

Warszawa, 21.07.2025

Dr hab. n. med Magdalena Czeredys

Zakład Bioinżynierii Komórek Macierzystych

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marianny Pewińskiej-Kołodziejczak
zatytułowanej**

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

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Marianny Pewińskiej-Kołodziejczak została wykonana w Zakładzie Inżynierii Genomowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Marty Olejniczak. Badania przedstawione w pracy doktorskiej zostały sfinansowane w ramach projektu badawczego PRELUDIUM BIS 1 z Narodowego Centrum Nauki, na który mgr inż. Marianna Pewińska-Kołodziejczak uzyskała finansowanie. Tematyką pracy doktorskiej jest choroba Huntingtona (HD) – rzadka dziedziczna choroba neurodegeneracyjna spowodowana ekspansją powtórzeń CAG w genie *HTT*. Zmiany te prowadzą do powstawania zmutowanego białka HTT, które agregując wykazuje toksyczne właściwości i skutkuje degeneracją średnich kolczastych neuronów w prążkowiu, które jako pierwsze ulega degeneracji w HD. Wśród najważniejszych podejść terapeutycznych w HD znajduje się wykorzystanie interferencji RNA (RNAi), w szczególności sztucznych mikroRNA (amiRNA), pozwalających na selektywne wyciszenie ekspresji zmutowanego allelu HTT przy minimalizacji efektów off-target. Pomimo wielu lat badań, HD pozostaje nieuleczalna, a jej modelowanie i leczenie wciąż stanowi wyzwanie. Głównym celem pracy było opracowanie nowych, bezpieczniejszych, skuteczniejszych i bardziej specyficznych wariantów amiRNA, które obniżają poziom zmutowanego białka HTT w modelach komórkowych i zwierzęcych. W związku z potrzebą badań nad nowymi terapiami HD realizowanie tego projektu było zasadne z uwagi na jego istotne znaczenie naukowe.

W ramach rozprawy doktorskiej mgr inż. Marianna Pewińska-Kołodziejczak sformułowała pięć celów badawczych:

1. Zaproponowanie modyfikacji sekwencji cząsteczki amiR136-A2 (sztucznego mikroRNA celującego w powtórzenia CAG) w celu ograniczenia liczby potencjalnych miejsc wiązania poza celem (off-target).
2. Ocena efektywności i specyficzności zaprojektowanych cząsteczek z zastosowaniem systemu reporterowego oraz w modelach komórkowych HD.
3. Ocena efektywności amiRNA w obniżeniu poziomu toksycznego, krótkiego wariantu białka HTT1a.
4. Ocena efektywności i bezpieczeństwa amiR136-13A w mysim modelu HD.
5. Analiza obróbki komórkowej amiR136-13A w modelu komórkowym oraz mysim modelu HD.

Cele badawcze sformułowano w sposób przejrzysty i wymagający, uwzględniając konieczność przeprowadzenia rozbudowanych analiz bioinformatycznych, eksperymentalnych oraz walidacji w modelach komórkowych i zwierzęcych. Wysoki poziom trudności zadań badawczych wynika z konieczności zaangażowania znacznego nakładu pracy i czasu. Warto zaznaczyć, że w pracy nie przewidziano bezpośredniej oceny klinicznego potencjału terapeutycznego opracowanych wariantów, jednak w przypadku rozprawy doktorskiej takie ograniczenie jest uzasadnione.

Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim, a jej układ obejmuje kolejno: Streszczenie, Wykaz skrótów, Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski oraz imponującą Bibliografię, obejmującą liczne pozycje literaturowe. Rozprawa zawiera również wykaz poświęcony publikacjom Autorki, gdzie wymieniono dwa artykuły naukowe powstałe przy współautorstwie mgr inż. Marianny Pewińskiej-Kołodziejczak, które nie są częścią tej rozprawy.

Rozprawa zawiera łącznie 38 rycin (w tym schematy, wykresy, analizy bioinformatyczne i wyniki eksperymentalne), 28 tabel (w tym szczegółowe zestawienia materiałów, metod, wyników oraz analiz statystycznych) oraz materiały suplementarne obejmujące dodatkowe analizy, w tym wykresy gęstości odczytów oraz zestawienia transkryptów o istotnych różnicach ekspresji.

