

# ROZPRAWA DOKTORSKA



**INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ**  
Polskiej Akademii Nauk

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

mgr inż. Marianna Pewińska-Kołodziejczak

Praca wykonana w Zakładzie Inżynierii Genomowej  
pod opieką prof. dr hab. Marty Olejniczak

Poznań, 2025

Autorka uzyskała środki finansowe w ramach finansowania projektu badawczego  
z Narodowego Centrum Nauki  
(PRELUDIUM BIS 1, nr 2019/35/O/NZ1/03535);  
badania zostały również częściowo sfinansowane przez firmę Dystrogen Gene Therapies Inc.

*Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania wszystkim osobom, które towarzyszyły mi na drodze prowadzącej do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję do mojej Promotor, Pani Profesor Marty Olejniczak, za życzliwe wsparcie, cenne wskazówki oraz nieocenioną pomoc na każdym etapie pracy.*

*Dziękuję również wszystkim Współpracownikom, z którymi miałam przyjemność dzielić codzienną naukową rzeczywistość – za dzielenie się wiedzą, konstruktywną krytykę, motywację i przyjazną atmosferę.*

*Z całego serca dziękuję moim Rodzicom i Bratu za nieustające wsparcie i wiarę we mnie.*

*Szczególne podziękowania kieruję do mojego Męża, Karola, za jego niezachwiane wsparcie, wyrozumiałość i obecność, która dawała mi siłę do działania.*

*Bez Was wszystkich ta praca nie mogłaby powstać.*

## SPIS TREŚCI

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Publikacje autorki, które nie są częścią rozprawy.....                     | 7  |
| Streszczenie.....                                                          | 8  |
| Abstract .....                                                             | 9  |
| Wykaz skrótów.....                                                         | 10 |
| I Wprowadzenie .....                                                       | 12 |
| 1. Choroba Huntingtona .....                                               | 12 |
| 1.1. Charakterystyka choroby .....                                         | 12 |
| 1.2. Podłoże genetyczne.....                                               | 14 |
| 1.3. Aktualny stan wiedzy na temat terapii HD .....                        | 18 |
| 2. Interferencja RNA.....                                                  | 19 |
| 2.1. Charakterystyka RNAi i biogeneza miRNA .....                          | 19 |
| 2.2. Narzędzia technologii RNAi .....                                      | 25 |
| 3. Eksperymentalne terapie genowe HD .....                                 | 31 |
| 3.1. Aktualne badania kliniczne .....                                      | 31 |
| 3.2. Podejścia terapeutyczne wykorzystujące RNAi.....                      | 35 |
| 3.3 Bezpieczeństwo terapii RNAi.....                                       | 37 |
| II Cel pracy.....                                                          | 42 |
| III Materiały i metody .....                                               | 43 |
| 1. Materiały .....                                                         | 43 |
| 1.1. Odczynniki chemiczne i gotowe zestawy komercyjne .....                | 43 |
| 1.2. Oligonukleotydy i startery .....                                      | 45 |
| 1.3. Plazmidy ekspresyjne.....                                             | 46 |
| 1.4. Bufory i pożywki .....                                                | 47 |
| 1.5. Przeciwciała .....                                                    | 48 |
| 1.6. Linie komórkowe .....                                                 | 49 |
| 1.7. Mysi model HD.....                                                    | 49 |
| 1.8. Sprzęt laboratoryjny oraz materiały trwałe.....                       | 50 |
| 1.9. Pogramy komputerowe oraz bazy danych .....                            | 51 |
| 2. Metody .....                                                            | 52 |
| 2.1. Mapowanie bioinformatyczne i analiza BLAST.....                       | 52 |
| 2.2. Konstrukcja wektorów ekspresyjnych shRNA oraz amiRNA .....            | 53 |
| 2.2.1. Hybrydyzacja oligonukleotydów .....                                 | 53 |
| 2.2.2. Ligacja oligonukleotydów z plazmidem ekspresyjnym.....              | 53 |
| 2.2.3. Transformacja bakterii metodą szoku cieplnego .....                 | 54 |
| 2.2.4. Propagacja bakterii i izolacja plazmidowego DNA w małej skali.....  | 54 |
| 2.2.5. Sekwencjonowanie plazmidowego DNA metodą Sangera.....               | 55 |
| 2.2.6. Propagacja bakterii i izolacja plazmidowego DNA w dużej skali ..... | 55 |

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3. Hodowle komórkowe.....                                                                                         | 55 |
| 2.4. Analiza efektywności reagentów shRNA oraz amiRNA .....                                                         | 56 |
| 2.4.1. Testy lucyferazowe .....                                                                                     | 56 |
| 2.4.2. Produkcja cząsteczek lentiwirusowych i określanie miana wirusa .....                                         | 56 |
| 2.4.3. Transdukcja.....                                                                                             | 57 |
| 2.4.4. Izolacja białka i elektroforeza w warunkach denaturujących .....                                             | 58 |
| 2.4.5. Western blotting.....                                                                                        | 59 |
| 2.5. Analiza efektów niespecyficznych.....                                                                          | 60 |
| 2.5.1. Różnicowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w kierunku prekursorów neuronalnych ..... | 60 |
| 2.5.2. Transdukcja.....                                                                                             | 60 |
| 2.5.3. Izolacja białek i elektroforeza w warunkach denaturujących .....                                             | 60 |
| 2.5.4. Western blotting.....                                                                                        | 61 |
| 2.5.6. Izolacja całkowitego RNA .....                                                                               | 61 |
| 2.5.7. Sekwencjonowanie nowej generacji .....                                                                       | 61 |
| 2.6. Ocena poziomu HTT1a.....                                                                                       | 61 |
| 2.6.1. Przygotowanie plazmidu do nadekspresji <i>HTT1a</i> .....                                                    | 61 |
| 2.6.2. Wyprowadzenie linii komórkowej z indukowaną nadekspresją <i>HTT1a</i> .....                                  | 63 |
| 2.6.3. Indukcja ekspresji <i>HTT1a</i> i transdukcja .....                                                          | 63 |
| 2.6.4. Izolacja białka i elektroforeza w warunkach denaturujących .....                                             | 63 |
| 2.6.5. Western blotting.....                                                                                        | 64 |
| 2.7. Analiza efektywności i bezpieczeństwa amiRNA <i>in vivo</i> .....                                              | 64 |
| 2.7.1. Genotypowanie myszy.....                                                                                     | 64 |
| 2.7.2. Iniekcje .....                                                                                               | 65 |
| 2.7.3. Pobór tkanek .....                                                                                           | 66 |
| 2.7.4. Izolacja białka i elektroforeza w warunkach denaturujących .....                                             | 66 |
| 2.7.5. Western blotting.....                                                                                        | 66 |
| 2.7.6. Izolacja całkowitego RNA z prążkowania.....                                                                  | 67 |
| 2.7.7. Oczyszczanie całkowitego RNA z zanieczyszczeń DNA.....                                                       | 67 |
| 2.7.8. Reakcja odwrotnej transkrypcji .....                                                                         | 68 |
| 2.7.9. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym .....                                                                    | 68 |
| 2.7.10. Izolacja DNA z prążkowania.....                                                                             | 69 |
| 2.7.11. Ilościowy PCR .....                                                                                         | 69 |
| 2.7.12. Określenie poziomu NfL .....                                                                                | 69 |
| 2.8. Analiza obróbki komórkowej amiRNA .....                                                                        | 70 |
| 2.8.1. Transfekcja .....                                                                                            | 70 |
| 2.8.2. Izolacja całkowitego RNA i oczyszczanie z zanieczyszczeń DNA .....                                           | 70 |
| 2.8.3. Sekwencjonowanie nowej generacji .....                                                                       | 70 |
| 2.9. Analiza statystyczna.....                                                                                      | 70 |

