



Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego

WYDZIAŁ LEKARSKI I NAUK O ZDROWIU

ul. G. Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków
tel. (12) 252 45 05, (12) 252 45 20, fax: (12) 252 45 02
e-mail: wlnz@afm.edu.pl

Prof. dr hab. med. Monika Rudzińska-Bar
Kierownik Katedry i Kliniki Neurologii
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu
Krakowska Akademia im. A. F. Modrzewskiego
Email: mrudzinska@afm.edu.pl

Kraków 20.07.2023

Recenzjarozprawy na stopień doktora nauk biologicznych mgr Pawła Joachimiaka

stanowiącej cykl publikacji zatytułowany

„Charakterystyka molekularna transkryptów HTT i ATXN3 w kontekście ich roli w patogenezie i użycia jako cele w terapii chorób poliglutaminowych HD i SCA3”

Przesłana do recenzji praca doktorska obejmująca cykl 3 publikacji. Jest to osiągnięcie naukowe na stopień doktora nauk biologicznych, które zostało zatytułowane: „Charakterystyka molekularna transkryptów HTT i ATXN3 w kontekście ich roli w patogenezie i użycia jako cele w terapii chorób poliglutaminowych HD i SCA3” składa się z następujących publikacji:

1. A. Ciesiołka*, A. Stroynowska-Czerwińska*, P. Joachimiak, A. Ciołak, E. Kozłowska, M. Michalak, M. Dąbrowska, M. Olejniczak, K. Raczyńska, D. Zielińska, M. Woźna-Wysocka, W. Krzyżosiak, A. Fiszer. „Artificial miRNAs targeting CAG repeat expansion in ORFs cause rapid deadenylation and translation inhibition of mutant transcripts”. *Cell Mol Life Sci.* 2021 Feb;78(4):1577-1596. doi: 10.1007/s00018-020-03596-7. *równorzędni współautorzy
IF (2021): 9.234 5-letni IF: 10.001 Punkty MNiSW: 140
2. P. Joachimiak, A. Ciesiołka, G. Figura, A. Fiszer. „Implications of Poly(A) Tail Processing in Repeat Expansion Diseases”. *Cells.* 2022 Feb;11(4):677. doi: 10.3390/cells11040677.
IF (2021): 7.666 5-letni IF: 7.677 Punkty MNiSW: 140

3. P. Joachimiak, A. Ciesiołka, E. Kozłowska, P. M. Świtoński, G. Figura, A. Ciołek, G. Adamek, M. Surdyka, Ż. Kalinowska-Pośka, M. Figiel, N. S. Caron, M. R. Hayden, A. Fiszer. „Allele-specific quantitation of ATXN3 and HTT transcripts in polyQ disease models”. BMC Biol. 2023 Feb;21(1):17. doi: 10.1186/s12915-023-01515-3. IF (2021): 7.364 5-letni IF: 8.641 Punkty MNiSW: 140

Należy podkreślić, że tak szeroko zakrojony temat jest wyzwaniem bardzo ambitnym a jednocześnie dotyczy niezwykle ważnego tematu w zakresie badań chorób zwyrodnieniowych mózgu o charakterze chorób poliglutaminowych. Choroby poliglutaminowe to 9 chorób takich jak ataksje rdzeniowo-mózdkowe 1,2,3,6,7, 17, choroba Huntingtona, DRPLA oraz rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni. Choroby poliglutaminowe charakteryzują się podobnym patomechanizmem mutacji (nadmierna liczba powtórzeń CAG), akumulacją w komórkach patologicznych białek oraz objawem antycypacji, natomiast ich obraz kliniczny jest niezwykle różnorodny - od dominujących objawów mózdkowych po ruchy płasawicze i choroby mięśni.

Powyższy cykl publikacji został uzupełniony o krótkie wprowadzenie, sprecyzowanie celu pracy doktorskiej i sformułowanie 4 zadań badawczych, zwięzłe omówienie cyklu prac oraz podsumowanie z sformulowaniem 9 wniosków oraz dyskusję. Rozprawa na stopień doktora nauk mgr Pawła Joachimka zawiera także spis treści, wykaz i objaśnienia używanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografię, na którą się składa 142 pozycji piśmiennictwa głównie z ostatnich lat oraz załączniki: oświadczenia o wkładzie doktoranta w powstanie opisanych prac naukowych oraz prace naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.

