

dr hab. Karolina Pierzynowska, prof. UG  
Pracownia Neurogenetyki Molekularnej  
Katedra Biologii Molekularnej  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 6 sierpnia 2025 r.

### **RECENZJA rozprawy doktorskiej**

**mgr Marianny Pewińskiej-Kołodziejczak**

pt. „*Opracowanie nowych wariantów sztucznych mikroRNA do selektywnego obniżania poziomu zmutowanego białka w podejściu terapeutycznym dla choroby Huntingtona*”

zrealizowanej w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN

w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: prof. dr hab. Marta Olejniczak

Rozprawa pani mgr Marianny Pewińskiej-Kołodziejczak podejmuje ambitne i wyjątkowo aktualne zagadnienie związane z terapiami RNAi w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem choroby Huntingtona. Jest to monografia, co dziś niby stanowi formę coraz rzadziej spotykaną, ale - jak widać - nadal mogącą zachwycać jakością, spójnością i starannością opracowania.

Praca skupia się na opracowaniu nowych wariantów sztucznego mikroRNA (amiRNA) selektywnie obniżających poziom zmutowanego białka huntingtyny. Szczegółowo opisano proces udoskonalania wcześniej opracowanej cząsteczki amiR136-A2 i zaproponowano wariant amiR136-13A, który wykazuje większą efektywność i lepszy profil bezpieczeństwa, zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* w modelu mysim. Co istotne, uzyskane efekty osiągnięto przy zmniejszonej dawce

wektora AAV5, co z klinicznego punktu widzenia jest znaczącą zaletą. Spodziewam się, że brak opublikowanych wyników badań przedstawionych w rozprawie jest wynikiem zgłoszenia patentowego, które odwleka w czasie pojawienie się artykułu naukowego (jednego lub większej liczby - jak zapewne będzie w tym przypadku).

Rozprawa liczy 147 stron (wraz z danymi suplementarnymi i literaturą) i ma klasyczny układ pracy eksperymentalnej, obejmujący streszczenie (w dwóch językach), wprowadzenie, materiały, metody, wyniki, ich omówienie oraz bogaty przegląd piśmiennictwa.

Już sam wstęp zwraca uwagę - nie tylko pięknym, precyzyjnym językiem, ale też logiczną i kompletną prezentacją tła badawczego. Na szczególne wyróżnienie zasługuje dbałość o detale: po raz pierwszy pojawiające się skróty białek są zawsze wyjaśniane i opatrzone pełnymi nazwami angielskimi, co ułatwia zrozumienie i świadczy o dużym szacunku dla czytelnika. Odbiór bardzo ułatwiła klarowna Tabela na stronie 26 porównująca różne strategie RNAi (siRNA, shRNA, amiRNA) - elegancko pokazuje różnice funkcjonalne i techniczne, porządkując wiedzę. Pod koniec wprowadzenia bardzo dobrze nakreślono luki w aktualnym stanie wiedzy, co jasno komunikuje celowość podjętych badań. Cele pracy zostały wyraźnie sformułowane i dobrze prowadzą przez całą strukturę rozprawy. Część wynikowa jest bardzo dobrze zorganizowana - każda seria eksperymentów kończy się krótkim, jednozdaniowym podsumowaniem, co świetnie porządkuje narrację i pozwala czytelnikowi śledzić tok myślenia autorki. Ilustracje i figury są estetyczne i przejrzyste, a wyniki prezentowane z dużą rzetelnością.

Szczerze mówiąc - a pozwolę sobie na nutę humoru - w miarę lektury czułam coraz silniejszą pokusę, by znaleźć choćby literówkę, bo aż niezręcznie tak nie mieć żadnej uwagi... Ale niestety (a może: na szczęście?) niczego nie jestem w stanie istotnie skrytykować. Chylę czoła.

Cieszę się również, że Pani Marianna nie ograniczyła się wyłącznie do wąsko zakreślonego tematu, ale z ciekawością i otwartością wykraczała poza ramy pracy proponując przetestowanie opracowywanej przez siebie cząsteczki w innych chorobach neurodegeneracyjnych z

ekspansją poliQ (SCA3, DRPLA). Okazało się to jednak nie takie proste. Uzyskane różnice w poziomie wyciszania ekspresji genów *HTT*, *ATXN3* i *ATN1*, a także utrata allelo-specyficzności, to bardzo interesujące obserwacje, które - być może - zasługują na osobny projekt badawczy. Z czego mogą wynikać te różnice? Bardziej z różnej lokalizacji ciągów CAG w tych genach czy może z odmiennych sekwencji flankujących? Chętnie usłyszałabym Pani opinię na ten temat (na przykład podczas obrony) co by stanowiło rozwinięcie tematu rozpoczętego na stronie 126.

Kolejnym aspektem, który mnie zaniepokoił, jest podjęta w pracy w niektórych miejscach dyskusja dotycząca toksyczności krótszych fragmentów zmutowanej huntingtyny lub tworzonych przez nią agregatów. Dawno nie śledziłam tego zagadnienia i dlatego byłabym wdzięczna za rozwinięcie podczas obrony pytania: Co jest bardziej toksyczne w chorobach neurodegeneracyjnych - zmutowane pełne białko tworzące agregaty czy jego krótsze fragmenty? I jakie argumenty przemawiają za jedną i drugą opcją?

Jedynymi badaniami, których żałuję, że nie przeprowadzono to badania behawioralne myszy w eksperymencie długoterminowym. Choć wiem, że eksperyment długoterminowy oceniał inne wskaźniki bezpieczeństwa (w tym poziom NfL, aktywność mikrogleju i astrogleju), testy behawioralne aktywności lokomotorycznej (open field) lub analiz lękowych i zdolności kognitywnych (test uniesionego labiryntu krzyżowego), które nie są szczególnie kosztowne mogłyby dostarczyć cennych danych funkcjonalnych i potwierdzić pozytywne obserwacje dotyczące stanu zdrowia myszy traktowanych amiR136-13A, o których Doktorantka pisze na stronie 103. A może takie badania zostały przeprowadzone? Jeśli nie to czy planuje Pani przeprowadzenie takich lub innych testów behawioralnych?

Zadane powyżej pytania nie stanowią krytyki ani wskazania niedociągnięć pracy, lecz są wyrazem autentycznego zainteresowania Recenzentki i chęci pogłębienia fascynujących wątków poruszonych w rozprawie.



Podsumowując, Pani mgr Marianna Pewińska-Kołodziejczak wyłoniła cząsteczkę amR136-13A jako najbezpieczniejszą i jednocześnie najskuteczniejszą w allelo-specyficznym obniżaniu poziomu zmutowanej huntingtyny, proponując ją jako obiecującego kandydata do dalszych badań nad potencjalnym zastosowaniem terapeutycznym w chorobie Huntingtona. Rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny, metodologiczny i edytorski. Jest to praca przemyślana, kompletna i oryginalna. Autorka wykazuje się dojrzałością naukową, świetnym warsztatem badawczym, a także umiejętnością syntezy danych oraz interpretacji uzyskanych wyników.

Tak więc, 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.) 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.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pani mgr Marianny Pewińskiej-Kołodziejczak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Ze względu na wyjątkowo wysoki poziom merytoryczny, staranność wykonania oraz oryginalność podjętej problematyki, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

  
.....  
Dr hab. Karolina Pierzynowska, prof. UG