



Poznań, 17.07.2025 r.

Prof. UPP dr hab. inż. Ewa Stępnia-Konieczna
Kierownik Zespołu Biologii RNA
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Tel +48 61 848 6244

ewa.stepniak-konieczna@up.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marianny Pewińskiej-Kołodziejczak
pt. „Opracowanie nowych wariantów sztucznych mikroRNA do selektywnego obniżania
poziomu zmutowanego białka w podejściu terapeutycznym dla choroby Huntingtona”

Rozprawę doktorską przygotowano pod opieką promotorską Pani Prof. dr hab. Marty Olejniczak w Zakładzie Inżynierii Genomowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN. Doktorantka uzyskała środki finansowe w ramach projektu Preludium Bis z Narodowego Centrum Nauki, przyznanego Pani Promotor. Badania częściowo sfinansowała firma Dystrogen Gene Therapies Inc. W skład dorobku naukowego Doktorantki wchodzi dwie publikacje w prestiżowych czasopismach naukowych, niebędące częścią rozprawy doktorskiej. W szczególności, praca eksperymentalna opublikowana w *Molecular Therapy Nucleic Acids*, w której Doktorantka jest trzecią z siedmiu współautorów, stanowi w zasadzie punkt wyjścia dla problematyki badawczej podjętej w rozprawie. Wykazano w niej potencjał terapeutyczny cząsteczki sztucznego mikroRNA (amiRNA), amiR136-A2, ukierunkowanej na wydłużony ciąg powtórzeń CAG leżący u podstaw choroby Huntingtona (HD).

I. Oryginalność i wartość naukowa badań

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy opracowania podstaw molekularnych dla nowatorskiej terapii Choroby Huntingtona (HD) bazującej na selektywnym obniżeniu poziomu zmutowanego białka z wykorzystaniem amiRNA. Dokładniej, dotyczy optymalizacji cząsteczki terapeutycznej opracowanej wcześniej w laboratorium Pani Prof. dr hab. Marty Olejniczak. Podjęta problematyka jest istotna w świetle braku skutecznej terapii dla HD - rzadkiej choroby neurodegeneracyjnej związanej z poliglutaminami (poliQ), której objawy wynikają głównie z postępującej dysfunkcji i obumierania neuronów prążkowania i kory mózgowej. Podstawą genetyczną HD jest ekspansja trójnukleotydowego powtórzenia CAG w pierwszym eksonie genu kodującego białko huntingtynę (HTT). Na wielopłaszczyznową patogenezę HD wpływa nie tyle utrata kluczowych funkcji HTT, co nabycie nowych szkodliwych funkcji przez jego nieprawidłową formę. Ważną rolę odgrywa też alternatywna poliadenylacja prowadząca do translacji krótkiego białka HTT1a, które tworzy toksyczne agregaty w komórkach. Ponieważ huntingtyna jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórek, szczególnie neuronów, kluczowym jest, aby potencjalny terapeutyk wykazywał allelo-selektywność w kierunku zmutowanego transkryptu *HTT*, nie naruszając prawidłowego. Istotne jest również



utrzymanie odpowiedniej efektywności i wysokiej specyficzności przy jednoczesnym zminimalizowaniu ryzyka efektów ubocznych. Najbardziej obiecujące strategie terapeutyczne wykorzystują interferencję RNA (RNAi) aby zahamować działanie zmutowanego genu poprzez degradację mRNA bądź blokowanie translacji. Zaletą amiRNA względem innych efektorów RNAi jest ich włączanie się w szlak biogenezy mikroRNA (miRNA) na najwcześniejszym etapie i mniejsze ryzyko toksyczności dzięki niższej saturacji endogennej maszynerii przetwarzania miRNA. Wcześniej opracowana w Zakładzie Inżynierii Genomowej cząsteczka terapeutyczna amiRNA celująca w powtórzenia CAG, amiR136-A2, opisana w ww. publikacji współtworzonej przez Doktorantkę, charakteryzowała się niesparowaniem w pozycji 8 nici wiodącej. Pomimo efektywnej redukcji zmutowanego białka HTT oraz allelo-selektywności, wykazywała niższą aktywność w korze mózgu i posiadała w pełni komplementarne sekwencje poza celem, stwarzając ryzyko efektów niepożądanych. Warto zaznaczyć, że transkrypty o pełnej komplementarności do cząsteczki A2 (szczególnie w 3'UTR) mogą być degradowane przez mechanizm podobny do działania siRNA. Badania ujęte w rozprawie doktorskiej są naturalną kontynuacją tej pracy i odpowiedzią na potrzebę optymalizacji tej cząsteczki. Doktorantka precyzyjnie sformułowała cel rozprawy: zaprojektowanie ulepszonej i bezpieczniejszej wersji cząsteczki amiR136-A2 oraz zweryfikowanie jej efektywności, specyficzności, allelo-selektywności i bezpieczeństwa w modelach komórkowych HD oraz w mysim modelu choroby. Do jego realizacji wybrała odpowiednią i bardzo zróżnicowaną metodologię.

