

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
Pani mgr Magdaleny Dąbrowskiej  
pt. „Optymalizacja technologii CRISPR-Cas9 w kontekście celowania w  
sekwencje powtarzające się”**

Chociaż w tytule rozprawy doktorskiej przedłożonej przez Panią mgr Magdalenę Dąbrowską główny nacisk położony został na metodę wprowadzania modyfikacji genetycznych przy użyciu systemu CRISPR-Cas9, to w rzeczywistości obiektem badań Doktorantki były choroby poliglutaminowe, czyli genetycznie uwarunkowane schorzenia neurodegeneracyjne, spowodowane ekspansją powtórzonych sekwencji nukleotydowych złożonych z trzech nukleotydów kodujących reszty glutaminy w specyficznych polipeptydach. Choroby te stanowią wielkie wyzwanie nie tylko medyczne, gdyż do tej pory nie są dostępne skuteczne metody ich leczenia, ale także biologiczne, gdyż ich molekularne mechanizmy są w dalszym ciągu poznane tylko w pewnym zakresie. Najczęstszą z tej grupy chorób jest choroba Huntingtona, powodowana przez mutacje w genie *HTT*. Choroba ta była głównym obiektem badań Pani mgr Magdaleny Dąbrowskiej, gdyż mimo znajomości pierwotnej przyczyny (wspomnianej wyżej mutacji), w dalszym ciągu nie jest rozstrzygnięta choćby tak podstawowa sprawa jak to, czy zmiany patologiczne w komórkach wynikają z tworzenia się nierozpuszczalnych agregatów produktu zmutowanego genu *HTT* czy też z nieprawidłowej struktury transkryptu tego genu. W związku z powyższym, prace nad potencjalnymi terapiami są tym trudniejsze, skoro niełatwo jest nawet znaleźć kluczowy cel molekularny dla ewentualnego leku. Trudno się też zatem dziwić wielu nieudanym próbom klinicznym podczas testowania różnych metod leczenia choroby Huntingtona.

W powyższym świetle, stworzenie nowych narzędzi umożliwiających efektywne badania nad molekularnymi mechanizmami chorób poliglutaminowych i poszukiwania efektywnych metod terapeutycznych uważam za niezwykle ważne zadanie naukowe. Zadanie takie może być wydajnie realizowane jedynie przez osoby mające znakomicie opanowany warsztat biologii molekularnej i dogłębnie zaznajomione z charakterystyką i specyfiką obiektów badań. W ramach takiego zadania wykonywała swoją pracę doktorską Pani mgr Magdalena Dąbrowska i podjęła się niełatwego wyzwania jakim było stworzenie nowych metod pozwalających na efektywniejsze manipulacje genetyczne i analizy molekularne związane z badaniem omawianej grupy chorób.

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Dąbrowskiej przygotowana została w postaci cyklu powiązanych tematycznie artykułów, opublikowanych w międzynarodowych periodykach naukowych. Taka forma dysertacji spełnia wymagania ustawowe. Na wyżej wspomniany cykl artykułów składają się prace, które ukazały się w następujących czasopismach: *Frontiers in Neuroscience*, *Methods in Molecular Biology*, *Nucleic Acids Research* oraz *International Journal of Molecular Sciences*. Doktorantka jest pierwszą autorką we wszystkich tych artykułach (w jednym wspólnie z innym autorem, gdzie stwierdzono równorzędny wkład). Wskazuje to na Jej kluczową rolę w powstaniu tych prac, co potwierdzone jest oświadczeniami zarówno samej Pani mgr Magdaleny Dąbrowskiej jak i autorów korespondujących wymienionych publikacji. Szkoda co prawda, że nie zamieszczono oświadczeń pozostałych współautorów (z wyjątkiem oczywiście nieżyjącego już niestety Pana profesora Włodzimierza Krzyżosiaka), niemniej wiodąca rola Doktorantki jest w tym przypadku bezdyskusyjna, uznaję zatem wymieniony brak za niewielkie uchybienie formalne.

Jako główny cel pracy, Pani mgr Magdalena Dąbrowska wskazała „optymalizację technologii CRISPR-Cas9 w kontekście celowania w sekwencje powtarzające się”. Analogiczne sformułowanie znajduje się także w tytule ocenianej



