



Zofia Szweykowska-Kulińska  
Zakład Ekspresji Genów

Poznań, 26.07.2022

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Anny Kotowskiej-Zimmer zatytułowanej  
„Opracowanie allelo-specyficznej strategii terapeutycznej dla chorób  
poliglutaminowych z wykorzystaniem wektorowych narzędzi technologii interferencji  
RNA”**

Przesłana do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Inżynierii Genomowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Promotorem pracy jest dr hab. Marta Olejniczak, która od kilku lat prowadzi grupę badawczą zajmującą się opracowywaniem allelo-specyficznych terapii chorób genetycznych związanych z nadmiernym wydłużeniem trójnukleotydowych powtórek w różnych genach człowieka. Praca mgr inż. Kotowskiej-Zimmer wpisuje się w tematykę badawczą zakładu Pani Promotor i dotyczy opracowania tego typu terapii dla chorób poliglutaminowych (poliQ), związanych z obecnością nadmiernej liczby powtórzeń CAG.

Praca doktorska jest zbiorem trzech publikacji, we wszystkich Kandydatka jest pierwszym a Pani promotor - korespondującym autorem. Pierwsza praca eksperymentalna ukazała się w bardzo dobrym czasopiśmie *Molecular Therapy – Nucleic Acids*, druga praca jest obszerną pracą przeglądową opublikowaną w *WIREs RNA*, a trzecia jest eksperymentalna i została opublikowana ponownie jak pierwsza w *Molecular Therapy – Nucleic Acids*. Praca doktorska jest opatrzona streszczeniem w języku polskim i angielskim, bardzo ciekawym i dobrze wprowadzającym w zagadnienia wstępem w języku polskim, celem pracy doktorskiej, opisem wyników poszczególnych publikacji oraz dyskusją. Pomimo że prace są wieloautorskie (od trzech do siedmiu autorów) do pracy dołączone zostały jedynie oświadczenia Kandydatki i Pani Promotor. Z dołączonych oświadczeń jasno wynika, że mgr inż. Kotowska-Zimmer odegrała wiodącą rolę w prowadzeniu doświadczeń i w uzyskaniu wyników oraz uczestniczyła w pisaniu publikacji i przygotowywaniu rycin. Brak oświadczeń pozostałych autorów nie budzi moich żadnych wątpliwości merytorycznych, jako że Kandydatka jest we wszystkich pracach pierwszym autorem. Natomiast brak pozostałych oświadczeń muszę potraktować jako uchybienie formalne, ponieważ, jak się zorientowałam, przewód doktorski biegnie zgodnie z tzw. „starą ustawą o nauce i szkolnictwie wyższym” (Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z 21. czerwca 2016), a rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego do tej ustawy z dnia 26.09.2016 w paragrafie 5, ustęp 2 mówi: „W przypadku gdy rozprawę doktorską stanowi samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, kandydat przedkłada



promotorom, o których mowa w § 2 ust. 1 i ust. 2 pkt 1 i 2, wraz z dokumentami, o których mowa w ust. 1, oświadczenia wszystkich jej współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie. W przypadku gdy praca zbiorowa ma więcej niż pięciu współautorów, kandydat przedkłada oświadczenie określające jego indywidualny wkład w powstanie tej pracy oraz oświadczenia co najmniej czterech pozostałych współautorów. Kandydat jest zwolniony z obowiązku przedłożenia oświadczenia w przypadku śmierci współautora, uznania go za zmarłego albo jego trwałego uszczerbku na zdrowiu uniemożliwiającego uzyskanie wymaganego oświadczenia.”. Niestety ten warunek rozporządzenia do Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki nie został spełniony. Jak napisałam wyżej, potraktuję to jako niewielkie uchybienie formalne z uwagi na pierwsze autorstwo Kandydatki we wszystkich przedstawionych pracach, a co za tym idzie - niekwestionowany wiodący wkład w publikacje stanowiące rozprawę doktorską.

Autorka postawiła sobie za cel udzielenie odpowiedzi na pytanie o skuteczność cząsteczek shRNA i ich ewentualnych efektów ubocznych w allelo-specyficznej terapii chorób poliQ oraz zaprojektowanie efektywnej cząsteczki amiRNA służącej do tych samych celów co shRNA. Aby odpowiedzieć na te pytania pracę podzieliła na etapy, które obejmowały (1) projektowanie cząsteczek shRNA oraz testowanie ich efektywności i specyficzności w modelach komórkowych chorób poliQ takich jak HD, DRPLA, SCA3 i SCA7; (2) Zebranie i analizę najnowszych informacji dotyczących projektowania i zastosowania cząsteczek amiRNA w terapii chorób człowieka; (3) zaprojektowanie cząsteczek amiRNA celujących w powtórzenia CAG oraz testowanie ich efektywności i specyficzności w modelach komórkowych HD; (4) wybór najefektywniejszej cząsteczki amiRNA oraz analizę jej efektywności wyciszenia i bezpieczeństwa w mysim modelu HD.

