statystycznie. Wykazano ekspresję rh $\alpha$ 1,2-FT, rh $\alpha$ 2-Gal A i HLA-E w hodowanych *in vitro* keratynocytach skóry u wszystkich wariantów transgenicznych świń.

Sygnał immunofluorescencyjny pochodzący od rh $\alpha$ 1,2-FT był zlokalizowany głównie okołojądrowo w komórkach pochodzących od wszystkich wariantów transgenicznych, a sygnał rh $\alpha$ 2-Gal A był rozłożony mniej równomiernie w całej cytoplazmie. Natomiast sygnał od HLA-E zlokalizowany był w błonie komórkowej oraz cytoplazmie niektórych komórek.

Analiza Western blot wykazała obecność wszystkich trzech poszukiwanych enzymów we wszystkich badanych próbkach, przy słabym, pozytywnym sygnale dla rh $\alpha$ 1,2-FT, praktycznie

niewykrywanym dla  $\text{rh}\alpha\text{2-Gal A}$  oraz wyraźnym, większym od tła dla HLA-E (Ryc. 4.18F). Względna ekspresja białek (Ryc. 4.18 G-I) potwierdziła te obserwacje

Lokalizacja i analiza ekspresji epitopu  $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}$  wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną, a badanymi próbkami.

Pozytywny immunofluorescencyjny sygnał w skrawkach wątroby od  $\text{rh}\alpha\text{1,2-FT}$  był zlokalizowany w analizowanych skrawkach pochodzących od wszystkich wariantów transgenicznych. W przypadku  $\alpha$ -galaktozydazy znakowano pojedyncze grupy hepatocytów i przestrzenie międzyzrębowe. Natomiast antygen HLA-E zlokalizowany został głównie w zrazikach wątroby świni.

Analiza półilościowa białek wykazała różnice ekspresji  $\text{rh}\alpha\text{1,2-FT}$  pomiędzy skrawkami od świni podwójnie ( $\text{hFUT2} \times \text{hGLA}$ ) a pojedynczo ( $\text{hFUT2}$ ) a potrójnie ( $\text{FuTx} \times \text{hGLA} \times \text{HLA-E}$ ) transgenicznych. W odniesieniu do ekspresji  $\text{rh}\alpha\text{-GAL A}$  stwierdzono istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną (CTR nTG) a wszystkimi wariantami transgenicznymi, między którymi nie było różnic.

Analiza lokalizacji  $\text{rh}\alpha\text{1,2-FT}$  wykazała jej ko-lokalizację z aparatem Golgiego, co potwierdza fukolizację struktur  $\text{GlcNac-R}$  i w konsekwencji hamowanie powstania epitopu  $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}\beta(1,4)\text{Glc (NAc-R)}$ . Potwierdza to również funkcjonalność tego białka z nokautem  $\alpha\text{1,3-galaktozylotylotransferazy GTKO (ZFN)}$  nukleazy z motywem „palca cynkowego”.

Analiza Western blot potwierdziła ekspresję badanych wyników na poziomie białka, a reprezentacyjne prążki  $\text{rh}\alpha\text{1,2-FT}$ ,  $\text{rh}\alpha\text{-GAL A}$  i HLA-E (Ryc. 4.30) i ich półilościowa analiza względnej ekspresji wobec  $\beta$ -aktyny jako białka referencyjnego (Ryc.4.31) wykazała istotnie wyższą ekspresję analizowanych białek u wszystkich wariantów transgenicznych w porównaniu do grupy kontrolnej. Lektyna GS-IB4 silnie wyznakowała całość skrawków w grupie kontrolnej, a słabiej w pojedynczo ( $\text{hFUT2}$  i  $\text{hGLA}$ ) i podwójnie transgenicznych ( $\text{hFUT2} \times \text{hGLA}$ ).

Analiza ekspresji epitopu  $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}$  na poziomie białka wykonana przy użyciu lektyny wykazała jego obecność we wszystkich analizowanych próbkach białkowych (Ryc. 4.34), a analiza względnej ekspresji wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną a poszczególnymi grupami świń transgenicznych.

Wyniki badań są bardzo dobrze udokumentowane i przedstawione w niezwykle przejrzysty i staranny sposób. Również wykorzystane w pracy metody oraz opracowanie statystyczne wyników nie budzą moich zastrzeżeń.