We Wstępie Autorka w sposób interesujący i wyczerpujący przedstawia rozwój badań dotyczących choroby Huntingtona, omawiając jej molekularne podłoże oraz aktualne kierunki poszukiwań terapeutycznych, ze szczególnym naciskiem na strategie wykorzystujące interferencję RNA, w tym sztuczne mikroRNA. Szczegółowo analizuje zasady działania tych cząsteczek, wskazując na ich zalety w porównaniu z innymi narzędziami RNAi, a także omawia trudności związane z projektowaniem bezpiecznych i skutecznych konstruktów terapeutycznych.

Na końcu Wstępu Autorka przedstawia podsumowanie bieżących badań klinicznych nad HD, w tym podejścia terapeutyczne wykorzystujące RNAi oraz ograniczenia i wyzwania stojące przed tą terapią. Większość cytowanej literatury pochodzi z ostatnich lat, co świadczy o tym, że tematyka pracy jest bardzo aktualna. Reasumując, Wstęp stanowi bardzo wartościową i przemyślaną część rozprawy doktorskiej, która dowodzi szerokiej wiedzy teoretycznej mgr inż. Marianny Pewińskiej-Kołodziejczak, niezbędnej do prowadzenia badań eksperymentalnych.

Następną częścią ocenianej pracy doktorskiej jest szczegółowy opis Materiałów i Metod, które Autorka wykorzystywała w swojej pracy badawczej. Jest on napisany w sposób szczegółowy, który pozwala na odtworzenie eksperymentów.

Kolejny rozdział rozprawy doktorskiej przedstawia Wyniki. W pierwszej jego części Doktorantka przeprowadziła analizę bioinformatyczną potencjalnych sekwencji off-target dla cząsteczki wyjściowej amiR136-A2 oraz zmodyfikowanych jej wariantów. Wykazała, że wprowadzenie *in silico* substytucji nukleotydowych w pozycjach 9, 10, 11 oraz 13 obniża ilość potencjalnych sekwencji off-target obserwowanych dla cząsteczki wyjściowej. Wybrane zmodyfikowane warianty amiRNA zostały przetestowane *in vitro* w celu analizy ich efektywności i allelo-selektywności w komórkowym systemie lucyferazowym oraz w liniach fibroblastów od pacjentów z HD oraz z innymi chorobami poliglutaminowymi, w tym ataksji rdzeniowo-mózdkowej (SCA3) oraz zaniku jądra zębatego, jądra czerwienego, gałki bladej i jądra niskowzgórzowego (DRPLA). Doktorantka zaobserwowała, że wybrane cząsteczki amiRNA wykazywały odmienne poziomy wyciszenia ekspresji zmutowanych białek, w związku z czym nie wyłoniono jednego wspólnego kandydata na uniwersalną cząsteczkę terapeutyczną o jednakowym profilu efektywności i allelo-selektywności. W badaniach ukierunkowanych na najbardziej