Wszystkie oceniane prace stanowiące cykl 3 prac będących rozprawą na stopień doktora nauk biologicznych doktoranta zostały opublikowane w ostatnich dwóch latach: 2021-2023. Każda z nich ukazała się w czasopiśmie z IF powyżej 7,677 a ich łączny IF wynosi 26,319 punktów co jest równoważne 420 punktów MNiSW. W dwóch powyższych publikacjach mgr Paweł Joachimiak jest pierwszym autorem, a w jednej publikacji jest trzecim współautorem. Badania do publikacji zostały wykonane w Zakładzie Biotechnologii Medycznej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN.

Przedstawione prace nie budzą żadnych wątpliwości co do oryginalności. Opis metodologii i przedstawione wyniki są odpowiednio dokładne i umożliwiają innym badaczom powtórzenie badania w celu weryfikacji wyników na innym materiale.

Choroby poliglutaminowe takie jak choroba Huntingtona (HD) i ataksja rdzeniowo – mózdkowa typ 3 (SCA3) są chorobami rzadkimi, ale nieuchronnie powodujące duże kalectwo i niesprawność chorych, aż w końcu doprowadzając do przedwczesnej śmierci. Nieliczne próby terapii farmakologicznych szerokiego spektrum objawów klinicznych powyższych chorych nie spowodowały satysfakcjonującej poprawy klinicznej. Choroba Huntingtona charakteryzuje się występowaniem płasawicy, depresji, zaburzeń zachowania i pamięci. W obrazie SCA dominują objawy mózdkowe prowadzące do zaburzeń koordynacji ruchów dowolnych. Leczenie objawowe poprzez stosowanie neuroleptyków zmniejsza nasilenie ruchów płasawicznych a leczenie przeciwdepresyjne redukuje objawy depresji u chorych z HD. Nie udokumentowano skuteczności działania żadnego prokognitywnego leku w redukcji nasilenia zaburzeń poznawczych w HD, jak również żaden z znanych terapeutyków nie wpływa na objawy ataksji. Dlatego tak niezwykle ważne jest opracowanie terapii genetycznych hamujących progresję choroby, a może nawet powodujących zatrzymanie ujawnienia się jej pierwszych objawów. Terapie genetyczne z dużym skutkiem stosowane w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni, a w 2023 roku FDA zarejestrowała terapię genetyczną do leczenia dystrofii mięśniowej Duchenne’a i ataksji Friedreicha. Niestety w ostatnim czasie intensywnie prowadzone badania terapii genetycznych HD i SCA3 nie zostały zakończone sukcesem. Dlatego cel pracy doktorskiej, którym jest poznanie cech transkryptów związanych z chorobami poliglutaminowymi mających znaczenie w patogenezie oraz projektowaniu strategii terapeutycznych ma istotne znaczenia poznawcze i jest w głównym nurcie badań w tym zakresie. Rola transkryptów w patogenezie poliQ nie jest jeszcze w pełni zbadana dlatego temat pracy doktorskiej uznaję za bardzo interesujący poznawczo jak również niezwykle istotny klinicznie, mieszczący się w cyklu badań poszukiwania skutecznej terapii genetycznej chorób poliQ.

W wprowadzeniu Doktorat, krótko omawia patomechanizm genetyczny i komórkowy chorób poliQ takich jak HD i SCA-3, rolę transkryptów w patogenezie tych chorób oraz strategię terapeutyczne celowane na transkrypty poliQ takie jak terapie allelo-selektywne vs. nieallelo-selektywne, terapie z wykorzystaniem ASO, terapie wykorzystujące proces interferencyjnego RNAi oraz ich mechanizm działania. Wprowadzenie jest napisane zwięźle, ale zawiera wszystkie istotne treści do analizy przedstawionych prac.

W pierwszej z prezentowanych prac podjęto próbę dokładnego opisanie mechanizmu działania art-miRNA, czyli specyficznych oligonukleotydów celujących w ciąg powtórzeń CAG. Z powyższych oligonukleotydów najbardziej efektywnym okazał się działający allelo-selektywnie oligonukleotyd A2. Cząsteczki art-miRNA mają potencjał terapeutyczny poprzez

