

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." Charakterystyka molekularna transkryptów *HTT* i *ATXN3* w kontekście ich roli w patogenezie i użycia jako cele w terapii chorób poliglutaminowych HD i SCA3"

Dla: Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne Instytutu Biochemii Chemii Bioorganicznej PAN

Doktorant: Pan mgr Paweł Joachimiak

Rozprawa dotyczy molekularnego podłoża chorób poliglutaminowych (poliQ), spowodowanych mutacjami dynamicznymi, z naciskiem na dwie najczęstsze, płasawicę Huntingtona (HD) i ataksję mózdkowo-rdzeniową typu 3 (SCA3). W zagadnieniach tych promotor rozprawy dr hab. Pani Agnieszka Fiszer posiada wieloletnie doświadczenie oraz osiągnięcia. Rozprawę doktorską Pan mgr Paweł Joachimiak wykonał, w kierowanym przez Panią Promotor Zakładzie Biotechnologii Medycznej. Została przedstawiona w formie 3 artykułów zaopatrzonych komentarzem, w tym dwóch artykułów oryginalnych. Doktorant jest pierwszym autorem jednego artykułu oryginalnego, oraz przeglądowego oraz drugim następnego artykułu oryginalnego.

Choroby poliglutaminowe dziedziczą się dominująco. Oznacza to, że jeden nieprawidłowy allel spośród dwóch obecnych w genomie jest wystarczający, by choroba rozwinęła się. Jeśli podejściem terapeutycznym miałyby być wyciszenie ekspresji nieprawidłowego allelu, biorąc pod uwagę ważne role białka HTT, konieczne jest selektywne wyciszenie allelu nieprawidłowego. Ważną sprawą jest również możliwość pomiaru poziomu ekspresji każdego z dwóch alleli, nieprawidłowego oraz typu dzikiego. Oba te zagadnienia zostały podjęte w niniejszej rozprawie.

PIERWSZY ARTYKUŁ ORYGINALNY został poświęcony selektywnemu wyciszaniu mRNA kodującego nieprawidłowe białko HTT, produkowane w formie skróconej która przeważa u

chorych. Doktorant badał mechanizm selektywnego wyciszania allelu nieprawidłowego. Zastosował sztucznie wyprodukowany art-miRNA zawierający niesparowania w stosunku do ciągu CAG. Efekt wyciszania pod wpływem art-miRNA porównywał z wyciszeniem siRNA, działającym odmiennie od miRNA, tj. poprzez cięcie AGO2, przy pełnej komplementarności z RNA docelowym. Skoro wyciszanie siRNA działa z podobną intensywnością w stosunku do obu alleli posłużyło jako układ kontrolny doświadczenia. Doktorant wypracował indukowany doksycykliną model HD - linię komórkową HEK - z wbudowanym nieprawidłowym allelem kodującym ekson 1 *HTT* zawierający 98 powtórzeń CAG oraz linię z allelem typu dzikiego zawierającym 16 powtórzeń, oba w fuzji z lucyferazą. Wyciszanie z zastosowaniem art-miRNA skutkowało obniżeniem poziomu białka fuzyjnego oraz RNA w allelu patologicznym, podczas gdy w allelu dzikim jedynie nieznacznie. Zgodnie z oczekiwaniem, w wyciszaniu siRNA różnicy nie zaobserwował. Ów sukces pozwolił mu pójść o krok dalej i sprawdzić jaki jest mechanizm selektywnego wyciszania allelu nieprawidłowego przez art-miRNA. Pokazał deadenyłację transkryptu nieprawidłowego oraz jej brak dla allelu typu dzikiego. Ponadto, obniżenie poziomu transkryptu pod wpływem art-miRNA było niezależne od obecności dzikiego białka AGO2 oraz białka AGO2 zmodyfikowanego, pozbawionego właściwości przecinania dupleksów RNA.