rozprawy doktorskiej. Po lekturze tej dysertacji stwierdzam, że nie tylko został w pełni osiągnięty powyższy cel, ale uważam iż sformułowanie tytułu i głównego osiągnięcia pracy jako „optymalizacja technologii CRISPR-Cas9” jest wyrazem zbytnej skromności Autorki w obliczu uzyskanych wyników. Pani mgr Magdalena Dąbrowska opracowała bowiem nowe podejście metodyczne pozwalające na wydajną i specyficzną inaktywację genu *HTT* poprzez precyzyjne wycięcie rejonu powtórzeń CAG z jego sekwencji (artykuł opublikowany we *Frontiers in Neuroscience*). Szczegółowa procedura inaktywacji tego genu z wykorzystaniem systemu CRISPR-Cas9n została przedstawiona w kolejnej pracy, opublikowanej w *Methods in Molecular Biology*. Co więcej, Doktorantka odegrała kluczową rolę w stworzeniu bardzo ciekawej, nowej metody ilościowej oceny edycji genomu w miejscach docelowych i niespecyficznym. Metoda ta, nazwana qEva-CRISPR, została opisana w artykule, który ukazał się w *Nucleic Acids Research*. Wreszcie w ostatniej z prac składających się na rozprawę doktorską Pani mgr Magdaleny Dąbrowskiej, opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences*, opisana została konstrukcja znakomitych narzędzi do badania molekularnych mechanizmów choroby Huntingtona poprzez stworzenie izogenicznych modeli komórkowych (niosących allele genu *HTT* dzikiego typu oraz zawierających mutacje z różną liczbą powtórzeń CAG) opartych o linie komórkowe HEK293T oraz iPSC. Zatem Pani mgr Magdalena Dąbrowska skonstruowała znakomite narzędzia, zarówno komórkowe jak i molekularne, do badania mechanizmów choroby Huntingtona, do testowania nowych podejść terapeutycznych, a także do weryfikacji prawidłowości przeprowadzonych manipulacji genetycznych z użyciem technologii CRISPR-Cas9. Nie jest to bynajmniej jedynie „optymalizacja” znanej wcześniej technologii ale opracowanie zupełnie nowych metod molekularnych oraz stworzenie zupełnie nowych modeli komórkowych. Uważam to za znakomite osiągnięcie naukowe, otwierające nowe perspektywy w badaniach nad zrozumieniem patogennych procesów zachodzących w komórkach osób cierpiących z powodu chorób poliglutaminowych oraz proponujące

nowe podejście terapeutyczne. Sądzę, że nie byłoby żadną przesadą gdyby w tytule tej rozprawy doktorskiej znalazło się sformułowanie podkreślające wysoki poziom nowatorstwa uzyskanych wyników.

W ramach dyskusji naukowej, chciałbym natomiast zapytać Doktorantkę o Jej opinię na nurtujące problemy związane z możliwościami terapeutycznymi w przypadku choroby Huntingtona i innych chorób poliglutaminowych. O ile bowiem wyrafinowane manipulacje genetyczne, między innymi takie jakie zostały opisane w przedłożonej rozprawie doktorskiej, można z powodzeniem przeprowadzić w komórkach hodowanych *in vitro*, to problemem staje się zastosowanie technologii CRISPR-Cas9 i pochodnych metod w leczeniu pacjentów z chorobami poliglutaminowymi. W odróżnieniu bowiem od różnych chorób dziedziczonych w sposób autosomally recesywny, gdzie wprowadzenie do organizmu stosunkowo niewielkiej porcji komórek prawidłowych lub odpowiednio zmodyfikowanych może potencjalnie dawać efekty terapeutyczne, to w przypadku chorób dziedziczonych w sposób dominujący takie podejście może być wysoce niewystarczające. Z drugiej strony trudno sobie wyobrazić, przynajmniej na podstawie znajomości obecnie dostępnych technologii, aby można było wprowadzić odpowiednie modyfikacje genetyczne we wszystkich albo przynajmniej większości komórek pacjenta, tym bardziej jeśli procesy patologiczne dotyczą głównie neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym. Jakie perspektywy praktycznego zastosowania technologii CRISPR-Cas9 w leczeniu takich pacjentów widzi Doktorantka? Ponadto, skoro niektóre podejścia terapeutyczne w chorobie Huntingtona zmierzają w kierunku zahamowania powstawania zarówno produktu zmutowanego allelu *HTT* jak i prawidłowej formy huntingtyny, to czy nie ma obaw związanych z brakiem tego białka w organizmie? Aktywna huntingtyna może odgrywać ważne funkcje fizjologiczne, zatem czy jej usunięcie z komórek nie będzie skutkowało poważnymi objawami niepożądanymi w organizmach pacjentów?



W podsumowaniu mojej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Dąbrowskiej uważam, że Doktorantka wykonała serię znakomitych badań, które doprowadziły do stworzenia nowych narzędzi molekularnych i komórkowych, niezwykle przydatnych w badaniach mechanizmów chorób poliglutaminowych oraz w pracach nad tworzeniem nowych leków na te choroby. Pani mgr Magdalena Dąbrowska wykazała zatem, że potrafi efektywnie prowadzić badania naukowe i rozwiązać problem naukowy. Udowodniła, poprzez przygotowanie odpowiednich opisów dotyczących badanych zagadnień, a zawartych w artykułach składających się na Jej rozprawę doktorską, że dysponuje odpowiednią wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych prac badawczych. Na podstawie powyższego stwierdzam, że Doktorantka spełniła wszystkie wymagania ustawowe dotyczące warunków stawianych kandydatom do stopnia doktora, a dotyczące przygotowania rozprawy doktorskiej. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Dąbrowskiej do publicznej obrony rozprawy doktorskiej. Ze względu na znakomite osiągnięcia naukowe zaprezentowane w ocenianej dysertacji, a w szczególności opracowanie nowych, wyrafinowanych metod molekularnych do wprowadzenia modyfikacji genetycznych w komórkach ludzkich oraz weryfikacji poprawności (zgodności z założeniami) uzyskanych zmian w sekwencji DNA, a także stworzenie nowych, potencjalnie niezwykle użytecznych modeli komórkowych choroby Huntingtona, wnioskuję o rozważenie możliwości odpowiedniego wyróżnienia tej zdecydowanie wybijającej się ponad przeciętność rozprawy doktorskiej.



Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn