



**INSTYTUT
GENETYKI CZŁOWIEKA**
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Poznań, 1 czerwca 2022

Prof. dr hab. Jadwiga Jaruzelska
ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00
fax +48/61/823 32 35
e-mail: jadwiga.jaruzelska@igcz.poznan.pl

www.igcz.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. „Optymalizacja technologii CRISPR-Cas9 w kontekście celowania w sekwencje powtarzające się”

Doktorantka: Pani mgr Magdalena Dąbrowska

Badania nad patologicznymi mechanizmami uwarunkowanej mutacjami dynamicznymi CAG płasawicy Huntingтона mają długą tradycję w IChB PAN. Podstawy pod badania nad tą ciężką chorobą genetyczną położył prof. Włodzimierz Krzyżosiak z zespołem. Kontynuację i otwarcie nowych kierunków zapewnili utalentowani wychowankowie, w tym Pani promotor niniejszej rozprawy, dr hab. Marta Olejniczak. Opracowanie terapii płasawicy Huntingтона jest niezwykle trudnym zadaniem i sukces w tym zakresie wydaje się odległy. Wielkie nadzieje pokłada się w nowoczesnych metodologiach edytowania genomu opartych o bakteryjny mechanizm CRISPR. Ważnym etapem pośrednim osiągnięcia tego celu jest opracowanie różnorodnych komórkowych modeli choroby, np. uzyskanie komórek o ściśle określonej długości powtórzeń CAG w eksonie pierwszym genu huntingtyny (*HTT*) w taki sposób, by pod względem długości reprezentowały stan prawidłowy lub patologiczny. Rozprawa Pani mgr Magdaleny Dąbrowskiej wpisuje się w ten nurt badań. Przedstawione cztery prace skupiają się wokół rozwiązywania kilku istotnych problemów metodologicznych CRISPR, w kontekście edytowania *HTT* oraz innych genów. Wyzwaniem było opracowanie bardziej precyzyjnych w stosunku do opublikowanych przez inne grupy badawcze metod

edycji komórek pacjentów. Edycja miała polegać na usuwaniu powtórzeń w eksonie 1 genu *HTT* lub przeciwnie, wprowadzaniu powtórzeń w określonej liczbie. Zadaniem było również opracowanie precyzyjnych metod sprawdzających wiarygodność edycji poprzez identyfikację każdej mutacji w miejscu docelowym oraz w niepożądanych, które pojawiałyby się w innych miejscach genomu. Wreszcie, uzyskane modele miały być zastosowane w badaniu efektów fizjologicznych spowodowanych wyciszeniem ekspresji patologicznych wariantów genu *HTT*. Wszystkie te zadania pomimo wysokiego stopnia trudności zostały uwieńczone sukcesem.

Pierwszy artykuł opisuje opracowanie metodologii CRISPR która umożliwiła całkowite i bardzo precyzyjne wycięcie powtórzeń CAG, niezależnie od ich długości. To ważne biorąc pod uwagę bardzo zróżnicowaną długość powtórzeń w populacji chorych. Osiągnięto to przez wprowadzenie do komórek fibroblastów pacjentów, charakteryzujących się różną długością powtórzeń, zmodyfikowanego enzymu Cas9 o właściwościach nikazy tnącej nic pojedynczą. Ten typ Cas9 działa bardziej specyficzniej w stosunku do Cas9 typu dzikiego i generuje bardziej precyzyjny mechanizm naprawczy. Wraz z nikazą Cas9 wprowadzono parę gRNA wiążących się w sekwencjach flankujących powtórzenia CAG. Efekt tego podejścia był spektakularny ponieważ precyzyjne wycięcie powtórzeń nie naruszyło sekwencji sąsiadujących z powtórzeniami CAG. Co więcej, nie stwierdzono niepożądanych zmian w miejscach mikro-homologicznych. Zastosowane podejście spowodowało przesunięcie ramki odczytu w mRNA a w konsekwencji pojawienie się przedwczesnego sygnału stop. Poziom skróconego transkryptu *HTT* nie zmalał w stosunku do poziomu transkryptu dzikiego w komórkach kontrolnych, być może jak sugeruje Autorka, ponieważ kodon PTC wystąpił w konfiguracji chroniącej go przed NMD. Zastanawiam się z jakiego powodu poziom białka nie obniżył się bardziej niż 70%, skoro przesunięcie ramki odczytu miało miejsce w obydwu allelach? Może wśród edytowanych komórek były również komórki typu dzikiego z nienaruszonymi powtórzeniami CAG a więc z brakiem przesunięcia ramki odczytu? Jaka była masa białka *HTT* wykrywanego w komórkach po zabiegu wycięcia powtórzeń, w stosunku do białka produkowanego przez komórki wyjściowe? Nasuwa się bardziej ogólne pytanie czy usunięcie, powtórzeń z obu alleli, tzn. całkowitej utraty białka *HTT* spowodowało efekt fenotypowy *in vivo*, np. w modelu *mysim*? Stwierdzenie „stworzyliśmy nowe podejście terapeutyczne oparte na indukcji SSBs, które powoduje

