



Prof. dr hab. Krzysztof Sobczak  
kierownik Zakładu Ekspresji Genów

Poznań, 13 września 2024

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Żanety Kalinowskiej-Pośki  
zatytułowanej „Opracowanie przedklinicznej strategii terapeutycznej choroby  
Huntingtona i ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 z wykorzystaniem wyciszających  
reagentów RNA celujących w powtórzenia CAG w transkryptach genów *HTT* i *ATXN3*”**

Niniejszą ocenę wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta przez Radę Naukową Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (IChB PAN). Oceny dokonałem według obowiązujących uregulowań prawnych na podstawie przekazanej mi rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska mgr Żanety Kalinowskiej-Pośki została wykonana w Zakładzie Neurobiologii Molekularnej IChB PAN pod opieką merytoryczną prof. dr hab. Macieja Figła, pełniącego funkcję promotora w przewodzie doktorskim oraz dr inż. Magdaleny Surdyki, pełniącej funkcję promotora pomocniczego. Wcześniejsze badania zespołu kierowanego przez pana profesora koncentrowały się na tworzeniu modeli mysich neurodegeneracyjnych chorób genetycznych człowieka związanych z ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych CAG. Mutacje te prowadzą najczęściej do powstania białek zawierających trakty poliglutaminowe (poliQ), stąd wspólna nazwa tej grupy chorób – choroby poliQ. Drugim wątkiem prowadzonych w zespole badań jest lepsze zrozumienie molekularnych i komórkowych mechanizmów prowadzących do rozwoju tych chorób. Zasadnym było więc podjęcie próby przetestowania strategii terapeutycznych tych chorób, wykorzystując dobrze poznane modele mysie dwóch chorób – choroby Huntingtona (HD) i ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 (SCA3). To zagadnienie stała się podstawą ocenianego projektu doktorskiego. Zaplanowane badania miały ukazać jakościowe i ilościowe zmiany w myszach poddanych działaniu narzędzi terapii genowej celujących bezpośrednio w zmutowane cząsteczki RNA, a bardziej precyzyjnie w trakt nadmiernie wydłużonych powtórzeń CAG w tych RNA. Patrząc zarówno z poznawczej jak i aplikacyjnej perspektywy pytania zadane w projekcie doktorskim są bardzo ważne.

Oceniana rozprawa składa się z trzech głównych części. Pierwszą stanowi wstęp omawiający istniejący dotąd stan wiedzy w zakresie tematyki projektu. Doktorantka opisuje w nim zarówno mechanizmy molekularne leżące u podstaw HD i SCA3, jak i dotychczas testowane strategie terapeutyczne celujące w zmutowane cząsteczki RNA. Przedstawia również modele mysie tych dwóch chorób, które zostały wykorzystane w przedstawionych w



rozprawie badaniach. Część ta choć krótka napisana jest w sposób kompetentny i informatywny. Problemem jednak jest forma opisu, która zawiera bardzo liczne literówki, oraz wiele błędów stylistycznych, określeń żargonowych i drobnych błędów merytorycznych. Poniżej zapisałem jedynie kilkanaście z nich:

- Tabela 1 „Choroby poliQ, ich lokalizacja w genie” – choroby nie są lokalizowane w genach;
- „prowadząc ostatecznie do powszechnego zaniku mózgu” – raczej do zmniejszania się masy mózgu;
- „systemu proteasomów ubikwityny (UPS)” – co to są proteasomy ubikwityny?
- na str. 25 napisano „pomijanie eksonu kodującego mutacje” – jak ekson może kodować mutację?
- na tej samej str. 25 napisano „Specyficzność alleli można podzielić na polimorfizm pojedynczego nukleotydu SNP” – czym jest specyficzność alleli? Ponadto w tym miejscu zdanie to nie jest potrzebne.
- „shRNA może być dostarczane do komórek za pomocą zmodyfikowanych wirusów” – shRNA może być produkowany w komórkach z transgenu powstałego po integracji genomów/DNA zmodyfikowanych wirusów.
- „siRNA następnie kieruje i wyrównuje kompleks RISC na docelowym mRNA” – a co siRNA wyrównuje?
- str.28 „Serotyp ten powstał poprzez ewolucja kapsydu AAV9 poprzez insercję aminokwasu heptameru w sekwencji kapsydu” – co to zdanie znaczy? Jaką sekwencję ma kapsyd i czym jest aminokwas heptameru?
- „Zaprojektowanie terapii celujące tylko w zmutowany gen, nie obniżając poziomu prawidłowego genu” - czym jest poziom genu? Pewnie miało być poziom ekspresji genu.
- na str. 28 napisano też, że „U dorosłych mysich osobników usunięcie genu Htt nie ujawniło negatywnego wpływu. Inaczej jest u myszy bez genu Atn3 (myszy z nokautem Atn3), nie zaobserwowano różnic na każdym etapie rozwoju.” Jeśli tak by było, to dlaczego terapia allelospecyficzna powinna być stosowana u osób chorych?
- „Trioriluzol działa poprzez modulację glutamin”. A co to znaczy?
- „ekspansja poliQ została naturalnie przyłączona przez insercje do genu” – jak się przyłącza oligopeptyd poliglutaminowy do genu?
- na str. 30/31 napisano, że w modelu Hu128Q/21Q zaobserwowano „selektywny zanik przedniego mózgu” – co to znaczy?



Ponadto, we wprowadzeniu zabrakło mi trochę przedstawienia koncepcji stosowania biwalentnych siRNA, które stanowiły jedną z grup testowanych narzędzi terapeutycznych.

Druga część rozprawy doktorskiej zawiera konkretnie nakreślone cele badań z uwzględnieniem zadań szczegółowych. Trzecim, najobszerniejszym elementem rozprawy jest drobiazgowy opis zasadniczej części pracy, rozpoczynający się przedstawieniem metodyki badawczej, a kończący się przedstawieniem i przedyskutowaniem uzyskanych wyników prowadzonych badań. Jest to tradycyjny układ pracy dyplomowej pozwalający na logiczne wprowadzanie poszczególnych treści. Ważnym jest również to, że na końcu Doktorantka przedstawia wnioski płynące z wykonanych eksperymentów, co dobrze podsumowuje całą pracę.

Doktorantka pisze, że część przedstawionych w rozprawie wyników jest opisanych w manuskrypcie pt. „CAG-targeted brain-permeable therapy tested in biallelic humanized polyQ mouse models” wysłanym do recenzji do czasopisma naukowego. W tej pracy jest dwóch współautorów oznaczonych gwiazdką, która jak wnioskuję określa tzw. pierwsze współautorstwo oraz 10 innych współautorów. Chciałbym się zatem upewnić, że wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej pokazują eksperymenty, które wykonała i przeanalizowała Doktorantka, a zatem, że oceniam wkład autorski. Proszę o odniesienie się do tej wątpliwości podczas publicznej obrony.

Celem pierwszej części realizowanych w projekcie doktorskim badań było skonstruowanie wektorów wirusowych do nadekspresji shRNA skierowanych na sekwencje powtórzeń CAG. Konstrukty te zawierały również kasetę do niezależnej nadekspresji GFP celem monitorowania efektywności transdukcji w warunkach *in vivo*. Istotnym nowum ocenianej pracy było zastosowanie wektorów AAV o serotypie AAV-PHP.eB, które podawano systemowo poprzez wstrzyknięcie do zatoki oczodołowej, zamiast podawania bezpośrednio do centralnego układu nerwowego. Oczekiwany rezultatem badań było wywołanie obniżenia ekspresji zmutowanych genów odpowiedzialnych za HD i SCA3, jednocześnie przy jak najmniejszym efekcie niepożądanym, czy to na ekspresję innych genów, czy wywołanie odpowiedzi niespecyficznego na obecność shRNA.