Bardzo ciekawa wydaje się sugestia o potencjalnym wpływie lokalizacji ciągu CAG w danym regionie mRNA - w ORF, regionie 5' lub 3'UTR - na selektywność wyciszania ekspresji przez miRNA. Ta kwestia pojawia się w artykule, w kontekście innych chorób poliglutaminowych, jednak w części w której Doktorant nie uczestniczył. W świetle tych rozważań bardzo interesujące byłoby przetestowanie używanego przez Doktoranta modelu, zmodyfikowanego w ten sposób, by ciąg CAG występował w 3'UTR *HTT*. Jak wyglądałaby wtedy selektywność wyciszania nieprawidłowego allelu w porównaniu z modelem przedstawionym w rozprawie?

W czasie obrony rozprawy doceniłabym krótkie omówienie przyczyn dla których według Autora wyciszanie art.-miRNA daje możliwość selektywnego wyciszenia allelu nieprawidłowego, w przeciwieństwie do wyciszania siRNA.

Ważną kwestią podniesioną w dyskusji jest zróżnicowana efektywność art-miRNA w wyciszaniu alleli nieprawidłowych, w różnych chorobach poliglutaminowych. Zastanawiam się na ile białka oddziałujące z RNA mogłyby mieć na to wpływ, np. konkurować z art-miRNA o interakcję z ciągami powtórzeń CAG i w ten sposób wpływać na efektywność działania art-miRNA.

W ARTYKULE PRZEGLĄDOWYM Doktorant przedyskutował bardzo interesujące zagadnienie regulacji ekspresji genu, a mianowicie proces poliadenylacji końców 3' mRNA oraz znaczenie wyboru alternatywnych miejsc poliadenylacji. W artykule zamieścił również wyniki bioinformatycznych analiz własnych dotyczących tego problemu. Opisał kilka metodologii eksperymentalnych tudzież bioinformatycznych służących do badania tych procesów. Powiązanie

z rozprawą było oczywiste ponieważ zagadnienie to w kontekście chorób uwarunkowanych mutacjami dynamicznymi jest bardzo istotne.

W DRUGIM ARTYKULE ORYGINALNYM, którego Doktorant jest pierwszym autorem, zostało podjęte ważne i interesujące zagadnienie nierównej ekspresji alleli danego genu. Myślę że to zagadnienie, choć dla zrozumienia relacji genotyp-fenotyp w różnych chorobach genetycznych bardzo istotne, nie jest zbyt często poddawane ocenie. Podjęcie tego zagadnienia w kontekście chorób poliglutaminowych było możliwe dzięki wypracowaniu przez Doktoranta metody pomiaru poziomu mRNA niezależnie dla allelu nieprawidłowego oraz typu dzikiego. Badania zostały wykonane dla mRNA *HTT* oraz ataksyny 3 (*ATX3*). W pierwszej części artykułu Doktorant przedstawił zastosowanie techniki kropek digital PCR (ddPCR) która, z racji zasad na których się opiera, daje możliwość rozróżnienia poziomu ekspresji obu alleli tych genów. Dla odróżnienia alleli kluczowa jest obecność SNPs. Zastosowanie tej metody w stosunku do transkryptów odpowiedzialnych za powyższe choroby poliglutaminowe pokazało odmienny poziom ekspresji każdego allelu w liniach komórkowych IPS wyprowadzonych z fibroblastów pacjentów. Okazało się, że proporcja pomiędzy ekspresją allelu typu dzikiego a nieprawidłowego była dynamiczna i zmieniała się w trakcie różnicowania komórek IPS do neuronów. Uwidoczniono to na przykładzie *HTT*, przy czym zaobserwowano wzrost ekspresji nieprawidłowego allelu *HTT* w stosunku do typu dzikiego. Zastanawiam się, czy to zjawisko mogłoby stanowić przynajmniej jeden z elementów będących u podstawy efektów mózgowych *HTT* i ich braku w innych tkankach.