W moim przekonaniu założone cele badawcze zostały zrealizowane i to ze znaczącym sukcesem, bo zostały opublikowane w trzech pracach, opublikowanych w dwóch prestiżowych czasopismach naukowych.

Pierwsza praca przedstawia wyczerpującą analizę selekcji, aktywności i efektów ubocznych działania shRNA, które zostały skonstruowane w oparciu o wcześniej wyselekcjonowane najefektywniejsze siRNA skierowane na ciągi CAG. Wprowadzone do odpowiedniego wektora i komórek HEK293T cząsteczki te ulegały wydajnemu dojrzewaniu i precyzyjnej obróbce. Nić pasażerska ulegała detekcji na bardzo niskim poziomie. Autorka pisze w swoim opracowaniu „...nić pasażerska uwalniana jest tylko w niewielkiej ilości...”. W moim przekonaniu sformułowanie „ulegała wykryciu na bardzo niskim poziomie” lepiej odzwierciedla proces cięcia przez Dicer i pozostawiania nici wiodącej w kompleksie RISC. Testowano cztery cząsteczki shRNA pod kątem wydajności i selektywności: zastosowano system reporterowy z lucyferazą, w którym konstrukty były w fuzji z pierwszym egzonem



genu huntingtyny (*HTT*), zawierającym dwa różnej długości ciągi sekwencji CAG (krótki i długi). Kotretransfekcja odpowiednimi wektorami pozwoliła wyłonić najefektywniejsze i najbardziej korzystne pod kątem allelo-specyficzności shRNA, którymi okazały się być cząsteczki o nazwach własnych shG2 i shA2R.

Efektywność badanych cząsteczek shRNA w stosunku do genów wywołujących różne choroby poliQ (HD, SCA3, SCA7 i DRPLA) została przetestowana w odpowiednich liniach komórkowych reprezentujących wyżej wymienione modele chorób poliQ. Najbardziej efektywna cząsteczka shRNA – shA2R została dodatkowo przetestowana w trzech liniach komórkowych modelu choroby HD (dwie linie to fibroblasty i jedna to mysie prekursor neuronalne), w których gen *HTT* niósł różnej długości ciąg powtórzeń CAG (odpowiednio 44/21Q, 151/21Q i 111/7Q). Dla cząsteczki shA2R uzyskano wydajne i wybiórcze wyciszenie zmutowanego białka na poziomie 90%, a w przypadku pozostałych shRNA – również uzyskano wydajne i wybiórcze wyciszenie alleli o długich ciągach CAG.

Dla cząsteczki shA2R sprawdzono również efekty uboczne w sensie ewentualnych innych genów, których aktywność mogłaby ta cząsteczka wyciszać. W fibroblastach ekspresji ulegają trzy geny, z pełną/bardzo wysoką komplementarnością do siRNA pochodzącego z shA2R. Ekspresja jednego (*PEG3*) uległa znaczącemu obniżeniu na poziomie mRNA i białka (odpowiednio 50% i 30%). W moim przekonaniu to znaczący poziom niepożądanego obniżenia ekspresji genu, a w świetle literaturowych doniesień o podobnych efektach stosowania innych shRNA, trudno wróżyć tej strategii dobrą przyszłość. Byłabym ciekawa opinii Kandydatki na ten temat. W swoich rozważaniach na temat wyciszenia genu *PEG3* Autorka pisze, że „...w ciągu życia jedynie allel ojcowski jest aktywny (...) głównie w jajnikach, jądrach i łożysku...”. Czy mogłabym prosić o bliższe wyjaśnienie ekspresji wyłącznie z ojcowskiego allelu? Również nie do końca zgodziłabym się z konkluzją całego rozdziału omówienia, że nie zaobserwowano istotnych efektów niespecyficznych. Przede wszystkim w przypadku pozostałych konstruktów nie przeprowadziła Pani odpowiednich badań, a w przypadku shA2R 50 % i 30% wyciszenie ekspresji niespecyficznego genu na poziomie mRNA i białka jest istotne, a efekty dla organizmu ludzkiego trudne do przewidzenia. Czy sądzi Pani, że takie konstrukty shRNA miałyby szanse do wejścia w fazę badań klinicznych?