efektywną cząsteczkę amiRNA w odniesieniu do choroby Huntingtona doktorantka wytypowała cząsteczkę amiR136-13A, która charakteryzowała się wprowadzeniem dodatkowej substytucji nukleotydowej adeniny w pozycji 13 nici wiodącej. Wybrany wariant nazwany amiR136-13A znacząco zmniejszał liczbę potencjalnych sekwencji off-target w ludzkim transkrytomie, przy zachowaniu wysokiej efektywności wyciszania zmutowanego HTT. Wstępna ocena działania zaprojektowanych cząsteczek shRNA w systemie reporterowym potwierdziła wysoką efektywność i allelo-selektywność wariantu 13A. W kolejnych etapach Autorka wykazała, że cząsteczka amiR136-13A skutecznie obniża poziom zmutowanego HTT w modelach komórkowych HD w tym w liniach fibroblastów i neuroprogenitorów uzyskanych przez różnicowanie iPSCs. Stosując analizy transkryptomiczne Doktorantka wykazała, że obniżenie poziomu mHTT w liniach neuroprogenitorów z HD z użyciem amiR136-13A przywracało ekspresję genów związanych z neurogenezą i funkcjonowaniem synaps. Dodatkowo, w modelu komórkowym z indukowalną ekspresją toksycznej formy HTT1a, cząsteczka amiR136-13A skutecznie obniżała poziom tego białka, co potwierdza jej szerokie możliwości terapeutyczne. Co istotne, nowy wariant amiRNA wykazywał zmniejszoną liczbę potencjalnych sekwencji off-target, korzystny profil obróbki komórkowej oraz zwiększony udział nici wiodącej w stosunku do amiR136-A2. W modelu *in vivo* Doktorantka wykazała, że cząsteczka amiR136-13A była dobrze tolerowana przez okres 28 tygodni po iniekcji do prądkowia myszy YAC128, nie powodowała aktywacji mikrogleju ani astrogleju, nie zwiększała poziomu lekkiego polipeptydu neurofilamentów (NfL) w surowicy i nie wykazywała efektów off-target. Analiza obróbki komórkowej w modelu *in vivo* wykazała, że amiR136-13A ulega prawidłowemu przetwarzaniu w modelu zwierzęcym, a uzyskany wariant charakteryzował się niższym ryzykiem off-target w porównaniu do wariantu wyjściowego. Ponadto Autorka wykazała, że użycie cząsteczki amiR136-13A skutkowało selektywnym obniżeniem poziomu mHTT w prądkowiu, hipokampie i korze mózgowej u myszy YAC128 w eksperymencie krótkoterminowym. W eksperymencie długoterminowym *in vivo* Doktorantka wykazała porównywalny efekt terapeutyczny cząstki amiR136-13A przy zastosowaniu o połowę niższej dawki wektora AAV5 w porównaniu do wariantu wyjściowego. Zastosowanie zmodyfikowanej cząsteczki amiRNA nie wywołało istotnych efektów ubocznych ani objawów toksyczności w badanym modelu komórkowym oraz modelu *in vivo*, co potwierdziło jej wysokie bezpieczeństwo. Uzyskane przed Doktorantką wyniki wskazują, że amiR136-13A jest

obiecującym kandydatem do dalszych badań nad jego potencjalnym zastosowaniem w terapii HD.

Wyniki uzyskane przez mgr inż. Mariannę Pewińską-Kołodziejczak zostały dogłębnie przeanalizowane w Dyskusji. W analizie tej Autorka podkreśla kluczowe osiągnięcia swojej pracy w odniesieniu do literatury. Ponadto analizuje ona wyniki niejednoznaczne, odnosząc się do aktualnego stanu wiedzy naukowej. Dyskusja zawiera także rozdział, w którym omówione zostały ograniczenia badań oraz perspektywy kontynuacji projektu. Taki sposób prezentacji i analizy wyników świadczy o wysokim poziomie kompetencji naukowych Autorki oraz jej zaangażowaniu w rozwój dziedziny. Ponadto w rozdziale Wnioski Doktorantka przedstawiła w formie syntetycznego podsumowania swoje główne odkrycia.

Podsumowując, przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Marianny Pewińskiej-Kołodziejczak została przygotowana w sposób wyczerpujący i rzetelny, stanowiąc całość zarówno pod względem teoretycznym, jak i eksperymentalnym. **Autorka wykazała się ogólną wiedzą naukową w dyscyplinie oraz umiejętnością samodzielnego planowania, prowadzenia badań oraz ich analizy, stosując zaawansowane techniki biologii molekularnej.** Zrealizowane cele badawcze były ambitne i zostały osiągnięte w pełnym zakresie. W przeważającej większości eksperymenty zostały przeprowadzone przez samą doktorantkę, a współpraca innych członków zespołu była ograniczona do wybranych etapów. Wskazuje to na wysoką niezależność i dojrzałość naukową Autorki. Jednym z kluczowych osiągnięć pracy jest opracowanie innowacyjnego wariantu sztucznego mikroRNA (amiR136-13A), który wykazuje wysoką skuteczność, selektywność względem zmutowanego allelu HTT oraz bezpieczeństwo działania w modelach komórkowych i zwierzęcych choroby Huntingтона. Szczegółowa analiza amiR136-13A z zastosowaniem komórkowych i mysich modeli HD, potwierdziła przydatność tej cząsteczki jako nowego narzędzia terapeutycznego opartego na RNAi. **Rozprawa stanowi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat terapii genowych chorób neurodegeneracyjnych, prezentując oryginalne rozwiązania problemu naukowego.** Bez wątpienia uzyskane wyniki będą w przyszłości opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, potwierdzając znaczący udział Autorki w prowadzonych

