

Recenzja rozprawy na stopień naukowy doktora pod tytułem:

**Opracowanie allelo-selektywnej strategii terapeutycznej dla
chorób poliglutaminowych z wykorzystaniem wektorowych
narzędzi technologii interferencji RNA**

autorstwa

mgr inż. Anna Kotowska-Zimmer

Choroby genetycznie uwarunkowane stanowią istotny problem zdrowotny ze względu na z reguły ciężki przebieg oraz, w olbrzymiej większości przypadków, brak możliwości leczenia. Wśród chorób genetycznie uwarunkowanych szczególne miejsce zajmują choroby powodowane wydłużeniem ciągów sekwencji CAG kodujących glutaminę. Do chorób tych należy między innymi choroba Huntingtona (HD), która jest jedną z częstszych ciężkich i nieuleczalnych chorób genetycznych.

Celem pracy było opracowanie terapii polegającej na maksymalnie selektywnym wyciszeniu ekspresji zmutowanych alleli zawierających ekspansję powtórzeń CAG. W szczególności Kandydatka skupiła się na projektowaniu i testowaniu efektywności cząsteczek shRNA oraz amiRNA (ang. *artificial* miRNA) blokujących wybiórczo ekspresję patologicznie wydłużonego genu. Należy podkreślić, że jest to strategia szczególnie atrakcyjna ze względu na możliwość stosowania u wszystkich pacjentów (w odróżnieniu od podejścia opartego na obecności wariantów SNV sprzężonych z mutacją), a także w innych niż HD chorobach wywołanych ekspansją CAG.

Nie ma wątpliwości, że postawiony cel pracy jest niezwykle ważny zarówno z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia.

Przedstawiona do oceny rozprawa składa się z cyklu trzech publikacji w recenzowanych pismach międzynarodowych o wysokim współczynniku oddziaływania (IF >8). Dwie z przedstawionych prac są pracami eksperymentalnymi, trzecia - to praca pogładowa. We wszystkich pracach Kandydatka jest pierwszą autorką. Prace są poświęconym zagadnieniom wykorzystania technologii interferencji RNA (RNAi) w leczeniu chorób genetycznych warunkowanych ekspansją sekwencji trójnukleotyдовых kodujących glutaminę. Należy podkreślić, że prace są spójne tematycznie i stanowią logiczny ciąg prezentujący wyniki badań prowadzonych przez Kandydatkę. Wszystkie prace zostały opublikowane w latach 2020-2022, a więc w stosunkowo krótkim okresie czasu, co dodatkowo potwierdza ich spójność.

Oryginalna publikacja 1

Kotowska-Zimmer A, Ostrovska Y, Olejniczak M (2020). Universal RNAi Triggers for the Specific Inhibition of Mutant Huntingtin, Atrophin-1, Ataxin-3, and Ataxin-7 Expression. Molecular Therapy – Nucleic Acids, 19: 562-571.

Celem pracy było opracowanie allelo-selektywnych cząsteczek shRNA celujących w patologiczne powtórzenia CAG bez względu na ich lokalizację w genomie i ew. obecność sprzężonych wariantów genetycznych.

Zaprojektowano 4 wektorowe cząsteczki shRNA, po transfekcji komórek HEK293T analiza RNAseq wykazała, pożądane parametry, w szczególności znaczną przewagę uwalnianej nici wiodącej nad pasażerską (96-99%). Następnie, z użyciem systemu reporterowego wykazano selektywne obniżenie ekspresji konstruktów zawierających wydłużony ciąg CAG szczególnie skuteczne dla 2 z 4 badanych cząsteczek (shG2 i shA2R). W kolejnym etapie shRNA

podawano do fibroblastów w postaci wektorów lentiwirusowych i oceniano ich efektywność w 4 różnych modelach chorób związanych z ekspansją ciągów CAG (HD, SCA3, SCA7 i DRPLA). Częsteczka shA2R, która okazała się najbardziej skuteczna, była dodatkowo badana w liniach komórkowych (fibroblasty pacjentów, mysie prekursor neuronalne) różniących się liczbą powtórzeń CAG. W przypadku shA2R przeprowadzono też analizy pod kątem potencjalnych efektów niespecyficznych. W szczególności badano poziom ekspresji innych genów, które na podstawie analiz bioinformatycznych mogły ulegać (niepożądanemu) wyciszeniu. Stwierdzono, że na 6 badanych genów obniżeniu uległ tylko poziom mRNA i białka jednego genu (PEG3), co jest wynikiem zachęcającym.

Wyniki pracy wskazują, że cząsteczki shRNA celujące w powtórzenia CAG niezależnie od ich lokalizacji w genomie mogą być efektywną strategią terapeutyczną. Wyniki są oryginalne w skali światowej i stanowią podstawę dalszych badań strategii wyciszania celowanej bezpośrednio w wydłużone ciągi CAG (w tym badań opisanych w drugiej publikacji oryginalnej wchodzącej w skład Rozprawy).

Wkład pracy Kandydatki w ww. publikację należy uznać za szeroki. W szczególności Doktorantka była odpowiedzialna za projektowanie i wykonanie konstruktów genetycznych, transdukcję, izolację materiału biologicznego, wykonanie większości eksperymentów Western blot, RT-qPCR, a także przygotowanie materiału do RNAseq. Co istotne Kandydatka brała udział w analizie wyników, przygotowaniu wszystkich rycin oraz w pisaniu publikacji (opis wyników i metodologii). Dodatkowo, o znacznej roli Kandydatki w omawianej pracy świadczy stosunkowo mała liczba (3) autorów publikacji.

Oryginalna publikacja 2

Kotowska-Zimmer A, Przybyl L, Pewinska M, Suszynska-Zajczyk J, Wronka D, Figiel M, Olejniczak M (2022). A CAG repeat-targeting artificial miRNA lowers the mutant huntingtin level in the YAC128 model of Huntington's disease. Molecular Therapy – Nucleic Acids, 28: 702-715.

Celem pracy było porównanie skuteczności wyciszenia ekspresji zmutowanego genu HT przez shRNA i amiRNA.

Badano 2 cząsteczki siRNA (A2 i G4) wstawione w 4 różne kadłuby (pri-miR-136, pri-miR-155, pri-miR-122, pri-miR-451) i dostarczone za pomocą wektorów lentiwirusowych do komórek fibroblastów pacjentów z HD. Największą efektywność, potwierdzoną też dla mutacji zawierającej krótsze ciągi powtórzeń, stwierdzono dla cząsteczki amiR136-A2. Allelo-selektywną skuteczność amiR136-A2 potwierdzono również w systemie z wykorzystaniem konstruktów zawierających 1 ekson HTT z różnymi długościami ciągów CAG. RNAseq po transfekcji wykazał korzystne parametry wewnątrzkomórkowej obróbki amiR136-A2.

Ważnym etapem badań były eksperymenty na myszach YAC128 (zwierzęcy model HD). Po optymalizacji dostarczania konstruktów do mózgu za pomocą wektora AAV5 z GFP badano wektory AAV z cząsteczkami shA2 i amiR136-A2 oraz odpowiednie kontrole (shSCR i amiR136-SCR). Po 4 tygodniach obserwacji uzyskano istotne obniżenie poziomu

zmutowanego białka dla każdej z cząsteczek w prążkowie oraz hipokampie. Dla kory mózgowej podobne obniżenie stwierdzono tylko dla amiR136-A2. Po 20 tygodniach obserwacji stwierdzono selektywne obniżenie poziomu zmutowanego białka HTT najbardziej wyrażone w prążkowie przy zastosowaniu wyższej dawki wektora. Dla amiR136-A2 analizy immunohistochemiczne wykazały znaczne zmniejszenie ilości agregatów w skrawkach mózgu. Potencjalne efekty niespecyficzne badano poprzez analizy ekspresji innych niż HTT genów, które na podstawie analiz bioinformatycznych mogły ulegać (niepożądanemu) wyciszeniu. Stwierdzono, że na 8 badanych genów obniżeniu (nieznamiennemu statystycznie) uległa ekspresja tylko jednego. Dodatkowo, podawane preparaty badano pod kątem indukcji reakcji zapalnej - barwienia immunohistochemiczne skrawków mózgu oraz analizy ekspresji na poziomie mRNA nie wykazały aktywacji układu immunologicznego. Nie stwierdzono też degeneracji neuronów.

Bardzo ciekawą obserwacją była normalizacja (obniżenie) masy śledziony u myszy traktowanych amiR136-A2 oraz lepsze wyniki dla niektórych testów behawioralnych uzyskane dla myszy traktowanych aktywnymi cząsteczkami w porównaniu do kontroli.

Uzyskane wyniki badań niewątpliwie przybliżają do wykorzystania technologii RNAi, w szczególności amiRNA, w klinice.

Wkład pracy Kandydatki w ww. publikację był szeroki, w pełni zgodny z jej pierwszym autorstwem. W szczególności obejmował on projektowanie amiRNA, tworzenie lentiwirusów i ich testowanie w fibroblastach, analizę wyników RNAseq, genotypowanie myszy, pracę z myszami (iniekcje badanymi wektorami, pobór tkanek), izolację RNA/ DNA/ białka, analizy Western blot oraz część analiz RT-qPCR, wykonanie preparatów mózgow, immunobarwień, zdjęć mikroskopowych i ich analiz. Poza pracą laboratoryjną Kandydatka wykonała ryciny oraz brała udział w pisaniu publikacji i odpowiedziach na recenzje.

Publikacja pogładowa

Kotowska-Zimmer A, Pewinska M, Olejniczak M (2021). Artificial miRNAs as therapeutic tools: Challenges and opportunities. WIREs RNA, 12:e1640.

Praca zawiera omówienie wiedzy na temat narzędzi technologii RNAi w szczególności amiRNA, reguł dotyczących ich projektowania, a także podsumowuje wykorzystanie tych narzędzi dla celów terapeutycznych. Praca jest naprawdę obszerna, ma 33 strony, cytuje 199 pozycji piśmiennictwa.

Wkład Doktorantki polegał na zebraniu i analizie literatury na temat biogenezy miRNA, projektowania i dostarczania cząsteczek amiRNA oraz wykorzystania cząsteczek amiRNA w terapii. Doktorantka wykonała wszystkie ryciny i tabelę główną oraz brała udział w pisaniu publikacji.

Praca jest dowodem, że Kandydatka jest znakomicie przygotowana do pracy naukowej nie tylko pod względem praktycznym, co wynika z ww. prac oryginalnych, ale także pod względem teoretycznym. Należy też podkreślić ścisły związek omawianej pracy pogładowej z tematem całej rozprawy.

Przedstawione publikacje prezentują ważne, oryginalne w skali światowej wyniki, są przekonujące i dowodzą opanowania przez Doktorantkę nie tylko szerokiej specjalistycznej wiedzy nt. RNAi ale też różnorodnych nowoczesnych metod badawczych, w tym metod analizy wyników.

Dodatkowo, Kandydatka jest współautorem jednej pracy opublikowanej w 2018 r., która nie została włączona do cyklu prac podlegających ocenie (*Olejniczak M, Kotowska-Zimmer A, Krzyzosiak W. Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning. Cellular and Molecular Life Sciences, 75: 177–191*). Praca ta dokumentuje zaangażowanie kandydatki w badania naukowe, w szczególności w tematykę RNAi, poprzedzające otwarcie przewodu doktorskiego.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska autorstwa mgr inż. Anny Kotowskiej-Zimmer pt.: ‘Opracowanie allelo-selektywnej strategii terapeutycznej dla chorób poliglutaminowych z wykorzystaniem wektorowych narzędzi technologii interferencji RNA’ spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 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 ze zm.). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W związku z wysokim merytorycznym poziomem prac, oryginalnością uzyskanych wyników oraz bardzo znaczącym udziałem Doktorantki we wszystkich pracach wnoszę o wyróżnienie Rozprawy.

Warszawa 04.09.2022


Prof. dr hab. n med. Rafał Płoski