|                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IV Wyniki.....                                                                                 | 71  |
| 1. Optymalizacja sekwencji cząsteczki A2 w celu redukcji potencjalnych efektów off-target..... | 71  |
| 2. Analiza efektywności i allelo-selektywności zaprojektowanych shRNA .....                    | 76  |
| 2.1. Wstępna ocena działania cząsteczek shRNA w systemie lucyferazowym .....                   | 76  |
| 2.3. Ocena efektywności wybranych shRNA w modelu fibroblastów HD.....                          | 79  |
| 3. Analiza efektywności i allelo-selektywności wybranych amiRNA .....                          | 80  |
| 3.1. Wstępna ocena działania cząsteczek amiRNA w systemie lucyferazowym .....                  | 80  |
| 3.2. Ocena efektywności wybranych amiRNA w modelu fibroblastów HD, SCA3 i DRPLA.....           | 81  |
| 4. Analiza efektów niespecyficznych w modelu ludzkich prekursorów neuronalnych.....            | 84  |
| 4.1. Określenie markerów prekursorów neuronalnych .....                                        | 84  |
| 4.2. Analiza poziomu HTT .....                                                                 | 85  |
| 4.3. Analiza transkryptomyczna .....                                                           | 86  |
| 5. Ocena efektywności amiRNA w obniżeniu poziomu toksycznego białka HTT1a .....                | 92  |
| 6. Analiza obróbki komórkowej amiR136-13A w modelu komórkowym.....                             | 94  |
| 6.1. Analiza uwalnianych wariantów 13A .....                                                   | 95  |
| 6.2. Określenie poziomu ekspresji 13A w porównaniu do endogennych miRNA.....                   | 96  |
| 7. Analiza efektywności i bezpieczeństwa amiRNA <i>in vivo</i> .....                           | 97  |
| 7.1. Ocena efektywności amiR136-13A w eksperymencie krótkoterminowym.....                      | 97  |
| 7.2. Ocena efektywności amiR136-13A w eksperymencie długoterminowym .....                      | 100 |
| 7.3. Analiza zmian w przyroście masy ciała .....                                               | 103 |
| 7.4. Określenie liczby kopii genomów wektora.....                                              | 104 |
| 7.5. Analiza efektów niespecyficznych.....                                                     | 107 |
| 7.6. Określenie markerów progresji choroby .....                                               | 108 |
| 7.7. Ocena obróbki komórkowej amiR136-13A .....                                                | 111 |
| 7.7.1. Analiza uwalnianych wariantów 13A .....                                                 | 111 |
| 7.7.2. Określenie poziomu ekspresji 13A w porównaniu do endogennych miRNA .....                | 112 |
| V Dyskusja .....                                                                               | 114 |
| 1. Efektywność i allelo-selektywność amiR136-13A .....                                         | 114 |
| 2. Ocena bezpieczeństwa amiRNA .....                                                           | 118 |
| 3. Obróbka komórkowa amiR136-13A w różnych modelach badawczych .....                           | 122 |
| 4. Ograniczenia i perspektywy dalszych badań.....                                              | 126 |
| 5. Znaczenie uzyskanych wyników dla rozwoju terapii chorób poliQ .....                         | 128 |
| VI Wnioski .....                                                                               | 131 |
| VII Bibliografia .....                                                                         | 132 |
| VIII Materiały suplementarne .....                                                             | 144 |

## Publikacje autorki, które nie są częścią rozprawy

- Kotowska-Zimmer A, **Pewińska M**, Olejniczak M. *Artificial miRNAs as therapeutic tools: Challenges and opportunities*. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2021 Jul;12(4):e1640. doi: 10.1002/wrna.1640. Epub 2021 Jan 1. PMID: 33386705; MEiN: 140
- Kotowska-Zimmer A, Przybył Ł, **Pewińska M**, Suszyńska-Zajczyk J, Wronka D, Figiel M, Olejniczak M. *A CAG repeat-targeting artificial miRNA lowers the mutant huntingtin level in the YAC128 model of Huntington's disease*. Mol Ther Nucleic Acids. 2022 May 5;28:702-715. doi: 10.1016/j.omtn.2022.04.031. PMID: 35664700; PMCID: PMC9126840; MEiN: 140

## Streszczenie

Choroba Huntingtona (HD) oraz inne schorzenia spowodowane ekspansją powtórzeń CAG należą do nieuleczalnych chorób neurodegeneracyjnych. Jedną z najbardziej obiecujących strategii terapeutycznych wykorzystuje naturalny mechanizm interferencji RNA (RNAi). Kluczowym wyzwaniem w tym podejściu jest zachowanie równowagi między skutecznością terapeutyczną a bezpieczeństwem stosowanych cząsteczek, ze szczególnym uwzględnieniem minimalizacji efektów niespecyficznych. Wcześniej opracowana cząsteczka będąca sztucznym mikroRNA, amiR136-A2, celująca w powtórzenia CAG i posiadająca niesparowanie w pozycji 8 nici wiodącej, wykazywała dobrą efektywność wyciszania *HTT* oraz allelo-selektywność, ale jej dalszy rozwój ograniczały pewne niedoskonałości, takie jak niższa aktywność w korze mózgu oraz obecność w pełni komplementarnych sekwencji poza celem.

Celem niniejszej rozprawy było opracowanie zmodyfikowanej wersji amiR136-A2 poprzez wprowadzenie dodatkowej substytucji nukleotydowej, mającej na celu zwiększenie bezpieczeństwa przy zachowaniu albo poprawie skuteczności. Spośród przetestowanych wariantów, cząsteczka amiR136-13A – zawierająca dodatkowe niesparowanie w pozycji 13 – wykazała wyższą efektywność wyciszania zmutowanego genu *HTT* zarówno w modelach komórkowych HD, jak i zwierzęcych, osiągając porównywalny efekt przy zastosowaniu dawki wektora AAV5 niższej o połowę w porównaniu do wariantu wyjściowego.

amiR136-13A charakteryzowała się zmniejszoną liczbą potencjalnych sekwencji off-target, korzystnym profilem obróbki komórkowej, zwiększonym udziałem nici wiodącej w stosunku do amiR136-A2, oraz wysoką homogennością końca 5' w prążkowie myszy YAC128. W modelu *in vivo* wykazano, że cząsteczka jest dobrze tolerowana do 28 tygodnia od iniekcji, nie prowadzi do aktywacji mikrogleju ani astrogleju, nie powoduje wzrostu poziomu lekkiego polipeptydu neurofilamentów (NfL) w surowicy, a także nie powoduje efektów off-target. Dodatkowo, w modelu komórkowym z indukowalną ekspresją *HTT1a* potwierdzono zdolność cząsteczki do obniżania poziomu toksycznej, krótkiej formy huntingtyny, która istotnie przyczynia się do patogenezy HD.

Uzyskane wyniki wskazują, że amiR136-13A stanowi bezpieczniejszą i efektywniejszą alternatywę dla amiR136-A2 i jest zarazem obiecującym kandydatem do dalszego rozwoju jako potencjalne narzędzie terapeutyczne dla HD oraz innych chorób poliglutaminowych.



## Abstract

Huntington's disease (HD) and other disorders caused by CAG repeat expansions belong to a group of incurable neurodegenerative diseases. One of the most promising therapeutic strategies involves usage of the natural mechanism of RNA interference (RNAi). However, a key challenge in this approach lies in balancing therapeutic efficacy with safety, particularly with regard to minimizing off-target effects. A previously developed artificial microRNA, amiR136-A2, targeting CAG repeats and containing a single mismatch at position 8 of the guide strand, demonstrated good *HTT* silencing efficiency and allele-selectivity. Nevertheless, its further development was limited by certain drawbacks, such as reduced activity in the cerebral cortex and the presence of fully complementary off-target sequences.