badaniach, a rozdział Wprowadzenie może być wykorzystany do przygotowania pracy przeglądowej.

W pracy doktorskiej występuje kilka niejasności, o których wyjaśnienie poproszę podczas rozprawy doktorskiej:

Str. 38, 91 Autorka w odniesieniu do off-targets pisze, że „spadek poziomu białka może prowadzić do wtórnych zmian w ekspresji genów, które mogą wpływać na wynik analizy”. Ponadto w komórkach NSC z HD Doktorantka tłumaczy wynik odwrócenia profilu ekspresji genów obniżeniem poziomu białka mHTT z użyciem amiR136-13A. W jaki sposób spadek poziomu białek może prowadzić do zmian ekspresji genów?

Str 66, 100 Dlaczego w przypadku iniekcji do prądkowia myszy YAC128 „pustego” wektora wirusowego stosowana była tylko niska dawka wirusa w porównaniu do dwóch stosowanych dawek w przypadku amiRNA?

Str 75 W sekcji Wyniki Autorka pisze „Na podstawie uzyskanych wyników zdecydowano o wprowadzeniu dodatkowej substytucji w pozycje 9, 11 albo 13”, natomiast w tabeli 24 oprócz nich pojawia się dodatkowa substytucja w pozycji 10, która nie jest opisana w tekście. Dlaczego zdecydowano o wprowadzeniu substytucji również w pozycji 10?

Str 88, 90 Na rysunkach 22 i 23 panel A zaznaczono znacznie podwyższone i obniżone geny, które nie zostały opisane w pracy doktorskiej ani w legendach tych rysunków. Jaką mogą mieć funkcję te geny w analizowanych wariantach eksperymentalnych?

Str. 123 W zdaniu linia 25-28 wyciszanie ekspresji „*HTT*” (w znaczeniu gen), powinno być zastąpione „*HTT*” bez kursywy (w znaczeniu białko) w związku faktem, że amiRNA hamuje translację białka mHTT, nie wpływając na transkrypcję genu *mHTT*.

W pracy doktorskiej występują jedynie nieliczne usterki językowe i edytorskie:

Str. 55 Brak spójności w pisaniu nazw odczynników wielką lub małą litera np. trypsyna, Akutaza

Str. 65 Literówka w nazwie FvB

Str. 65 Brak spójności w nazwie wektora nie zawierającego amiRNA, czasami nazwany jest „empty”, a czasami „pusty” str. 56, 66

Str. 108 Niewłaściwy styl zdania: „Analizie RT-qPCR poddano RNA wyizolowane z prążkowi 28 tygodni po iniekcji”.

Str. 128 Sformułowanie „Stoi to w kontrze z naszymi wynikami” można by zamienić na bardziej naukowe słownictwo np. „Wyniki ten nie korespondują z uzyskanymi w niniejszej pracy rezultatami...”

Wniosek końcowy

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 mgr inż. Marianny Pewińskiej-Kołodziejczak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Biorąc pod uwagę znaczenie problemu badawczego dla potencjalnej terapii HD, poziom trudności przeprowadzonych eksperymentów opisanych w rozprawie, zaawansowanie wykorzystanych modeli badawczych, jak również wysoki poziom oryginalności i jakości badań uważam, że niniejsza rozprawa doktorska jest wyróżniająca i wnioskuję o jej wyróżnienie.

Magdalena Czeredys

Magdalena Czeredys