Z uwagi na powyżej opisane efekty uboczne allelo-specyficznych shRNA wyciszających geny z nadmiernie wydłużonymi ciągami CAG, Autorka zdecydowała się na podjęcie badań nad skutecznością sztucznych mikroRNA (amiRNA) jako cząsteczek, które powinny dać ten sam efekt wyciszeniażądanego allelu, a jednak ich działanie potencjalnie byłoby wolne od ewentualnych efektów ubocznych. Zanim jednak podjęła prace doświadczalne w tym kierunku, przeanalizowała dostępną literaturę naukową związaną ze stosowaniem sztucznych mikroRNA pod kątem ich efektywnej biogenezy i dotychczasowych efektów stosowania w



podejściach terapeutycznych. Opracowanie to jest bardzo ciekawe, a wyciągnięte wnioski istotne z punktu widzenia dalszych badań Kandydatki. Przegląd literatury wykazał, że nie jest obojętne w kadłub którego pri-miRNA wprowadzony zostanie siRNA, którego skuteczność została wcześniej przetestowana. Ważnym jest również by przeanalizować produkty cięć Droscha i Dicer przy każdym wprowadzanym do komórek sztucznym genie *MIR* (czyli chimerze zbudowanej z naturalnego szkieletu pri-miRNA i prowadzonego w miejsce naturalnego miRNA/miRNA\* - siRNA), jego poziom ekspresji i ostatecznych produktów. Zaburzenia bowiem cięć pierwotnego transkryptu i prekursora (pre-miRNA) podczas biogenezy mogą skutkować skierowaniem siRNA do nieodpowiedniego docelowego mRNA. Jednak nawet przy bardzo dobrze zaprojektowanym pod kątem struktury amiRNA pamiętać jednak należy, że problem niespecyficznego docelowego mRNA dla siRNA pozostaje aktualny i należy go również brać pod uwagę.

Następnym etapem pracy doktorskiej mgr inż. Anny Kotowskiej-Zimmer było zastosowanie amiRNA w allelo-specyficznym wyciszaniu ekspresji genów niosących nadmiarowe ciągi CAG, a także porównanie skuteczności amiRNA ze skutecznością shRNA.

Do konstrukcji chimer genowych niosących amiRNA wykorzystano szkielety pri-miR-136, pri-miR-155, pri-miR-122 i pri-miR451. Przy tych badaniach mam następujące pytanie: czy pri-miR-136, pri-miR-155, pri-miR-122 i pri-miR-451 stanowią niezależne jednostki transkrypcyjne? A jeśli tak, to czy nakładają się z sekwencjami innych genów (np. rezydują w intronach i mają swoje niezależne promotory?

Do wprowadzenia konstruktów do komórek fibroblastów pochodzących od pacjentów HD (68/17Q) wykorzystano wektory lentiwirusowe. Jako amiR wybrano dwie cząsteczki siRNA A2 i G4, które na etapie wcześniejszych badań prowadzonych z wykorzystaniem siRNA i shRNA dały najbardziej obiecujące rezultaty. Przeprowadzone analizy wykazały, że najbardziej skuteczną i obiecującą cząsteczką jest amiRA2 wprowadzony w szkielet pri-miR-136. Cząsteczka ta działała allelo-specyficznie i wyciszała poziom zmutowanego białka o połowę. Ten sam konstrukt ale wprowadzony do fibroblastów HD z genem *HTT* o nieco krótszym ciągu CAG (47/15Q) również dał statystycznie istotne, allelo-specyficzne obniżenie poziomu zmutowanego białka. Warto podkreślić, że wybór pri-miR-136 jako szkieletu amiRNA został dokonany na podstawie badań własnych zespołu i ten właśnie pri-miR-136 okazał się najbardziej efektywnym „nośnikiem”. Dogłębniejsze analizy biogenezy amiR A2 pokazały, że nić wiodąca stanowiła 80% odczytów dupleksu amiR a2/amiR A2\*. Liczba odczytów dla dojrzałej cząsteczki amiR 136-A2 była 10 razy niższa niż w przypadku stosowania shA2. Jednak skuteczność działania, jak pokazały dalsze doświadczenia, była bardzo zbliżona, jeśli mierzyć ją allelo-specyficznością wyciszania zmutowanego mRNA i procentem obniżenia tego mRNA i białka. Pokazuje to, że poziom amiR 136-A2, podobny do poziomowi innych endogennych miRNA, jest wystarczający dla efektywnego wyciszenia



zmutowanego allelu. Autorka wysuwa przypuszczenie, z którym się zgadzam, że jest to efekt wykorzystania „prawie” naturalnego substratu w naturalnej ścieżce biogenezy miRNA i jej efektywnego włączenia w kompleks RISC.