The aim of this doctoral dissertation was to improve the previously designed amiR136-A2 by introducing an additional nucleotide substitution to enhance safety while maintaining or improving efficiency. Among the variants tested, the molecule amiR136-13A, featuring an extra mismatch at position 13, showed increased silencing efficiency against mutant *HTT* in HD cell models and *in vivo*, achieving a comparable therapeutic effect at half the AAV5 vector dose compared to the original construct.

amiR136-13A exhibited a reduced number of potential off-target sequences, a favorable cellular processing profile, increased guide strand release compared to amiR136-A2, and high 5'-end homogeneity in the striatum of YAC128 mice. In the *in vivo* model, the molecule was well tolerated up to 28 weeks post-injection, did not trigger microglial or astroglial activation, did not increase serum levels of neurofilament light polypeptide (NfL), and demonstrated no off-target effects.

Furthermore, in a cell model with inducible *HTT1a* expression, amiR136-13A effectively reduced levels of the toxic, truncated huntingtin isoform, which is known to significantly contribute to HD pathogenesis.

Taken together, the results indicate that amiR136-13A is a safer and more effective alternative to amiR136-A2, and represents a promising candidate for further development as a potential RNAi-based therapeutic tool for HD and other polyglutamine disorders.

## Wykaz skrótów

|                               |                                                                                                                                  |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AAV</b>                    | wirus związany z adenowirusem                                                                                                    |
| <b>Ago</b>                    | białko z rodziny Argonaute                                                                                                       |
| <b>amiRNA</b>                 | sztuczne miRNA                                                                                                                   |
| <b>APS</b>                    | nadsiarczany amonu                                                                                                               |
| <b>ASO</b>                    | oligonukleotyd antysensowy                                                                                                       |
| <b>BDNF</b>                   | neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego                                                                                     |
| <b>BLAST</b>                  | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>                                                                                         |
| <b>BSA</b>                    | albumina surowicy bydłej                                                                                                         |
| <b>CAG</b>                    | cytozyna, adenina, guanina                                                                                                       |
| <b>CAG (promotor)</b>         | <i>cytomegalovirus early enhancer/chicken <math>\beta</math>-actin promoter/rabbit <math>\beta</math>-globin intron promoter</i> |
| <b>CBP</b>                    | białko wiążące CREB                                                                                                              |
| <b>CCDS</b>                   | konsensusowa sekwencja kodująca                                                                                                  |
| <b>cDNA</b>                   | komplementarny DNA                                                                                                               |
| <b>CMV (promotor)</b>         | <i>cytomegalovirus promoter</i>                                                                                                  |
| <b>CRISPR-Cas</b>             | <i>Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats Cas</i>                                                             |
| <b>cUHDRS</b>                 | wskaźnik Unified Huntington's Disease Rating Scale                                                                               |
| <b>DGCR8</b>                  | <i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>                                                                                       |
| <b>DMSO</b>                   | dimetylosulfotlenek                                                                                                              |
| <b>DRPLA</b>                  | zanik jądra zębatego, jądra czerwienego, gałki bladej i jądra niskowzgórzowego                                                   |
| <b>dsRNA</b>                  | dwuniciowy RNA                                                                                                                   |
| <b>DTT</b>                    | ditiotreitol                                                                                                                     |
| <b>EEF2</b>                   | <i>eukaryotic elongation factor 2</i>                                                                                            |
| <b>Ef1<math>\alpha</math></b> | <i>elongation factor 1 alpha promoter</i>                                                                                        |
| <b>FBS</b>                    | płodowa surowica bydła                                                                                                           |
| <b>FDA</b>                    | Agencja Żywności i Leków                                                                                                         |
| <b>FRT</b>                    | <i>flippase recognition target</i>                                                                                               |
| <b>GAPDH</b>                  | dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego                                                                                      |
| <b>GFP</b>                    | białko zielonej fluorescencji                                                                                                    |
| <b>Gfap</b>                   | kwaśne białko włókienkowe                                                                                                        |
| <b>GTP</b>                    | guanozynotrójfosforan                                                                                                            |
| <b>HD</b>                     | choroba Huntingtona                                                                                                              |
| <b>HIV</b>                    | ludzki wirus niedoboru odporności                                                                                                |
| <b>HTT</b>                    | huntingtyna                                                                                                                      |
| <b>Iba1</b>                   | <i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>                                                                                |
| <b>IOD</b>                    | zintegrowana gęstość optyczna                                                                                                    |
| <b>iPSC</b>                   | indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste                                                                                  |
| <b>ITR</b>                    | odwrócona sekwencja powtórzona                                                                                                   |
| <b>LB</b>                     | <i>lysogeny broth</i>                                                                                                            |
| <b>miRNA</b>                  | mikroRNA                                                                                                                         |
| <b>MOI</b>                    | <i>multiplicity of infection</i>                                                                                                 |
| <b>MRI</b>                    | obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego                                                                                       |
| <b>MSN</b>                    | średnie neurony kolczaste                                                                                                        |
| <b>NfL</b>                    | lekki polipeptyd neurofilamentów                                                                                                 |
| <b>NGS</b>                    | sekwencjonowanie nowej generacji                                                                                                 |
| <b>NMD</b>                    | degradacja mRNA zależna od kodonu nonsensownego                                                                                  |

|                                |                                                                             |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>NPM</b>                     | <i>Neural Progenitor Medium</i>                                             |
| <b>NSC</b>                     | prekursory neuronalne                                                       |
| <b>nt</b>                      | nukleotyd                                                                   |
| <b>OCT4</b>                    | <i>octamer-binding transcription factor 4</i>                               |
| <b>ORF</b>                     | otwarta ramka odczytu                                                       |
| <b>OUN</b>                     | ośrodkowy układ nerwowy                                                     |
| <b>PACT</b>                    | <i>protein kinase R activator</i>                                           |
| <b>PARN</b>                    | <i>poly(A)-specific ribonuclease</i>                                        |
| <b>PAX6</b>                    | <i>paired box 6</i>                                                         |
| <b>PCR</b>                     | łańcuchowa reakcja polimerazy                                               |
| <b>PEI</b>                     | polietylenoimina                                                            |
| <b>PGC1<math>\alpha</math></b> | <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i> |
| <b>PMSF</b>                    | fluorek fenylometylosulfonylu                                               |
| <b>pre-miRNA</b>               | prekursor miRNA                                                             |
| <b>pri-miRNA</b>               | pierwotny prekursor miRNA                                                   |
| <b>poliQ</b>                   | poliglutaminowy                                                             |
| <b>PTBP2</b>                   | <i>polypyrimidine tract binding protein 2</i>                               |
| <b>pz</b>                      | pary zasad                                                                  |
| <b>rAAV</b>                    | rekombinowany AAV                                                           |
| <b>RISC</b>                    | <i>RNA-induced silencing complex</i>                                        |
| <b>RMAT</b>                    | zaawansowana terapia medycyny regeneracyjnej                                |
| <b>RNAi</b>                    | interferencja RNA                                                           |
| <b>rSAP</b>                    | alkaliczna fosfataza z krewetek                                             |
| <b>RT-qPCR</b>                 | ilościowy PCR w czasie rzeczywistym                                         |
| <b>RVG</b>                     | glikoproteina wirusa wścieklizny                                            |
| <b>SCA</b>                     | ataksja rdzeniowo-mózdkowa                                                  |
| <b>SCR</b>                     | <i>Scramble</i>                                                             |
| <b>SDS</b>                     | laurylosiarczan sodu                                                        |
| <b>shRNA</b>                   | krótkie RNA o strukturze spinki do włosów                                   |
| <b>siRNA</b>                   | krótki interferujący siRNA                                                  |
| <b>SMA</b>                     | rdzeniowy zanik mięśni                                                      |
| <b>snoRNA</b>                  | mały jąderkowy RNA                                                          |
| <b>SNP</b>                     | polimorfizm pojedynczego nukleotydu                                         |
| <b>SOX1/2</b>                  | <i>SRY-box 1/2</i>                                                          |
| <b>SRSF6</b>                   | <i>serine/arginine-rich splicing factor 6</i>                               |
| <b>ssRNA</b>                   | jednoniciowy RNA                                                            |
| <b>TLR</b>                     | receptor Toll-podobny                                                       |
| <b>TNRC6</b>                   | <i>trinucleotide repeat containing protein 6</i>                            |
| <b>TRBP</b>                    | <i>transactivation response element RNA binding protein</i>                 |
| <b>tRNA</b>                    | transportowy RNA                                                            |
| <b>UTR</b>                     | region niepodlegający translacji                                            |
| <b>qPCR</b>                    | ilościowy PCR                                                               |
| <b>vg</b>                      | genomy wektora                                                              |
| <b>VMAT2</b>                   | <i>vesicular monoamine transporter type 2</i>                               |
| <b>XPO</b>                     | eksportyna                                                                  |
| <b>YAC</b>                     | sztuczny chromosom drożdżowy                                                |