Uwagi krytyczne:

1. W opisie celu pracy zabrakło zaznaczenia nowatorskości rozprawy tzn., na ile podjęte badania miałyby zwiększyć dotychczasową wiedzę.
2. Trudno napisanie pracy przeglądowej uważać za cel rozprawy, choć jej włączenie do rozprawy jest jak najbardziej uzasadnione.
3. Polski komentarz dotyczący pierwszego artykułu zaczyna się od zdania "Aspekt terapeutyczny w kontekście chorób poliQ był pierwszym zagadnieniem, nad którym pracowałem w trakcie swojego doktoratu". Otóż nie mam wrażenia by Doktorant pracował nad aspektem terapeutycznym, co oczywiście nie umniejsza wartości tych badań. Charakter badań był ściśle podstawowy, jak sam mówi, zmierzający do poznania mechanizmu selektywnego wyciszania *HTT* w odpowiedzi na zastosowanie art-miRNA.

Ten sam problem pojawił się w polskim streszczeniu artykułu: „W pierwszej kolejności podjąłem aspekt terapeutyczny, a konkretnie brałem udział w poznaniu mechanizmu prowadzącego do allelo-selektywnego wyciszania ekspresji zmutowanych genów poliQ”.

4. Czy sformułowanie „kinetyka deregulacji” nie jest w kontekście tego co zrobiono zbyt ścisłym pojęciem fizycznym? Wydaje się, że pojęcie „dynamika” byłoby bardziej adekwatne.

5. Rycina 4a: Schemat przedstawionych konstrukcji jest nieco mylący ponieważ nie pokazuje fuzji pomiędzy httexon1CAG a Nluc PEST.

6. W artykule pierwszym, w opisie konstrukcji kodującej 16 lub 98 CAG czytam: „First, we confirmed the similar expression of the reporters.” Jednak w Rycinie dodatkowej 5A w panelu prawym konstrukcja 98CAG ulega znacznie słabszej ekspresji niż ta z 16 CAG.

7. Nagłówek „osiągnięcia i wnioski” nie jest odpowiedni ponieważ są to dwie odrębne kategorie. Zresztą, wniosków brak a wymienione zostały jedynie osiągnięcia. Ta część rozprawy jest jedną ze słabszych polskiego omówienia.

8. Ponadto, wnioski, jeśli zostałyby zamieszczone, powinny nastąpić po dyskusji zamiast ją poprzedzać.

9. Polskie omówienie rozprawy w wielu miejscach zawiera niedopowiedzenia lub nadinterpretacje, co utrudniło mi podążanie za myślą Autora. np., „Ponadto, opisane podejście eksperymentalne zostało wykorzystane do oceny efektywności allelo-selektywnej strategii terapeutycznej dla chorób poliQ,” - brzmi jak gdyby była zastosowana u pacjentów.

10. Ponadto, sporo w nim niezręcznych sformułowań. Np., str. 13 Wstępu: „Jego rolą jest usuwanie niechcianych nukleotydów z puli komórkowej”. Może raczej toksycznych?

11. W polskim języku naukowym używa się pojęć „allel prawidłowy” lub „typu dzikiego”, podczas gdy „normalny”/”normal” znajduje zastosowanie w języku angielskim.

12. Lista skrótów jest cząstkowa. Ponadto, należy podać pełną nazwę, w miejscu w którym została użyta po raz pierwszy (np. ASO).

13. W polskim omówieniu sporo miejsca poświęca Doktorant opisowi metod wyciszania ekspresji HTT które nie są selektywne w stosunku do allelu patologicznego. Czy takie metody są jeszcze w użyciu skoro wiadomo, że białko HTT jest potrzebne? Być może zamieszczony opis ma charakter historyczny?

Wniosek końcowy

Pomimo uwag krytycznych rozprawę Pana mgr Pawła Joachimiaka przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Poza dostarczeniem nowej wiedzy rozprawa pokazuje niezwykle ciekawą perspektywę dalszych badań. Dlatego uważam ją za wartościową. 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 2023 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pana Pawła Joachimiaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