W pilotowym eksperymencie Doktorantka przetestowała efekt wprowadzania AAV zawierających jedną z dziewięciu kaset do nadekspresji shRNA podawanych do heterozygotycznych myszy bitransgenicznym, eksprymujących zarówno prawidłową jak i zmutowaną postać ludzkiej huntingtyny (mysz Hu128Q/21Q). Monitorując poziom ekspresji GFP zaobserwowano efektywną transdukcję w opuszce węchowej, wzgórzu, mózdzku i pniu mózgu zarówno po trzech jak i 15 tygodniach od podania wektorów AAV-PHP.eB. Dla kilku shRNA, w eksperymencie krótkotrwałym (3 tygodnie od iniekcji), wykazano wyciszający efekt



na poziom białka prawidłowej i zmutowanej huntingtyny (HTT). Ciekawym jednak jest to, że np. reagent o nazwie A4 stymuluje ubytek obu białek w korze, ale nie w prążkowie i wzgórzu. Podobnie A4(P10,11A), ale z inną preferencją do testowanych regionów mózgu (Rys. 6). Na tym rysunku, ale też wielu innych nie wyjaśniono co oznacza jedna lub dwie gwiazdki, oraz dlaczego te same reagenty oznaczone są w inny sposób i umieszczone są w odmiennej kolejności na panelach A, B i C. To bardzo utrudnia analizę przedstawianych wyników. Analizując wyniki przedstawione na Rys. 6, ale również na wielu dalszych rycinach nie zauważyłem, czy w analizie statystycznej zastosowano odpowiednią korektę znoszącą efekt wielokrotnych porównań (np. poprawka Bonferroniego lub inna odpowiednia dla rodzaju wykonywanych porównań).

W eksperymencie długoterminowym (15 tygodni od iniekcji wektorów AAV) zaobserwowano ponownie wyższy poziom fluorescencji GFP w trzech obszarach mózgu – opuszka węchowa, wzgórze mózdzek i pień mózgu – chociaż nie przedstawiono tej różnicy w wymiarze ilościowym i statystycznym. Na rysunku 8 przedstawione są bowiem pojedyncze obrazy dla odpowiednich struktur. Nie jest zatem jasnym to, co oznacza w tym przypadku N=3, oraz czy wykonano porównawczą analizę ilościową w wymiarze statystycznym? W eksperymencie tym wykazano również nieznaczący, choć istotny statystycznie ubytek mRNA HTT w mózgu myszy poddanych działaniu A4(P10,11A). Z kolei stosując metodę western blotting preparatów białkowych wyizolowanych z różnych obszarów mózgu oraz immunobarwienie skrawków mózgu podjęto próbę określenia efektu dwóch testowanych shRNA na poziom prawidłowego i zmutowanego białka HTT. Niestety w tej części pojawiły się liczne, istotne błędy logiczne. Na str. 69, ale również w kilkunastu innych miejscach pracy sformułowano nieprawidłowe konkluzje wywodzone z wyników przeprowadzonych badań. Napisano tu, że „Iniekcje reagentem A4(P10,11A) wykazały obniżenie poziomu zmutowanego HTT we wzgórzu o 32%, w mózdzku o 11% (w obydwóch przypadkach nieistotne statystycznie) ...”. Jeśli nie wykazano, że różnice są istotne statystycznie, to należy powiedzieć, że różnic pomiędzy porównywanymi próbkami nie stwierdzono, a już na pewno nie można podawać wymiaru ilościowego. Z własnej interpretacji przedstawionych wyników mogę stwierdzić, że podanie AAV z kasetą shRNA A4(P10A) spowodowało istotny ubytek zmutowanej i w równym stopniu prawidłowej huntingtyny, czego nie można powiedzieć o A4(P10,11A). Rodzi się zatem następujące pytanie – jeśli stosowane reagenty shRNA mają działać na obniżenie efektywności translacji to jak wytłumaczyć efekt na poziom mRNA? Chciałbym zatem prosić Doktorantkę o próbę wyjaśnienia rozbieżności pomiędzy wynikami uzyskanymi dla pomiarów poziomu mRNA oraz zmutowanego i prawidłowego białka HTT – shRNA A4(P10,11A) wykazuje efekt na mRNA, a A4(P10A) na białko z obu alleli. Jaka może być interpretacja występowania tych różnic?