# I Wprowadzenie

## 1. Choroba Huntingtona

### 1.1. Charakterystyka choroby

Choroba Huntingtona (ang. *Huntington's disease*, HD) jest jedną z dziewięciu neurodegeneracyjnych chorób poliglutaminowych (poliQ), charakteryzujących się obecnością wydłużonego ciągu powtórzeń trzech nukleotydów – cytozyny, adeniny oraz guaniny (CAG) w regionach kodujących genów. Oprócz HD, w grupie tej znajduje się także między innymi ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (ang. *spinocerebellar ataxia type 3*, SCA3), czy zanik jądra zębatego, jądra czerwienno, gałki bladej i jądra niskowzgórzowego (ang. *dentatorubral-pallidoluysian atrophy*, DRPLA). Schorzenia te, ze względu na stosunkowo dobrze poznaną etiologię oraz dostępne szerokie spektrum modeli badawczych, należą do najczęściej badanych chorób poliQ (1).

HD po raz pierwszy została opisana w 1872 roku przez amerykańskiego lekarza George'a Huntingtona. Zaproponowana przez niego nazwa – płasawica – wynikała z obecności charakterystycznych, mimowolnych ruchów płasawiczych obserwowanych u pacjentów. Huntington zauważył również, że chorzy nie reagują na żadne dostępne wówczas leczenie, a także, że schorzenie dotyka wyłącznie dorosłych i wiąże się ze zwiększoną tendencją do samobójstw wśród pacjentów (2). Później odkryto, że istnieje także młodzieńcza forma tej choroby (ang. *juvenile HD*), która objawia się przed 20 rokiem życia. Charakteryzuje się występowaniem znacznie dłuższego ciągu powtórzeń CAG (>60), szybszą progresją i odmiennym przebiegiem klinicznym, oraz stanowi około 5% przypadków HD (3). Obecnie przyjmuje się, że liczba powtórzeń CAG do 35 jest charakterystyczna dla osób zdrowych, jednak wartości w zakresie od 27 do 35 wskazują na możliwość ekspansji sekwencji do nieprawidłowego zakresu w przyszłych pokoleniach. Liczba powtórzeń między 36 a 39 związana jest z niepełną penetracją, co oznacza, że nie u wszystkich osób z takim wariantem genetycznym dojdzie do rozwoju schorzenia. Wartości od 40 są jednoznacznie patologiczne i skutkują wystąpieniem choroby (4). Charakterystycznym zjawiskiem dla HD jest antycypacja – wcześniejsze występowanie objawów oraz cięższy przebieg choroby w kolejnych pokoleniach. Wynika to ze stopniowego zwiększania liczby powtórzeń CAG podczas transmisji genetycznej. Szczególnie w przypadku dziedziczenia choroby od ojca obserwuje się większą

niestabilność powtórzeń CAG, co prowadzi do dalszego wydłużenia tego ciągu u potomstwa (5).

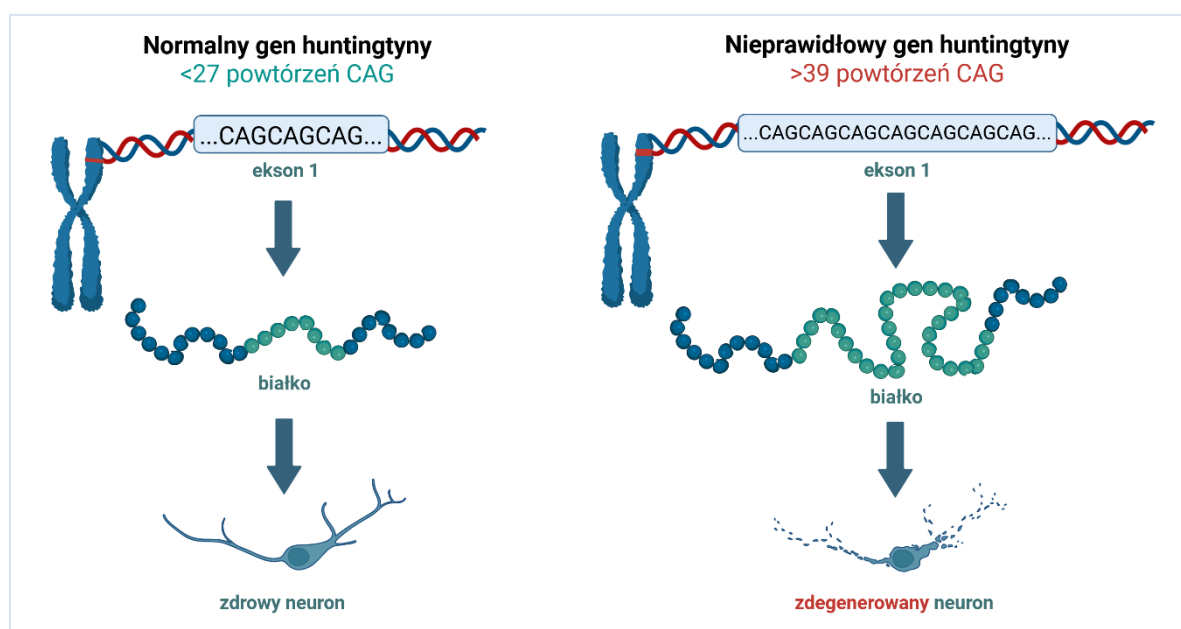
HD jest dziedziczona w sposób autosomalny dominujący. Ma charakter postępujący, a jej przebieg obejmuje nie tylko zaburzenia ruchowe, ale także poznawcze i psychiatryczne, które pojawiają się najczęściej po 40 roku życia. Oprócz charakterystycznych ruchów pływawczych, pacjenci doświadczają opóźnień procesów intelektualnych, depresji, apatii, a także spowolnienia ruchów (bradykinezji) czy utraty koordynacji ruchowej (6). Objawy kliniczne wynikają z postępującej dysfunkcji i obumierania głównie neuronów prążkowania i kory mózgowej. Największą wrażliwością wykazują się średnie neurony kolczaste (ang. *medium spiny neurons*, MSN), stanowiące większość neuronów prążkowania – struktury mózgu, która odpowiedzialna jest za procesy poznawcze i kontrolę ruchów (6, 7). Oprócz wspomnianych struktur, neurodegeneracja obejmuje także mózdzek, wzgórze i pień mózgu (8). U pacjentów obserwuje się również objawy niezwiązane bezpośrednio z degeneracją ośrodkowego układu nerwowego (OUN), takie jak zaburzenia metaboliczne, endokrynologiczne, czy utrata wagi (9).