Badania wyodrębniają kilka części obejmujących kolejno: analizy bioinformatyczne *in silico*, testy komórkowe zaprojektowanych cząsteczek oraz ich walidację *in vivo* w mysim modelu HD. W szeregu analiz *in silico* Doktorantka optymalizowała sekwencję efektorową wyjściowej cząsteczki A2 umieszczając w niej dodatkowe niesparowania w różnych pozycjach nici wiodącej. Spośród pięciu zaprojektowanych wariantów sekwencji, najniższą liczbę potencjalnych sekwencji poza celem (off-target) wykazała dla wariantu nazwanego 13A (substytucja C>A w pozycji 13).

Kolejno, Doktorantka wykorzystała system reporterowy lucyferazy z sekwencją eksonu 1 *HTT* niosącą krótkie lub wydłużone powtórzeniami CAG, aby wstępnie ocenić efektywność i allelo-selektywność zaprojektowanych sekwencji w wyciszaniu ekspresji zmutowanego allelu, w uproszczonym formacie shRNA. Dzięki temu wykazała preferencję zaprojektowanych sekwencji wobec allelu zmutowanego, przy jednoczesnej największej selektywności i efektywności względem A2 dla trzech cząsteczek, w tym 13A. Konsekwentnie, wyniki zweryfikowała w naturalnym, fizjologicznym modelu fibroblastów HD stosując transdukcję lentiwirusami niosącymi badane cząsteczki w wersji shRNA i uzyskując bardzo spójne rezultaty. Analogiczne eksperymenty lucyferazowe przeprowadziła dla trzech najbardziej efektywnych wyselekcjonowanych sekwencji, które tym razem umieściła w kadłubie ludzkiego pri-miR-136, aby stworzyć docelowe cząsteczki amiRNA. Najwyższy stopień wyciszenia allelu zmutowanego zaobserwowała dla amiR136-13A, co konsekwentnie zweryfikowała transdukcją lentiwirusową dwóch niezależnych, naturalnych modeli komórkowych chorób poliQ – HD oraz DRPLA. Cząsteczka amiR136-13A nie była jednak efektywna w modelu SCA3, świadcząc przeciwko uniwersalności względem szerszego zakresu chorób poliQ. Podsumowując, w tej części pracy Doktorantka metodą eliminacji wyłoniła z pięciu zaprojektowanych przez siebie modyfikacji sekwencji tylko jedną, 13A, którą wybrała do dalszych analiz w kontekście sztucznego mikroRNA. Wyniki tej części są dobrze udokumentowane, a uzasadnienie wyboru modyfikacji 13A jest oparte na solidnych analizach.



Ważnym etapem badań były analizy transkryptomiczne potencjalnych efektów niespecyficznych, prowadzone przez Doktorantkę w fizjologicznie odpowiednim modelu - ludzkich prekursorach neuronalnych HD (NSC HD) transdukowanych lentiwirusami amiR136-13A. Oprócz markerów różnicowania, można było dodatkowo zastosować szerszą analizę mikroskopową połączoną z immunofluorescencją, by bezsprzecznie potwierdzić tożsamość i czystość NSC różnicowanych z iPSC. Mimo iż ogólne zmiany w profilu ekspresji genów były niewielkie, Doktorantka odnotowała istotne zmiany ekspresji ponad setki genów związanych głównie z procesami przebudowy i organizacji chromatyny. Trudno przewidzieć długoterminowe konsekwencje takich zmian, dlatego wniosek, że profil bezpieczeństwa cząsteczki jest korzystny, wydaje się tu przedwczesny. Wprawdzie wykazano, że sama transdukcja lentiwirusowa prowadzi do istotnych zmian transkryptomicznych NSC HD, jednakże zmiany te nie do końca pokrywały się z tymi obserwowanymi po dostarczeniu amiR136-13A. Nie zastosowano tutaj bezpośredniej analizy porównawczej z amiR136-A2, co byłoby korzystne. Co istotne jednak, wykazano, że amiR136-13A allelo-selektywnie redukuje ilość zmutowanego białka w NSC HD oraz częściowo odwraca profil deregulowanych genów w kierunku poziomów ekspresji typowych dla komórek zdrowych. Kolejno, Doktorantka metodami inżynierii genetycznej stworzyła model komórkowy umożliwiający indukowalną ekspresję patologicznej skróconej formy białka HTT (HTT1a) i wykazała efektywność amiR136-13A również w jego redukcji. Tu także można było zastosować porównanie z amiR136-A2. Niemniej jednak, te rezultaty spójnie potwierdzają znaczny potencjał terapeutyczny zoptymalizowanej cząsteczki amiR136-13A.