Na podstawie przeprowadzonych badań mgr inż. Jerzy Wiater wykazał, że:

1. Zastosowane metody modyfikacji genetycznych istotnie obniżają ekspresję komórkową epitopu Gal $\alpha$  (1,3)Gal w komórkach skóry i wątroby świń a wykorzystanie ko-ekspresji genów hFUT2 oraz hGLA może być skuteczną metodą usuwania epitopu Gal $\alpha$  (1,3)Gal z powierzchni komórek skóry jak i wątroby świń.
2. Ekspresja wszystkich produktów białkowych dla wprowadzonych genów jest pełna w tkankach skóry i wątroby oraz hodowanych *in vitro* komórkach skóry świń transgenicznych.
3. Przeprowadzone modyfikacje genetyczne nie mają negatywnego wpływu na budowę skóry i wątroby transgenicznych świń oraz na żywotność komórek skóry hodowanych *in vitro*, a także na zdolność do syntezy kluczowych cytokeratyn przez keratynocyty.

Rozdział „Dyskusja” jest bardzo szeroki i dotyczy nie tylko oceny i znaczenia uzyskanych wyników własnych badań ale np. mechanizmów odrzucania ksenoprzeszczepu, co jest częściowym powtórzeniem informacji przedstawionych we wstępie. To samo dotyczy analizy histologicznej skóry i wątroby świń modyfikowanych genetycznie, a podane informacje są również zbyt szczegółowym powtórzeniem wyników. Ciekawą częścią „Dyskusji” jest fragment dotyczący nadekspresji HLA-E w próbie kontrolnej w stosunku do prób pochodzących od wszystkich wariantów transgenicznych. Autor sugeruje, że ten wynik może być spowodowany podobnymi strukturami białek ludzkiego HLA-E i świńskiego SLA-1, na podstawie porównania sekwencji ludzkiego HLA-E oraz trzech sekwencji świńskiego SLA-1, co sugeruje, że przeciwciała HLA-E mogą wykrywać również SLA-1 dając tym samym wynik reakcji w próbie kontrolnej.

Dobrze przedyskutowana jest również kwestia rozpoznania epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal u zwierząt podwójnie transgenicznych (hFUT2 x hGLA) jakkolwiek nie udało się usunięcia tego epitopu z powierzchni komórek.

Najciekawszym dla Recenzenta jest podrozdział „Lokalizacja i analiza ekspresji ludzkiej rekombinowanej  $\alpha$ 1,2-fukozylotransferazy,  $\alpha$ -galaktozydazy A oraz HLA-E, dotyczący badań funkcjonalnych *in vitro*. Doktorant sugeruje że świńskie keratynocyty mogłyby w przyszłości stanowić narzędzie terapeutyczne i uzupełniać dotychczasową pulę rozwiązań w transplantologii, ale głównym ograniczeniem jest niestabilność transgenów, spadająca w następnych pokoleniach zwierząt transgenicznych, aż do całkowitego wyginięcia.

Drugim problemem jest również brak jednoznacznego adekwatnego działania hFUT2 i hGLA na obniżenie ekspresji epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal w keratynocytach, prawdopodobnie na skutek ich heterogenego pochodzenia.

Dysertację kończy „podsumowanie” i cztery wnioski odpowiadające na postawione cele badawcze.

Piśmiennictwo, głównie anglojęzyczne zostało prawidłowo dobrane, liczy 133 pozycji i jest bardzo aktualne.

Pomijając nieliczne uchybienia edytorskie i nadmierne „przeładowanie” rozdziału „Dyskusja”, fragmentami rozdziałów „Wstęp” i „Wyniki”, nie dopatrzyłem się błędów merytorycznych i metodycznych, a powyższe uwagi nie umniejszają wartości pracy, która pod względem metodycznym i merytorycznym jest bardzo cenna.

Pełna realizacja postawionego celu, oparta o wszechstronną analizę materiału badawczego, poprawne zastosowanie metod badawczych i testów statystycznych, swobodne poruszanie się w zakresie realizowanego tematu wskazują, że Doktorant potrafi zaplanować i przeprowadzić badania naukowe i sformułować wnioski. Mgr inż. Jerzy Wiater spełnia kryteria stawiane kandydatom w Ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016 r. poz. 882).

Na podkreślenie zasługuje niezwykle sumienne, wręcz wzorowe, przedstawienie wyników badań histochemicznych, immunofluorescencyjnych, analizy Western blot i lektynoblotingu. Muszę też podkreślić uderzającą staranność w przygotowaniu całej monografii i szaty graficznej.

Rozprawa odpowiada aktualnym warunkom określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych w zakresie sztuki (określona w artykule 13, Ustęp, 1 Ustawy z dnia 14.03.2003, z późniejszymi zmianami). Mam więc zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pozytywną ocenę pracy doktorskiej i przedstawić wniosek do dopuszczenia mgr inż. Jerzego Wiatera do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Adam Zięćik