HD należy do grupy chorób rzadkich, a jej występowanie jest zróżnicowane. Według danych metaanalitycznych opublikowanych przez grupę Tamary Pringsheim w 2023 roku, w latach 2010-2022 średnia roczna zapadalność na HD na świecie wynosiła 0,48 na 100 000 osób, z częstszym występowaniem choroby w Europie oraz Ameryce Północnej (4,88 na 100 000 osób) niż w Afryce czy Azji. Wyższy odsetek może być skorelowany z większą dostępnością badań molekularnych na tych kontynentach, a także powiązaną z tym szybszą diagnostyką (10).

Rozpoznanie choroby, poza obserwacją objawów klinicznych, opiera się przede wszystkim na testach genetycznych, których celem jest określenie liczby powtórzeń CAG w genie, przy czym najczęściej stosowaną metodą jest łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) (11, 12). Dodatkowo, w diagnostyce wykorzystuje się również obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI), umożliwiające wykrycie strukturalnych zmian w mózgu, takich jak atrofia prążkowania (13). Niestety, HD, podobnie jak inne choroby poliQ, często jest diagnozowana zbyt późno. Objawy takie jak depresja czy psychoza prowadzą do mylnego rozpoznania i mogą prowadzić do niewłaściwego leczenia, w związku z tym, konieczna jest wczesna prawidłowa diagnostyka, w celu wdrożenia odpowiedniej terapii oraz planowania opieki (14).

## 1.2. Podłoże genetyczne

HD należy do chorób monogenowych, czyli spowodowanych mutacją w jednym genie (rys. 1). Ekspansja powtórzeń CAG występuje w pierwszym eksonie genu kodującego białko huntingtynę (ang. *huntingtin*, HTT), zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu 4. Gen *HTT* został opisany po raz pierwszy w 1993 roku przez konsorcjum *Huntington's Disease Collaborative Research Group* (15). Ulega on ekspresji w całym organizmie, jednak najwyższe poziomy *HTT* obserwuje się w mózgu, zwłaszcza w prążkowie, korze, hipokampie oraz mózdzku (16).



**Rysunek 1.** Schemat ekspresji normalnego i patologicznego wariantu genu *HTT* i jej skutki.

HTT jest białkiem o masie cząsteczkowej 348 kDa i wysokim stopniu konserwatywności u ssaków. Występuje zarówno w jądrze jak i cytoplazmie, gdzie pełni rozmaite funkcje. Choć nadal nie w pełni poznana, odgrywa kluczowe role w układzie nerwowym, zarówno w okresie prenatalnym, jak i życiu dorosłym. Odpowiada za powstawanie i transport neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), który odgrywa istotną rolę między innymi w procesie neurogenezy (17). Oddziałując z białkiem motorycznym dyneiną, HTT koordynuje transport pęcherzykowy (18), a także uczestniczy w regulacji transkrypcji genów i procesach autofagii (19, 20). Jej całkowity brak prowadzi do letalności mysiego płodu (21), natomiast jej

deficyt u osobników dorosłych powoduje dysfunkcje behawioralne, zaburzenia gospodarki żelaza, zapalenie trzustki oraz glejozę wzgórza (22, 23).

Patogeneza HD wynika nie tylko z utraty kluczowych funkcji białka, ale także z nabycia szkodliwych funkcji przez jego nieprawidłową formę. Zmutowana HTT gromadzi się w cytoplazmie oraz jądrach komórkowych przybierając nieprawidłowe konformacje, w tym struktury  $\beta$ -harmonijki, następnie tworząc włókniste agregaty, co prowadzi do procesów patologicznych. Białko w tej formie zakłóca transport komórkowy, a także jest cięte na mniejsze fragmenty o dużej toksyczności. Jego szkodliwe działanie polega na hamowaniu działania białek opiekuńczych (chaperonów) i autofagii, a także aktywacji mikrogleju, co prowadzi do wzbudzenia stanu zapalnego w mózgu (9). Przypuszcza się także, że zmutowana HTT zakłóca transkrypcję poprzez oddziaływanie z białkiem regulującym biogenezę mitochondriów, PGC1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), co prowadzi do dysfunkcji mitochondrialnej i neurodegeneracji (9, 24). Obecność nieprawidłowego białka skutkuje także stresem oksydacyjnym i nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu, o których wiadomo, że są silnie neurotoksyczne (25–27). Oddziałując z białkiem wiążącym CREB (ang. *CREB-binding protein*, CBP), zmutowana HTT prowadzi do zaburzeń jego funkcji, co skutkuje zmniejszoną acetylacją histonów i represją transkrypcji genów niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania neuronów (28, 29).

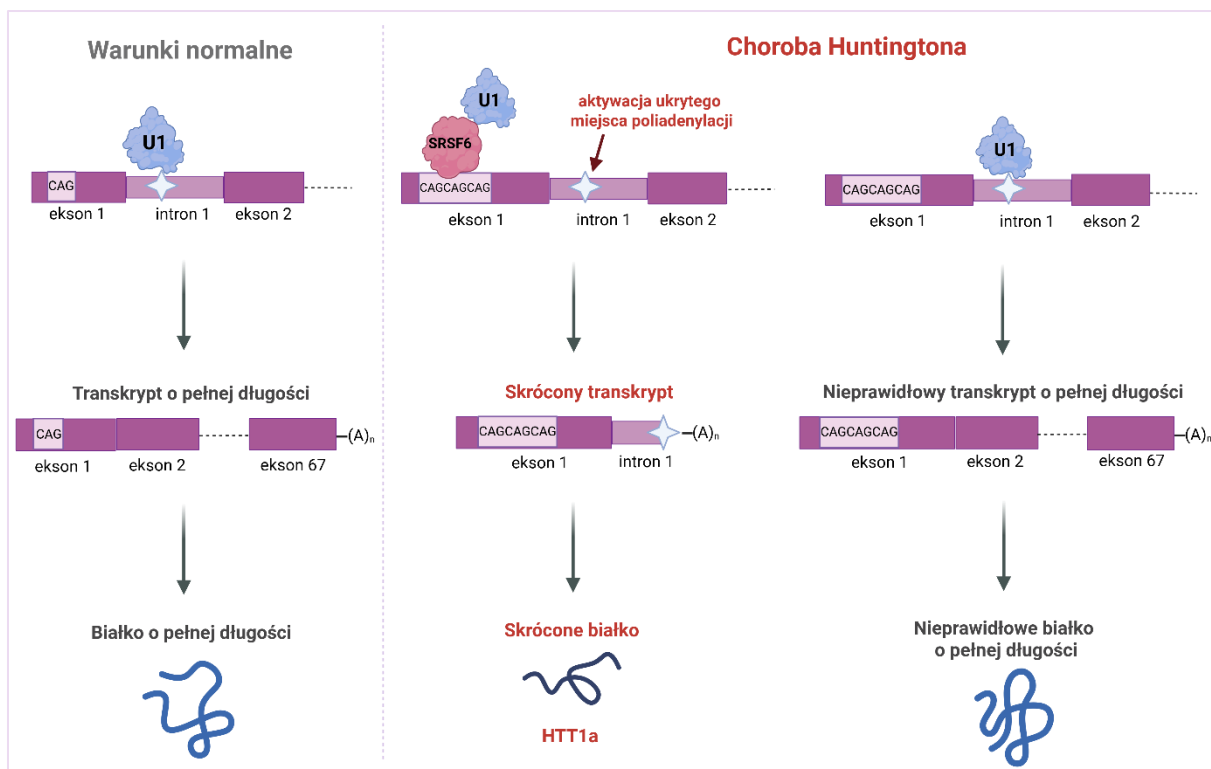
Z drugiej strony podejrzewa się, że agregaty HTT mogą pełnić rolę protekcyjną, stanowiącą odpowiedź na źle sfałdowane białko. To właśnie rozpuszczalna forma zmutowanego białka wydaje się być bardziej toksyczna, podczas gdy agregacja białka może ograniczać jego interakcje z innymi białkami (9). Chociaż obecność agregatów jest charakterystyczna dla HD, ich dokładna rola nadal pozostaje dyskusyjna.