swoje miejsca wiązania w ORF. Ponadto udokumentowano, że istnieje różna efektywność działania art-miRNA na poszczególne transkrypty poliQ. Wykazano, że pomimo celowania w ten sam region mutacji (wydłużony ciąg CAG), art-miRNA ujawniały zróżnicowaną aktywność wyciszania dla różnych genów. Z tego powodu Doktorat podjął próbę określenia czynników, które decydują o tym dlaczego art-miRNA działają z różną efektywnością w zależności od celowanego transkrypty poliQ. Autor badał mechanizmu wyciszenia HTT w odpowiedzi na zastosowanie oligonukleotydu A2 na modelach dwóch linii komórkowych HEK Flp-In T-REx-293 z indukowalną doksycykliną ekspresją egzonu 1 HTT zawierającego ciąg 16 lub 98 powtórzeń CAG (nazywane „16 CAG” oraz „98 CAG”), które odpowiadają dzikiej i zmutowanej HTT, odpowiednio. Poziom ekspresji zmutowanego transkrypty HTT w linii 98 CAG spadł o ok. 50%, podczas gdy poziom transkrypty normalnego w linii 16 CAG obniżył się jedynie nieznacznie w wybranych punktach czasowych. Spadek poziomu białka w obu liniach był bardziej znaczący, a w dodatku poziom zmutowanego białka spadł jeszcze wyraźniej – o ok. 70%, podczas gdy poziom białka normalnego spadł o ok. 40%. Udokumentowano, że A2 znacząco obniżył poziom zmutowanego białka, podczas gdy poziom zmutowanego transkrypty pozostawał bez zmian co sugeruje to, że w opisanym przypadku allelo-selektywnej inhibicji zmutowanej HTT hamowanie translacji poprzedza proces rozpadu mRNA.

W kolejnym eksperymencie Doktorant badał deadenylację transkrypty wykazując, że A2 spowodowało nagłą deadenylację jedynie zmutowanego transkrypty zawierającego 98 CAG, co sugeruje istotną rolę deadenylacji w represji genów spowodowanej działaniem art-miRNA. Następnie Autor badał rolę AGO2 w mechanizmie działania art-miRNA poprzez określenie czy aktywność katalityczna AGO2, lub sama jego obecność, jest niezbędna do wyciszenia ekspresji genów za pomocą art-miRNA. Przeprowadzone doświadczenie udokumentowało, że art-miRNA A2 obniża ekspresję genów niezależnie od AGO2 i jego właściwości cięcia transkryptów. Reasumując art-miRNA celujące w wydłużone ciągi powtórzeń CAG powodują inhibicję translacji oraz gwałtowną deadenylację mRNA, co następnie prowadzi do degradacji transkrypty. W drugiej części publikacji analizowano natomiast dlaczego art-miRNA A2, mimo że celuje w wydłużone ciągi CAG, wykazuje zmienną efektywność działania w zależności od modelu choroby poliQ. Stwierdzono, że wpływ na to mogą mieć różne czynniki komórkowe, jak i cechy charakterystyczne konkretnych transkryptów poliQ takie jak np. niski poziom ekspresji 4 genów (HTT, ATN1, ATXN3 oraz ATXN7) w liniach fibroblastów wyprowadzonych od pacjentów ewentualnie lokalizacja ciągu powtórzeń lub specyficzna sekwencja otaczająca ciągi powtórzeń.

Kolejna praca jest publikacją poglądową, w której autorzy omawiają obecny stan wiedzy odnośnie zaburzeń alternatywnej poliadenylacji (APA) w chorobach spowodowanych ekspansją powtórzeń tandemowych, w tym w chorobach poliQ oraz wskazują kierunki dalszych badań. Zaburzenia APA są powiązane także z wieloma chorobami nowotworami. Autor opisał proces poliadenylacji i APA oraz metody i narzędzia pozwalających na predykcję i identyfikację miejsc APA. Omówił także implikacjach APA w chorobach poliQ, które spowodowane są wydłużeniem ciągu powtórzeń, złożonych sekwencji długości 3-12 nukleotydów oraz przeanalizował potencjalnymi perspektywami dalszych badań zagadnienia APA w choroby poliQ i możliwość wprowadzenia nowych terapii nacelowanych z APA.

W trzeciej pracy autorstwa Doktoranta i jego współpracowników analizowano metody oceny ilościowej zmutowanych białek w chorobach poliQ. Opracowano allelo-selektywną metodę określenia poziomu badanych alleli, w komórkach i tkankach nerwowych, które dotknięte są procesami patogennymi prowadzącymi do chorób poliQ. Autor zidentyfikował w wybranych ludzkich liniach komórkowych wyprowadzonych od pacjentów SCA3 i HD heterozygotyczne warianty SNP występujące w sekwencjach ATXN3 i HTT oraz analizował je w kontekście allelu WT lub MUT. W doświadczeniu posługiwał się metodą ddPCR. Materiał SCA3 użyty w pracy stanowiły linie komórkowe wyprowadzone od pacjenta: fibroblasty, indukowane pluripotente komórki macierzyste (ang. induced pluripotent stem cells, iPSC), neuralne komórki macierzyste (ang. neural stem cells, NSC) oraz neurony. W sekwencji ATXN3 powyższych komórek występuje 5 SNP pozwalających na odróżnienie obu alleli. W przeprowadzenia reakcji ddPCR autor zastosował ATXN3_SNP2 oraz ATXN3_SNP5. Analiza wyników ujawniła, że uzyskane stosunki procentowe WT/MUT w różnych powyższych typach komórek są do siebie zbliżone (ok. 54% WT/46% MUT). Wynik wykazały, że różnicowanie neuronalne wpływa z kolei na wzrost liczby transkryptów ATXN3 na komórkę. np stwierdził 54 transkryptów w neuronalnej komórce macierzystej vs 12 transkryptów w fibroblastach. W drugim etapie eksperymentu Autor badał linie komórkowe iPSC, NSC oraz neurony, pochodzące z linii wyprowadzonej od pacjenta z HD. Do reakcji ddPCR z pośród 7 typów SNP pozwalających na odróżnienie obu alleli wybrał HTT_SNP2, HTT_SNP5 oraz HTT_SNP7, (jedyne SNP skorelowanym z występowaniem mutacji HTT). W przeprowadzonym eksperymentcie wykazał, że różnicowanie neuronalne wpłynęło na zmianę stosunku ekspresji obu alleli. W komórkach wysoko zróżnicowanych spadła procentowa ekspresja allelu WT, podczas gdy procentowa ekspresja allelu MUT wzrosła. Natomiast odwrotnie niż w ATXN3 obserwowano mniejszą ilość na jedną komórkę transkryptów HTT w komórkach wysoko zróżnicowanych neuronalnych NSC vs indukowane pluripotente komórki macierzyste. Następnie badania przeprowadzono na myszach transgenicznym Hu 128/21 analizując 4

regiony mózgu pobrane od myszy 4 i 10 miesięcznych i wykazano, że poziom ekspresji transgenu WT HTT był wyższy u myszy 10- miesięcznych, niż u myszy 4-miesięcznych (poziom ekspresji MUT HTT był niższy). Doktorant udokumentował, że metodą jest ddPCR wraz analizą transkryptów SNP, pozwala precyzyjnie określić poziom ekspresji endogennych alleli WT i MUT, a różnicowanie neuronalne może wpływać zarówno na poziom ekspresji konkretnego allelu jak i na poziom ekspresji w ogóle. Ponadto, wiek myszy może wpływać na obserwowany poziom ekspresji obu alleli HTT. Powyższe metody mogą mieć zastosowanie do sprawdzenia ekspresji genów po zastosowaniu metod inżynierii genetycznej.

Podsumowując osiągnięcie naukowe mgr Pawła Joachimiaka można stwierdzić, że wszystkie składające się na nie 3 prace, w których Doktorant jest pierwszym lub trzecim autorem ze znacznym udziałem, mają istotne znaczenie naukowe. Wszystkie prace dotyczą tego samego tematu roli transkryptów HTT i ATXN3 w patogenezie i ewentualnie terapii chorób poliQ. Powstały w nawiązaniu do wcześniejszych doniesień innych autorów, odpowiadają na ważne pytania naukowe. Wszystkie zostały opublikowane w znaczących specjalistycznych czasopiśmie naukowych i uzupełniają światowe piśmiennictwo w poruszanych tematach. Przedstawione cykl 3 prac Doktoranta, odpowiadają w mojej opinii stawianym obecnie wymogom dla uzyskania stopnia naukowego doktora nauk biologicznych. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz.1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę –Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 56/2023/Internet z dnia 29 marca 2023r.) i wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Pawła Joachimiaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Ze względu na oryginalność tematu, rzetelną metodologię oraz bardzo interesujące poznawczo opracowanie wyników wnioskuje o wyróżnienie pracy.

Kierownik Katedry i Kliniki Neurologii
Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego
Monika Rudzińska-Bar
prof. dr hab. n. med. Monika Rudzińska-Bar