wydajną i specyficzną inaktywację genu *HTT* jest może zbyt silne? Chodzi raczej o „eksperymentalne podejście terapeutyczne”? W innym artykule przedstawiono różne podejścia eksperymentalne które doprowadziły do osiągnięcia efektów opisanych w artykule pierwszym. Dodatkowo opracowano protokół wprowadzania powtórzeń CAG różnej długości w oparciu o nikazę Cas9 oraz matrycę donorową. Matryce wprowadzano ją w postaci pojedynczej nici DNA lub syntetyzowanej z odpowiedniego plazmidu. W konsekwencji uruchamiany był mechanizm naprawy poprzez homologiczną rekombinację. To praca metodologiczna zawierająca dokładny protokół modyfikowania struktury eksonu 1 genu *HTT* przy pomocy CRISPR-Cas9n. Praca ta jest bardzo cenna dla osób planujących badania w oparciu o CRISPR. Wskazuje ile różnych aspektów trzeba wziąć pod uwagę przystępując do edytowania genomu z zastosowaniem CRISPR.

W pracy nad modelami komórkowymi płasawicy Huntingtona istotne jest nie tylko dysponowanie metodologią precyzyjnego usuwania powtórzeń lecz również wprowadzania powtórzeń określonej długości do eksonu 1 genu *HTT*. Temu aspektowi technologicznemu poświęcony jest następny artykuł rozprawy. Stwierdzenie „W celu lepszego poznania wpływu ciągów CAG na patogenezę HD stworzyliśmy nowe linie HEK 293T z patologicznie wydłużoną sekwencją ciągu CAG i izogeniczne linie iPSCs z prawidłową długością sekwencji powtarzającej się” wymagałoby komentarza czemu precyzyjnie miał służyć każdy model komórkowy. Także zdanie zamieszczone nieco dalej na tej samej stronie „Z przeprowadzonych badań wynika, że poziom transkryptu zmierzony metodą RT-qPCR koreluje z długością sekwencji powtórzeń CAG” – w jaki sposób korelował? Ostatecznie uzyskane nowe linie HEK293T oraz IPS zostały sprawdzone w wielu aspektach, np. pokazano, że linie IPS nie utraciły pluripotencji. Linie te posłużyły między innymi i do zbadania potencjału terapeutycznego cząsteczek siRNA oraz zaburzeń składania mRNA.

Bardzo istotnym osiągnięciem rozprawy było opracowanie nowej metody nazwanej qEva-CRISPR jednoczesnego wykrywania specyficznych i niespecyficznych zmian w genomie, które są indukowane przez system CRISPR-Cas9. Jednym z atutów tej metody jest możliwość wykrywania każdego typu mutacji. Jednocześnie czułość metody od typu mutacji nie zależy. Zaproponowane podejście zostało dokładnie sprawdzone w wielu aspektach i można je stosować do edycji różnych genów. Autorka krytycznie ocenia opracowaną metodę i wskazuje na jej słabe strony.

Przedstawiona rozprawa stwarza interesujące i ważne perspektywy dla dalszych badań. Zgodnie z oczekiwaniami Autorki, uzyskane zmodyfikowane linie IPS mogą zostać w przyszłości zróżnicowane do neuronów i w ten sposób dostarczyć doskonałego modelu do badań nad molekularnymi mechanizmami płasawicy Huntingtona oraz potencjalnymi terapiami. Zapoznanie się z problematyką płasawicy Huntingtona przedstawioną w rozprawie nasuwa pewne ogólne pytania: 1/ Skoro białko HTT ulega ekspresji w różnych tkankach, dlaczego choroba dotyka jedynie mózgu? 2/ Czy białko HTT jest funkcjonalnie niezbędne? 3/ Jaka jest funkcja białka HTT? 4/ Dlaczego powtórzenia są dynamiczne u jednych osób a u innych nie? 5/ Na ile zmiana liczby powtórzeń w niedzielających się komórkach stanowi wyzwanie dla metod terapeutycznych w przyszłości ale również dla badań podstawowych na obecnym etapie?

Drobne uwagi krytyczne

- Niektóre ryciny zostały opisane zbyt skrótowo, np. Ryc 1 w rozdziale „Omówienie publikacji”
- W Tabeli S2 brak informacji co oznaczają czerwone litery.
- Opis Ryciny S1 w ostatniej publikacji jest zbyt skrótowy
- str. 27 Omówienia stwierdzenie „N-końcowe fragmenty genu” nie jest prawidłowe

Wniosek końcowy

Rozprawę uważam za bardzo wartościową. We wszystkich czterech artykułach opublikowanych w cieszących się uznaniem czasopismach Doktorantka odegrała rolę wiodącą. Artykuły zawierają wiele cennych obserwacji stanowiących podstawę do dalszych badań a w przyszłości zaproponowaniu nowych celów terapii płasawicy Huntingtona. W moim przekonaniu rozprawa spełnia formalne warunki stawiane rozprawom doktorskim i dlatego wnioskuję o dopuszczenie Panią mgr Magdalenę Dąbrowską do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc uwagę wyjątkowo dużą wartość uzyskanych wyników wnioskuję także o wyróżnienie rozprawy.