Bardzo cenna jest analiza obróbki komórkowej amiR136-13A przez maszynę RNAi na podstawie sekwencjonowania NGS. Dlaczego jednak wybrano model komórkowy HEK293T, a nie bardziej odpowiedni fizjologicznie np. fibroblasty HD lub linię NSC HD? Linie te mogą różnić się ekspresją poszczególnych komponentów szlaku biogenezy miRNA a więc i obróbką cząsteczki amiR136-13A. Co istotne, analiza wykazała znaczny udział nici wiodącej oraz niski poziom ekspresji 13A w stosunku do całościowej puli komórkowych miRNA, sugerując niskie ryzyko wysycenia endogennego szlaku RNAi.

W ostatnim, kluczowym etapie badań *in vivo*, Doktorantka zweryfikowała efektywność oraz bezpieczeństwo zaprojektowanej cząsteczki amiR136-13A w ugruntowanym mysim modelu HD – transgenicznej myszy YAC128. Przeprowadziła krótko- oraz długoterminowe eksperymenty z użyciem niskiej i wysokiej dawki amiR136-13A podawanej do prądkowia przez iniekcję wektora AAV5 o wysokim tropizmie do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Wyniki potwierdziły wyraźną preferencję amiR136-13A względem obniżenia zmutowanej formy białka HTT, wskazując na osiągnięcie jednego z założonych celów jakim była allelo-selektywność. Potwierdziły również porównywalny efekt terapeutyczny do wyjściowej cząsteczki A2, ale przy zastosowaniu dawki wektora o połowę niższej, co sugeruje znacznie większą efektywność. Co istotne, analizując markery progresji HD pod względem procesów neurodegeneracyjnych, Doktorantka wykazała brak odpowiedzi zapalnej w OUN badanych myszy pod wpływem miRNA136-13A.

Jednakże, analiza potencjalnych efektów niespecyficznych w prądkowiu myszy eksperymentalnych wskazała 9 genów z pojedynczym niesparowaniem do uwalnianych wariantów nici wiodącej cząsteczki 13A. Przedstawione wyniki walidujące (RT-qPCR) wykazały znaczny rozrzut wartości, z tendencją do obniżania ekspresji tych genów po iniekcji amiR136-



13A, choć nieistotną statystycznie. Chociaż pojedyncze niesparowanie nie zawsze prowadzi do degradacji mRNA, może potencjalnie hamować translację, zwłaszcza gdy znajduje się w regionie „seed”. Doktorantka nie wskazała, w której pozycji znajdują się niesparowania w przypadku zidentyfikowanych genów, nie przeprowadziła też analizy poziomu białek kodowanych przez te geny. Przeprowadziła natomiast analizę obróbki mir136-13A w prądkowiu, uzyskując wyniki spójne z rezultatami w modelu HEK293T. Wykazano, że procentowy udział uwalnianych wariantów nici pasażerskiej jest niewielki, ale to nie eliminuje całkowicie możliwości niespecyficznego efektu nici pasażerskiej. Mimo, iż prawdopodobieństwo wydaje się znikome, analiza sekwencji off-target dla nici pasażerskiej (np. potencjalny wpływ na sekwencje zawierające powtórzenia CUG) byłaby ciekawa. Podsumowując, wszystkie założone przez Doktorantkę cele badawcze zostały osiągnięte. Pomimo kilku uwag krytycznych, które wypunktowałam poniżej, **rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko pod względem oryginalności i wartości naukowej badań.**

II. Uwagi krytyczne (podsumowanie)

1) Wyniki, punkt 4.3. – analiza efektów niespecyficzných w modelu NSC HD. Czy dane transkryptomiczne wskazujące na deregulację genów związanych z procesami przebudowy i organizacji chromatyny nie budzą obaw co do długoterminowych efektów terapii z wykorzystaniem amiR136-13A? Tym bardziej, że zmiany te nie wynikają raczej z samej transdukcji lentiwirusowej (nie pokrywają się z tymi, które wykazała różnicowa analiza ekspresji genów pomiędzy NSC HD transdukowanymi lentiwirusami kontrolnymi a komórkami nietraktowanymi; rysunki 22 i 23). Dodatkowo, jako potencjalnie ważny off-target amiR136-13A wskazano gen *SRP14* (rysunek 22) - dlaczego nie zwalidowano jego ekspresji na poziomie mRNA (RT-qPCR) i białka (western blot)? Dwa inne deregulowane geny są wyróżnione na rysunku 22, ale w żaden sposób nie dyskutowane.

2) Wyniki, punkt 6. – obróbka komórkowa oraz uwalnianie wariantów amiR136-13A w modelu HEK293T. Biorąc pod uwagę odmienną obróbkę prekursorów miRNA w zależności od typu komórki i tkanki, dlaczego wybrano linię HEK293T zamiast bardziej odpowiedniego pod względem fizjologicznym modelu np. fibroblastów HD lub NSC HD?

3) Wyniki, punkt 7.5., Tabela 26 – analiza efektów niespecyficzných *in vivo* w prądkowiu myszy dla genów zawierających sekwencję z pojedynczym niesparowaniem do uwalnianych wariantów nici wiodącej cząsteczki 13A. amiRNA może blokować translację w przypadku niepełnej komplementarności, bez wpływu na poziom samego transkryptu. Czy ekspresję potencjalnych genów „off-target” zweryfikowano na poziomie białka, czy jedynie na poziomie RNA (Rysunek 34)? Czy rozważano analogiczną analizę dla uwalnianych wariantów nici pasażerskiej (potencjalny wpływ na sekwencje zawierające powtórzenia CUG)?

4) Wyniki, punkt 7.7. – obróbka komórkowa oraz uwalnianie wariantów amiR136-13A *in vivo* w prądkowiu myszy. Czy spodziewano by się znacznych różnic w obróbce amiR136-13A w innych częściach mózgu niż prądkowie (kora, hipokamp)? Czy ekspresja komponentów maszynery biogenezy miRNA różni się w tych obszarach mózgu? Czy rozważono immunoprecypitację AGO, aby zweryfikować udział nici dla cząsteczki 13A?

5) Dane literaturowe wskazują, że większość ludzkich miRNA wiąże się ze wszystkimi czterema AGO i nie wykazuje preferencji co do konkretnego paralogu. Które z genów AGO są najwyżej



ekspresjonowane w badanych tkankach mózgowych? Czy możliwe jest, że tylko białka AGO bez zdolności cięcia katalitycznego uczestniczą mechanistycznie w inhibicji translacji *HTT* przez amiR136-13A? W pracy nie zweryfikowano poziomu transkryptów *HTT* z allelu zmutowanego i normalnego, po zastosowaniu amiR136-13A (testy lucyferazowe nie dają bezpośredniej odpowiedzi, czy redukcja aktywności reportera zachodzi na poziomie blokowania translacji czy degradacji transkryptu przez cząsteczkę 13A).

6) Proszę o komentarz odnośnie bezpieczeństwa potencjalnej terapii pacjentów opartej o wektory AAV5. Mam na myśli nie tyle skutki niepożądane, co efektywność i ogromną inwazyjność metody dostarczania. Czy rozważano testowanie innego serotypu wirusa AAV wykazującego tropizm do OUN? Dla przykładu AAV9, który wykazuje wysoki tropizm do OUN i przekracza barierę krew-mózg? Czy taki wektor mógłby być efektywnie dostarczany systemicznie w sposób mniej inwazyjny – dożylnie?

III. Wartość merytoryczna rozprawy oraz jej poprawność redakcyjna

Układ dysertacji jest logicznie uporządkowany, o standardowej strukturze. Rozprawę poprzedza informację o dwóch publikacjach współautorskich niebędących częścią rozprawy, ale stanowiących istotny dorobek naukowy. Ponieważ tematyka podjęta w tych pracach jest spójna z problematyką badawczą rozprawy, a jedna z tych publikacji stanowi wręcz podstawę projektu doktorskiego, korzystnym byłoby umieszczenie krótkiego opisu. Rozprawa zawiera szczegółowy spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów.