Inny problem widzę w interpretacji wyników przedstawionych na Rysunku 12, dotyczących liczebności/wielkości agregatów białka HTT wizualizowanych przez immunobarwienie. Czy na pewno zawsze obrazy te przedstawiają agregaty, jak mówią opisy wykresów, a nie po prostu sygnał od huntingtyny. Z samego obrazu mikroskopowego przedstawionego w pracy dla mózdzku ja agregatów nie widzę. Agregat nie może być przecież większy niż komórka, a takie sygnały widać na przedstawionych w pracy obrazach. Może to jedynie kwestia jakości obrazów w wersji pdf pracy. Zastanawiające również jest to, że sygnał immunobarwienia zajmuje blisko 5% obrazów mikroskopowych. Ponadto w opisie ryciny nie wyjaśniono czym są poszczególne punkty na wykresie – rozumiem, że nie preparaty z niezależnych eksperymentów biologicznych, ponieważ  $N=3$ . Nie przedstawiono również co było kontrolą negatywną w eksperymentach immunobarwienia, pozwalającą na wykazanie specyficzności stosowanego przeciwciała.

Dalsze analizy, polegające na określeniu efektu testowanych shRNA na szerzej monitorowany fenotyp, są cennym uzupełnieniem obserwacji dotyczących markerów molekularnych HD w mózgu. Zaobserwowano wiele różnic pomiędzy myszami traktowanymi kontrolnymi i badanymi AAV, w tym masy ciała i masy niektórych organów. W pracy napisano, że „Po 15 tygodniach od operacji myszy z reagentem A4(P10A) ważyły o 22% mniej niż myszy z reagentem kontrolnym ... (Rys. 13A)”. Jednak dla tego stwierdzenia nie widzę wyników wspierających – prawdopodobnie dlatego, że na wykresie nie przedstawiono odpowiednich miar statystycznych.

Dla tych samych dwóch shRNA przetestowano efekt ich działania również w mysim modelu SCA3, o nazwie Ki150Q/21Q, oceniając poziom docelowego mRNA i białek powstających z prawidłowego i zmutowanego transgenu *ATXN3*. Analizy przeprowadzono w sposób analogiczny do opisanych powyżej dla modelu mysiego HD. Dla jednego reagenta (A4(P10,11a)) zaobserwowano istotny wzrost ekspresji mRNA *ATXN3* w trzech z czterech testowanych obszarach mózgu o około 50% względem myszy traktowanych reagentem Scrambled. Stwierdzenia sformułowane w pracy są jednak nie do końca prawidłowe w kontekście przedstawionych na wykresach wyników. Doktorantka pisze, że „Myszy z reagentem A4(P10,11A) wykazały większy wzrost ekspresji badanego genu niż myszy z A4(P10A)”. Dla drugiego z wymienionych reagentów nie wykazano przecież żadnych istotnych zmian. Ciekawym jest to, że wyniki analiz ekspresji transgenów na poziomie mRNA i białka obserwowane dla modelu mysiego SCA3 są niemal całkowicie przeciwstawne w porównaniu do modelu HD. Dla pomiarów poziomu zmutowanego białka Ataksyny-3 metodą western blot właściwie nie stwierdzono większych zmian (wyjątek A4(P10A) w hipokampie), chociaż ponownie błędnie zapisano w pracy, że „Obydwa reagenty spowodowały spadek zmutowanego białka *ATXN3* w mózdzku o 26% po wstrzyknięciu A4(P10A) i 17% po wstrzyknięciu A4(P10,11A)”. Zastanawiający jest również ubytek % agregatów ataksyny-3



barwionej przeciwciałem 1H9 (Rys. 18), przy braku zmiany poziomu białka zmutowanego ATXN3 w pniu mózgu widzianym metodą western blot (Rys. 16A). Jak można interpretować taki wynik? Ponadto ciekawym jest fakt wzrostu poziomu mRNA ATXN3 po podaniu A4(P10,11A) i braku różnic (lub spadku w mózdzku) białka z obu alleli. Czy mogłaby Doktorantka przedstawić próby wyjaśnienia tych wyników?