Najciekawszą częścią pracy jest przetestowanie zaprojektowanych narzędzi interferencji RNA *in vivo*, z wykorzystaniem myszy YAC128, modelu choroby Huntingtona. W genomie tych myszy znajduje się kopia ludzkiego genu huntingtyny ze 125 powtórzeniami CAG. Nie jest dla mnie jasne, czy można było w tym układzie badać allelo-specyficzność. Czy drugi allel był taki sam, czy też niósł krótszy ciąg CAG? Na samym końcu swojego opisu wykonanych doświadczeń Autorka pisze o allelo-specyficzności działania amiR 136-A2, ale nie wynika to z przedstawionego materiału. Autorka wykorzystowała wektor AAV5 (adeno-associated virus 5) z uwagi na jego tropizm do komórek nerwowych. Do optymalizacji dostarczenia i dystrybucji wykorzystano wektor wirusowy ekspresyjny GFP. Analiza skrawków mózgu infekowanych myszek pokazała, że przy zastosowaniu najwyższej dawki wektora ekspresja była wyraźnie widoczna w komórkach prążkowiec, hipokampu oraz części komórek kory mózgowej. W głównym doświadczeniu zastosowano do wyciszenia ludzkiego genu huntingtyny cząsteczki shA2 i amiR-136-A2, a jako kontrolę zastosowano cząsteczki shSCR i amiR-136 SCR.

Doświadczenia trwały 4 i 20 tygodni. Porównanie skuteczności działania shA2 i amiR 136-A2 pokazało na porównywalny stopień wyciszenia ludzkiego genu *HTT*, przy czym najlepsze efekty zaobserwowano w prążkowiec, dalej w hipokampie, a najniższe w korze mózgu. Nie jest dla mnie jasne, czy i w tym wypadku przeprowadzono sekwencjonowanie sRNA lub RT-qPCR by porównać ekspresję dojrzałych cząsteczek efektorowych? Ciekawi mnie, czy poziom A2 pochodzącego z shA2 był również 10-krotnie wyższy niż amiR 136-A2, jak to zaobserwowano w liniach komórkowych. Czy stopień wyciszenia *HTT* koreluje z poziomem dojrzałych shA2 i amiR 136-A2?

Co bardzo obiecujące, analiza skrawków mózgu traktowanych cząsteczką amiR 136-A2 wykazała zmniejszenie liczby agregatów *HTT* nawet o 50%. Czy efekt w przypadku shA2 był podobny?

Analiza docelowych mRNA typu „off-target” wykazała, że ich poziom się nie zmienia, jedynie w jednym przypadku zaobserwowano spadek, niemniej nieistotny statystycznie.

Wykazano również, że stosowanie amiR 136-A2 nie aktywuje odpowiedzi immunologicznej, a także zaobserwowano spadek masy śledziony, uzyskując wynik odpowiadający zdrowym myszkom. Czy podobne wyniki uzyskano dla shA2?

Z kolei testy behawioralne wykazały również pewną poprawę zachowań, zarówno w przypadku myszy traktowanych shA2, jak i amiR 136-A2.

W podsumowaniu Autorka stwierdza, że amiRNA są obiecującym narzędziem w leczeniu chorób poliQ (a przynajmniej choroby Huntingtona). Ciekawi mnie czy w przypadku terapii



chorób genetycznych człowieka byłaby szansa na podawanie amiRNA do płynu rdzeniowo-mózgowego? Czy tego typu terapie były już w testach klinicznych?

Pracę ogólnie oceniam jako znakomitą. Wyniki zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach, a wszyscy wiemy, jak trudno obecnie dobrze opublikować pracę naukową. Wymaga to kompleksowego podejścia do rozwiązywanego problemu, zaatakowania go z różnych metodycznie stron i umocowania w szerokim kontekście komórkowym i organizmalnym. Te warunki spełnia praca doktorska mgr inż. Anny Kotowskiej-Zimmer. Mamy w niej szeroki wachlarz technik biologii molekularnej, mamy pracę z liniami komórkowymi, myszami transgenicznymi, analizą fenotypu myszy i testy behawioralne. Praca niesie duży ładunek nowości naukowej i daje nadzieje na rozwój nowych kierunków terapii chorób poliQ. Jest wykonana bardzo solidnie, a Kandydatka musiała włożyć ogrom pracy w uzyskanie tak dobrych wyników. Dlatego z całym przekonaniem zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Anny Kotowskiej-Zimmer do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na znakomite wyniki, co znalazło odzwierciedlenie w opublikowaniu ich w prestiżowych czasopismach naukowych, zwracam się również z wnioskiem o wyróżnienie mgr inż. Anny Kotowskiej-Zimmer stosowną nagrodą.

Zofia Szweykowska-Kulińska