Niektóre badania wykazują, że patogeneza choroby nie jest związana wyłącznie ze zmutowanym białkiem, lecz pojawia się już na poziomie mRNA. Nieprawidłowe transkrypty *HTT* tworzą struktury spinki, które ulegają retencji w jądrze komórkowym, gdzie mogą sekwestrować białka wiążące RNA, prowadząc do zaburzeń składania mRNA (splicingu). Ponadto, struktury te wykazują oporność na potencjalne terapie celujące w transkrypt (30, 31). Mimo doniesień literaturowych o toksyczności mRNA, zagadnienie to pozostaje niedostatecznie zbadane.

Kolejnym aspektem patogenezy HD jest alternatywna poliadenylacja i jej skutki. W genie *HTT* znajduje się wiele miejsc poliadenylacji. W normalnych warunkach, proces ten

zachodzi w klasycznym miejscu zlokalizowanym na końcu 3' mRNA, w wyniku czego powstaje pełnej długości transkrypt, będący matrycą dla syntezy prawidłowego, funkcjonalnego białka. Występowanie wydłużonych powtórzeń CAG zaburza prawidłowy przebieg tego mechanizmu, co może prowadzić do użycia alternatywnego miejsca poliadenylacji, znajdującego się w intronie 1. Obecność skróconego transkryptu, obejmującego wyłącznie ekson 1 i fragment intronu 1, została potwierdzona zarówno w modelach mysich HD, jak i w fibroblastach pochodzących od pacjentów oraz w tkankach mózgowych uzyskanych pośmiertnie. Zaproponowany mechanizm tej nieprawidłowości zakłada zwiększone przyłączanie się czynnika splicingowego SRSF6 (*serine/arginine-rich splicing factor 6*) do końca 5' transkryptu *HTT*. Charakterystyczną właściwością tego białka jest jego zdolność do wspomagania translacji częściowo złożonych transkryptów mRNA, co może sprzyjać powstawaniu skróconych form białkowych. Ponadto, podejrzewa się, że białka SR (o nazwie pochodzącej od obecności domen bogatych w serynę – S, oraz argininę – R), do których należy SRSF6, mogą wiązać kompleksy małych rybonukleoprotein U1. To zjawisko sprzyja aktywacji ukrytych miejsc poliadenylacji. Konsekwencją tych procesów jest powstanie skróconego transkryptu, który podlega translacji, prowadząc do syntezy krótkiego białka HTT, określanego jako HTT1a (rys. 2) (32, 33). Podobnie jak pełnej długości zmutowane białko, HTT1a wykazuje zdolność do tworzenia agregatów w komórkach (34). Zidentyfikowano także inne izoformy *HTT* zawierające kryptyczne eksony, natomiast podlegają one procesowi degradacji (ang. *nonsense-mediated mRNA decay*, NMD) (33).





**Rysunek 2.** Przetwarzanie mRNA *HTT* w warunkach fizjologicznych oraz chorobie Huntingtona.

Innym zjawiskiem obecnym w HD jest niekanoniczna translacja związana z powtórzeniami nukleotydowymi (ang. *Repeat-Associated Non-AUG translation*), inaczej RAN translacja. Odkryta w 2011 roku w ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 8 (35), okazała się być charakterystycznym mechanizmem dla chorób spowodowanych ekspansjami mikrosatelitarnymi (36). Proces ten zachodzi bez udziału klasycznego kodonu START (AUG). Skutkiem RAN translacji jest powstanie nieprawidłowych homopolimerycznych białek składających się z powtórzonych aminokwasów takich jak seryna, leucyna, glutamina, czy alanina. Rodzaj syntetyzowanego białka zależy od sekwencji otwartej ramki odczytu (37). Skumulowane białka poliserynowe (z kodonu AGC) oraz polialaninowe (z kodonu GCA) zostały wykryte w tkankach najbardziej dotkniętych chorobowo, a zwłaszcza w prążkowie i mózdku pacjentów HD, w tym pacjentów dotkniętych odmianą młodzieńczą. Obecność tych białek w obszarach wykazujących ekspresję proteolitycznego białka kaspazy 3 sugeruje ich toksyczność. Przypuszcza się, że zarówno wydłużony ciąg powtórzeń CAG, jak i tworzone przez niego struktury drugorzędowe mogą przyczyniać się do inicjacji RAN translacji (36).

### 1.3. Aktualny stan wiedzy na temat terapii HD

Mimo tego, że HD znana jest już od wielu lat, nadal jest przedmiotem wielu intensywnych badań, oraz podobnie jak pozostałe choroby poliQ, w dalszym ciągu pozostaje nieuleczalna. Jej złożona patogenezą utrudnia opracowanie skutecznej terapii, która mogłaby zahamować albo odwrócić postęp choroby. Mediana przeżycia od momentu wystąpienia pierwszych objawów ruchowych wynosi około 18 lat (6). Ponadto, jak każda choroba neurodegeneracyjna, HD stanowi ogromne wyzwanie nie tylko dla samego pacjenta, ale również jego rodziny, otoczenia oraz systemu opieki zdrowotnej. W obliczu starzejącego się społeczeństwa, obciążenie to nabiera globalnego znaczenia, stając się istotnym problemem zdrowotnym, społecznym i ekonomicznym na skalę światową.

Obecnie w terapii HD stosuje się jedynie leczenie objawowe, mające na celu poprawę jakości życia pacjentów. Do leczenia płasawicy wykorzystywana jest podawana doustnie tetrabenazyna. Ten organiczny związek chemiczny będący pochodną benzochinolizyny został zsyntetyzowany w 1950 roku i początkowo był używany w leczeniu schizofrenii. Później okazało się, że jest skuteczny w leczeniu chorób dotyczących układu ruchowy, objawiających się zaburzeniami hiperkinetycznymi. W 2008 roku został zaakceptowany przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) do stosowania w leczeniu HD (38, 39). Tetrabenazyna działa w OUN poprzez hamowanie transportera monoamin VMAT2 (*vesicular monoamine transporter type 2*), odpowiedzialnego za transport neuroprzekazników do pęcherzyków synaptycznych. Prowadzi to do obniżenia poziomu serotoniny i dopaminy w synapsach, czego skutkiem jest zmniejszenie nasilenia ruchów płasawicznych. Niestety, stosowanie tego leku wiąże się z ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych wynikających z niedoboru dopaminy, takich jak depresja oraz skłonności samobójcze, które same w sobie stanowią charakterystyczne objawy u pacjentów z HD. Z tego względu terapia tetrabenazyną wymaga szczególnej ostrożności i regularnego monitorowania stanu psychicznego pacjentów, ponieważ może potencjalnie prowadzić do jego pogorszenia (39). Bezpieczniejszą alternatywą dla tego leku jest jego zmodyfikowana wersja, a mianowicie deutetabenazyna, w której niektóre atomy wodoru zostały zastąpione jego cięższym izotopem – deuterem. Wiązania między węglem a deuterem są znacznie mocniejsze niż między węglem a wodorem, co spowalnia metabolizm leku, a to z kolei przekłada się na lepszą tolerancję przez pacjentów w porównaniu z jego pierwotnym odpowiednikiem.

Wydłużony okres półtrwania umożliwia również stosowanie niższych dawek przy zachowaniu skuteczności terapeutycznej (40–42).