Dysertacja zawiera osiem rozdziałów. *Wprowadzenie* podzielono na części dotyczące HD, interferencji RNA (RNAi) oraz terapii HD wykorzystujących m.in. narzędzia technologii RNAi. Jest to bardzo dobra podstawa teoretyczna, w skondensowany sposób nakreślająca kluczowe aspekty patogenezы HD. Na uwagę zasługuje synteza kluczowych informacji o szlakach biogenezy miRNA, porównanie różnych narzędzi RNAi oraz przegląd dostępnych opcji terapeutycznych HD z uwzględnieniem aktualnych badań klinicznych. Całość *Wprowadzenia* jest ciekawa i opatrzona adekwatnymi rysunkami i tabelami, świadcząc o solidnym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. *Cel pracy* jest precyzyjnie sformułowany. Wyodrębnia analizę *in silico* oraz część eksperymentalną w modelach komórkowych oraz w mysim modelu HD. *Materiały i metody* trafnie dobrano względem postawionych celów i zebrano w podrozdziały ułożone spójnie z kolejnością prowadzonych analiz. Choć rozdzielanie metodologii na osobne *materiały* i *metody* jest poprawne redakcyjnie, dla przejrzystości korzystniej byłoby połączyć je we wspólnym opisie zgodnie z kolejnością prowadzonych eksperymentów, analogicznie do publikacji naukowych. W *Wynikach* wyraźnie wyodrębnia się część bioinformatyczna oraz eksperymentalna. Ta ostatnia obejmuje badania komórkowe oraz *in vivo* i w obu przypadkach jest logicznie ułożona względem prowadzonych analiz efektywności, allelo-selektywności, efektów niespecyficznych oraz obróbki komórkowej amiRNA. Kolejność ta utrzymana jest w *Dyskusji*, za którą podążają wypunktowane *Wnioski*. Dyskusja zestawia badania z postawionymi celami oraz sformułowanymi wnioskami i prezentuje ich znaczenia w kontekście aktualnej literatury naukowej. Doktorantka krytycznie analizuje mocne i słabsze strony swojej pracy, celnie nakreśla ich znaczenie i sugeruje potencjalne obszary dla przyszłych badań. Rozprawa ma wyodrębnioną *Bibliografię* oraz *Materiały suplementarne*. Poprawnie cytuje 181 prac dobrze dobranych pod względem tematycznym, zawiera 38 rycin oraz 26 tabel. Pomocne byłoby umieszczenie ich spisu.



Rozprawa zawiera kilka drobnych błędów redakcyjnych, np.:

- Str. 83, rysunek 18A – brak zdjęcia z analizy western blot HTT po zastosowaniu cząsteczki A2, choć próbki te są ujęte w ilościowaniu. Dla przejrzystości, kolejność słupków na wykresach i opisów w legendzie powinna być spójna, ten komentarz dotyczy również innych rycin np. rysunek 16 (str. 79), rysunek 21 (str. 86).
- Str. 86, rysunek 21 – brakuje opisu słupków dla próbek kontrolnych w legendzie, opis zdjęć z analizy western blot niespójny z legendą.
- Str. 99, rysunek 30C oraz str. 102, rysunek 31B-C – błąd w opisie słupków; chodzi zapewne o amiR136-13A. Niespójność w pisowni: amiR-136-13A vs amiR136-13A.
- Str. 102, rysunek 31 – przykładowe immunoblotty HTT po zastosowaniu niskiej dawki wektora w eksperymencie długoterminowym *in vivo* pokazano tylko dla kory mózgu, a dla pozostałych (prądkowie, hipokamp) pominięto, choć są ujęte w ilościowaniu.

Pomimo kilku drobnych uwag redakcyjnych, dysertacja jest dobrze przygotowana i logicznie uporządkowana. **Od strony redakcyjnej jak i pod względem wartości merytorycznej pracę oceniam bardzo dobrze.**

IV. Ocena końcowa

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Marianny Pewińskiej-Kołodziejczak oceniam pozytywnie. Stanowi ciekawe i kompleksowe rozwiązanie sformułowanego przez Doktorantkę problemu badawczego z wykorzystaniem umiejętnie dobranych i zróżnicowanych narzędzi molekularnych. Na uwagę zasługuje ogrom pracy włożony w przeprowadzenie tak zróżnicowanych, wielopłaszczyznowych badań. Podjęty temat jest istotny a wyniki badań wnoszą znaczący wkład w rozwój potencjalnej terapii dla HD. Doktorantka wykazała się też umiejętnością interpretacji i krytycznej analizy swoich danych, co świadczy o jej dojrzałości naukowej.

Podsumowując, **przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania formalne i merytoryczne** określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) oraz w *Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu* (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 40/2025/Internet/RN_140 z dnia 18 marca 2025 r.). **Wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pani mgr inż. Marianny Pewińskiej-Kołodziejczak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.**