Najciekawsze moim zdaniem i najbardziej jednoznaczne wyniki przyniosły eksperymenty opisane w ostatniej części pracy. W badaniach tych zastosowano biwalentne cząsteczki siRNA – połączone kowalencyjnie dwa dupлексы RNA wcześniej badane w pracy. Lokalne wstrzyknięcie syntetycznych reagentów w dawce 25 mikrogramów/mysz HD poskutkowało silnym obniżeniem poziomu prawidłowej huntingtyny dla obu testowanych reagentów, a dla Biv A4(P10A) również zmutowanej huntingtyny. Dotyczyło to jednak jedynie miejsca wstrzyknięcia (prążkowie). Podobny efekt zaobserwowano również dla ataksyny-3 w modelu SCA3, choć efekt wyciszenia był istotnie mniejszy. Wydaje się, że ta część pracy może stanowić cenny punkt wyjścia do dalszych badań.

Dyskusja przedstawiona w rozprawie jest obszerna i porusza wiele istotnych wątków w kontekście wyników uzyskanych w projekcie doktorskim. Poruszony jest między innymi ważny wątek efektów niepożądanych działania reagentów shRNA lub biwalentnych. Wydaje się zatem, że wartym byłoby sprawdzenie, czy faktycznie testowane cząsteczki nie wywierają tzw. efektu off-target. Jeśli dochodzi do podwyższenia lub obniżenia poziomu prawidłowych mRNA HTT lub ATXN3 to należy uważać, że inne mRNA zawierające ciągi powtórzeń CAG są również niepożądanymi celami działania shRNA. Można by sprawdzić chociaż kilka takich mRNA/białek. Oczywiście optymalnym byłoby wykazanie zmian na poziomie całotranskryptomowym/proteomowym.

W dyskusji pojawiły się błędy merytoryczne, które przykładowo wymieniam z obowiązku recenzenta.

- Napisano na przykład, że „obniżanie poziomu zmutowanych białek z wykorzystaniem tych krótkich RNA odbywa się na drodze aktywacji różnych mechanizmów m.in. związanych z RNazą H, ...”. W jaki sposób RNazaH może być aktywowana przez krótkie terapeutyczne RNA?
- W innym miejscu napisano o „transdukcji cząsteczek biwalentnych” – w jaki sposób można transdukować cząsteczki biwalentne?
- Jeszcze w innym miejscu napisano o włóknach „zawierających lipidowe błony mielinowe” – czym są błony mielinowe włókien? Pewnie chodziło o ostonki mielinowe.
- oraz o „allelach z prawidłową i zwiększoną liczbą ludzkich powtórzeń CAG” – czym są ludzkie powtórzenia CAG?



Podsumowując chciałbym stwierdzić, że praca doktorska jest obszerna, a wykonane eksperymenty i analizy są liczne, w większości dobrze ilustrowane. Widoczny jest spory nakład pracy Doktorantki w zaprojektowanie, przeprowadzenie i interpretację uzyskanych wyników. Wartym podkreślenia jest to, że w swoich badaniach Doktorantka zastosowała szereg metod i podejść analitycznych – zaprojektowanie i przygotowanie konstruktów AAV, analiza ilościowa poziomu RNA i białka, przygotowanie skrawków z tkanek oraz analiza ilościowa i jakościowa w oparciu o bezpośrednią detekcję znakowanych oligomerów lub GFP oraz wykonanie immunobarwienia. Co ważne praca odpowiada na kilka istotnych pytań odnośnie potencjalnych strategii terapeutycznych chorób powodowanych ekspansją powtórzeń CAG. W większości jest napisana w sposób czytelny, a narracja prowadzona w znacznej części w logiczny sposób. Wskazane powyżej uchybienia, wątpliwości interpretacyjne i błędy merytoryczne wpływają niestety w istotny sposób na całkowitą ocenę pracy, która w związku z tym nie może być wysoka, ale pozytywna.

### Wnioski końcowe

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa mgr Żanety Kalinowskiej-Pośki spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 2021 r., poz. 478, 619, 1630). Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodniła, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń oraz w sporej części poprawną interpretację ich wyników. Chcąc jak najlepiej zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zaplanowała logiczny ciąg poszczególnych etapów badań. Pokazała, że potrafi w sposób kompetentny skorzystać z rozmaitych narzędzi badawczych. Uzyskała istotne wyniki, w większości poprawnie je opisała i zazwyczaj wyciągała uprawnione wnioski. Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Żanety Kalinowskiej-Pośki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Krzysztof Sobczak