W leczeniu hiperkinezji od 1970 roku stosuje się również pochodną benzamidu – tiapryd. Jako antagonist receptorów dopaminergicznych poprawia funkcje motoryczne pacjentów HD. Charakteryzuje się łagodniejszymi efektami ubocznymi niż tetrabenazyna, jest jednak niedostępny w wielu krajach (43, 44).

W przypadku epizodów depresyjnych i stanów lękowych stosuje się selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny, natomiast w leczeniu psychoz – leki przeciwpsychotyczne. Dodatkowo, w celu minimalizacji skutków choroby pacjentom oferuje się metody nefarmakologiczne, takie jak pomoc psychologiczna, rehabilitacja oraz logopedia (44).

Wspomniane podejścia terapeutyczne, choć skutecznie łagodzą objawy HD, nie wpływają w żaden sposób na spowolnienie neurodegeneracji, która leży u podstaw tego schorzenia. Konieczne jest zatem opracowanie leczenia które będzie w stanie zahamować jej postęp albo zmodyfikować przebieg choroby. Opracowanie takich strategii terapeutycznych jest kluczowe, aby poprawić jakość życia pacjentów oraz znacząco wydłużyć okres ich sprawności.

Na przestrzeni lat coraz większą uwagę skupiają badania nad wykorzystaniem naturalnie występującego mechanizmu interferencji RNA (RNAi) w opracowaniu terapii dla chorób neurodegeneracyjnych, w tym HD.

## **2. Interferencja RNA**

### **2.1. Charakterystyka RNAi i biogeneza miRNA**

Zjawisko RNAi zostało po raz pierwszy opisane w 1998 roku przez zespół amerykańskiego biochemika, Craiga C. Mello, który wykazał, że wprowadzenie dwuniciowego RNA (ang. *double-stranded RNA*, dsRNA) do nicienia *Caenorhabditis elegans* skutkuje skuteczniejszym wyciszeniem ekspresji genów niż podanie jednoniciowego RNA (ang. *single-stranded RNA*, ssRNA). Odkrycie to zostało uhonorowane Nagrodą Nobla w 2006 roku. Równolegle, w 1993 roku Victor Ambros i Gary Ruvkun odkryli pierwsze

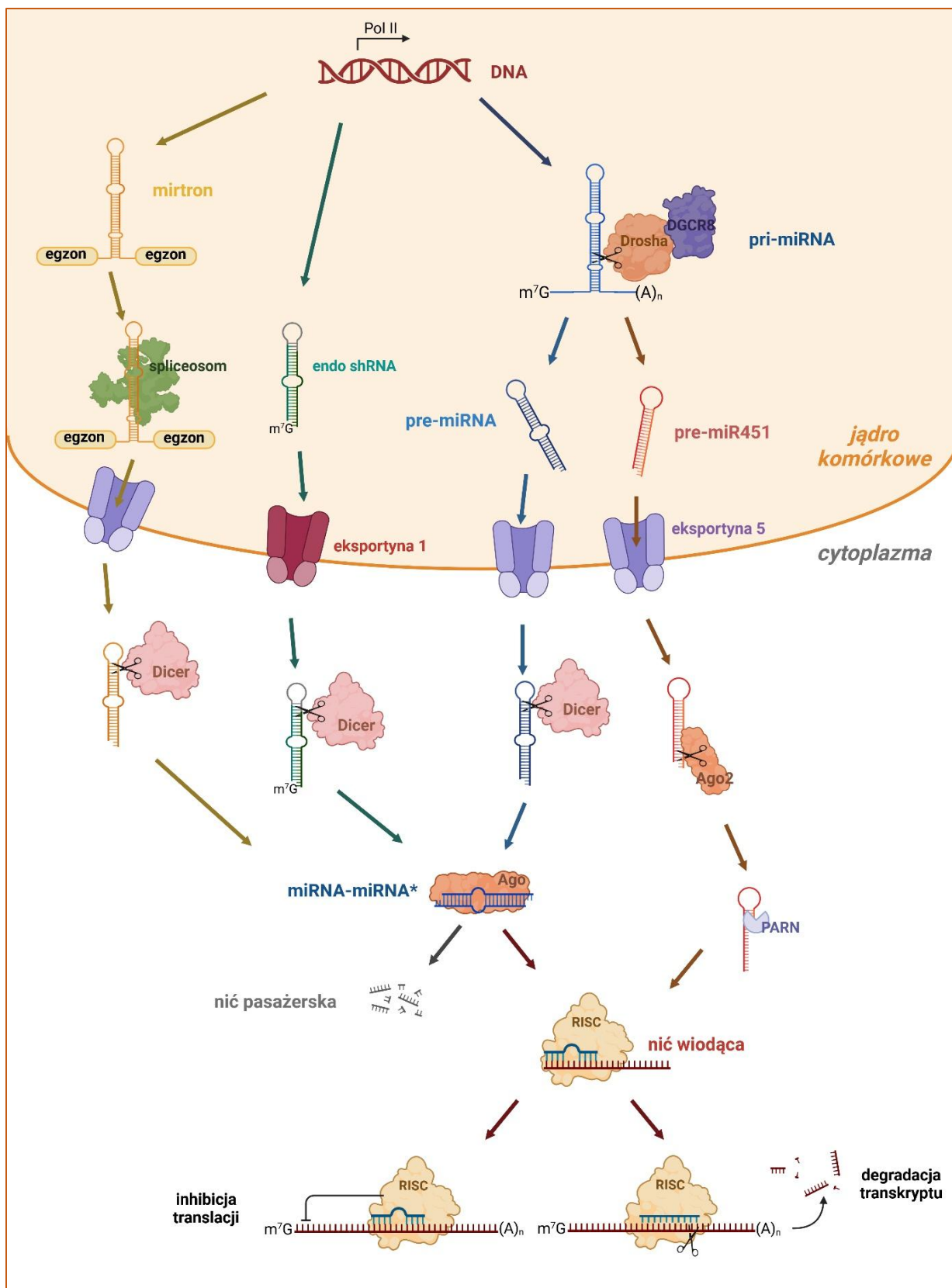
mikroRNA (miRNA) – cząsteczkę *lin-4* regulującą ekspresję genu *lin-14* poprzez wiązanie się z jego 3' UTR (ang. *untranslated region*, region niepodlegający translacji) i hamowanie translacji (45, 46). Za odkrycie to otrzymali Nagrodę Nobla w 2024 roku.

RNAi to złożony mechanizm potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów, który wykorzystuje miRNA lub egzogenne krótkie interferujące RNA (ang. *short interfering RNA*, siRNA). Cząsteczki te, wiążąc się z docelowym mRNA, prowadzą do zahamowania translacji albo degradacji transkryptu, a tym samym zapobiegają syntezie białka (47, 48).

miRNA to jednoniciowe cząsteczki RNA o długości około 22 nukleotydów. Wiążą się z mRNA poprzez komplementarne parowanie zasad w obrębie 3' UTR, a mechanizm ich działania jest dwojaki. W przypadku pełnej komplementarności pomiędzy sekwencją miRNA a docelowym transkryptem dochodzi do degradacji mRNA, natomiast w przypadku niepełnej komplementarności miRNA tworzy przeszkodę dla rybosomu, co prowadzi do zahamowania translacji. miRNA wiążą się specyficznie przez region źródłowy (ang. *seed region*) – sekwencję obejmującą 6 albo 7 nukleotydów zlokalizowanych na odcinku 2-7 albo 2-8 licząc od końca 5' miRNA. Komplementarność tej sekwencji do fragmentu 3' UTR w mRNA jest kluczowa dla siły i specyficzności wiązania. Choć głównym miejscem oddziaływania miRNA jest 3' UTR, istnieją również doniesienia o możliwości wiązania się miRNA z innymi obszarami, takimi jak 5' UTR, sekwencje kodujące czy promotory genów (49). Ze względu na krótką sekwencję regionu źródłowego, jedno miRNA może regulować ekspresję wielu genów (49–52). Według bazy MirGeneDB 3.0 zidentyfikowano dotąd ponad 21 000 genów miRNA w 114 gatunkach zwierząt. Zaburzenia ich ekspresji są związane z wieloma chorobami, w tym nowotworami, chorobami serca, metabolicznymi i neurodegeneracyjnymi (53, 54).

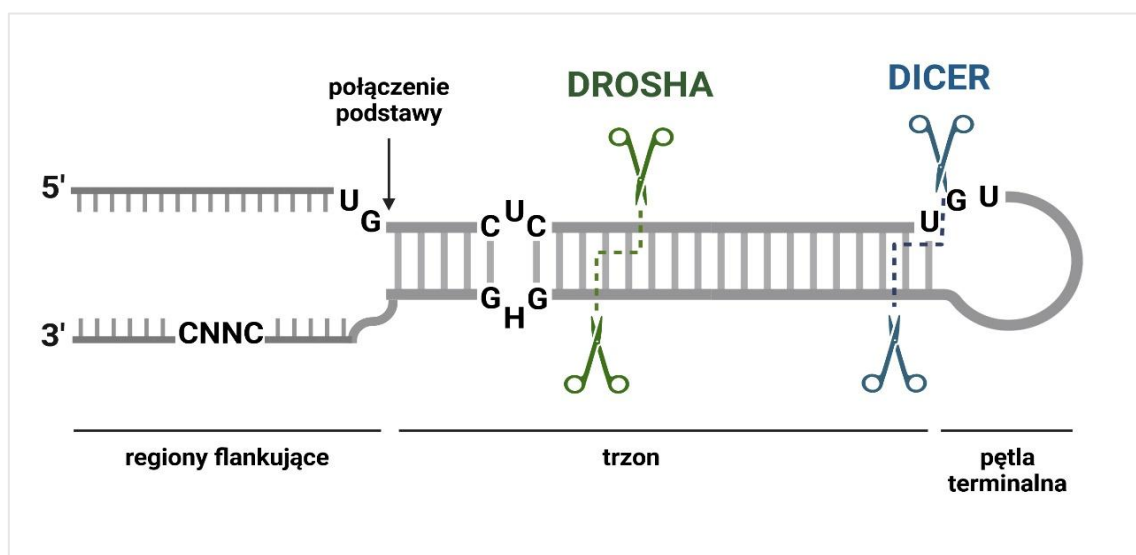
Biogeneza miRNA może przebiegać w sposób kanoniczny, albo rzadziej w sposób niekanoniczny (rys. 3). Cząsteczki te są zwykle transkrybowane z DNA przez polimerazę II RNA do długich transkryptów o długości nawet kilku tysięcy nukleotydów. W niektórych przypadkach miRNA przepisywane są jako jeden policistronowy transkrypt – klaster – a pochodzące z niego miRNA uważa się za należące do jednej rodziny (55). Produktem kanonicznej transkrypcji jest pierwotny prekursor zwany pri-miRNA (ang. *primary-miRNA*) o strukturze spinki do włosów z wydłużonymi sekwencjami flankującymi. Pri-miRNA rozpoznawane są przez kompleks zwany Mikroprocesorem. Tworzy go białko Drosha (u roślin Pasha), będące enzymem RNAzą III oraz białko wiążące dwuniciowy RNA DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*), wraz z kofaktorami. Drosha

przecina pri-miRNA w obrębie podstawy trzonu, uwalniając w ten sposób około 70-nukleotydowy prekursor miRNA (ang. *precursor miRNA*, pre-miRNA) posiadający 2-nukleotydowe wystające odcinki na końcu 3' (ang. *overhangs*).



**Rysunek 3.** Kanoniczna oraz niekanoniczna biogeneza miRNA. Niebieskimi strzałkami oznaczono poszczególne etapy biogenezy kanonicznej, natomiast żółtymi, zielonymi i brązowymi – niekanonicznej.

W sekwencji pri-miRNA mogą występować motywy, które wpływają na precyzję cięcia i efektywność tego procesu (rys. 4) (47, 56).



**Rysunek 4.** Schemat budowy pri-miRNA.

G – guanina, C – cytozyna, U – uracyl, H – nukleotyd niebędący guaniną, N – dowolny nukleotyd. Wykonano na podstawie: Kotowska-Zimmer i wsp., 2021 (47).

Precyzja cięcia może być kontrolowana przez obecny w dolnej części trzonu motyw GHG, który ułatwia wiązanie RNA. Miejsce cięcia jest wyznaczane poprzez odległość od połączenia podstawy (miejsca przejścia trzonu w regiony flankujące) – około 13 par zasad od strony 5' końca oraz około 11 od strony 3' końca (47, 49, 51). Motyw UG w sekwencji flankującej od końca 5' wraz z motywem UGU w pętli terminalnej rozpoznawany jest przez DGCR8 i ułatwia pozycjonowanie pri-miRNA. Z kolei motyw CNNC znajdujący się na przeciwnej sekwencji flankującej oddziałuje z kofaktorem SRSF3 (*serine/arginine-rich splicing factor 3*), co zapewnia ustawienie Droshy w prawidłowej orientacji (57). Warto jednak zaznaczyć, że motywy te nie są obecne we wszystkich prekursorach. Cięcie pri-miRNA może być także wzmacniane poprzez obecność innego miRNA w obrębie tego samego klastra. Dobrym przykładem jest tutaj pri-miR-451, którego przetwarzanie, ze względu na krótki trzon o długości 17 par zasad i małą pętlę, jest wspomagane przez obecność pri-miR-141 na drodze biogenezy niekanonicznej (58).

W kolejnym etapie pre-miRNA jest transportowany z jądra komórkowego do cytoplazmy przez białko transportowe eksportynę 5 (ang. *exportin-5*, XPO5) tworzącą kompleks z białkiem RanGTP (59, 60). RanGTP składa się z białka Ran (*ras-related nuclear*

*protein*) związanego z cząsteczką guanozynotrójfosforanu (ang. *guanosine triphosphate*, GTP) i odpowiada za wspomaganie transportu przez pory jądrowe. XPO5 wiąże pre-miRNA i ułatwia transport do cytoplazmy, natomiast co ciekawe, ostatnie doniesienia sugerują, że może także wspierać kompleks Mikroprocesora w przetwarzaniu niektórych pri-miRNA, na przykład pri-mir-19a (61).

W cytoplazmie, 2-nukleotydowe wystające końce pre-miRNA rozpoznawane są przez endonukleazę Dicer (RNAzę III), która wiąże się z prekursorem poprzez swoją domenę PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) i przecina strukturę w odległości około 21-25 nukleotydów od końca (rys. 4) (47, 56). Proces ten wspomagają dodatkowo białka TRBP (*transactivation response element RNA binding protein*) i PACT (*protein kinase R activator*) (62, 63). Efektem cięcia jest usunięcie pętli terminalnej i powstanie dupleksu miRNA-miRNA\*, składającego się z nici wiodącej oraz pasażerskiej (oznaczonej \*). Struktura ta posiada typowe 2-nukleotydowe wystające końce 3'. Cięcie przez Dicer może prowadzić do powstania heterogennej puli cząsteczek o zróżnicowanej długości, co skutkuje również zmiennością sekwencji regionu źródłowego. Kolejno, nić wiodąca zostaje inkorporowana do białka z rodziny Argonaute (Ago) 1-4 w procesie wspieranym przez białka chaperonowe. Nić pasażerska wraz z niezwiązanymi nićmi wiodącymi są rozpoznawane i cięte przez białko Ago-2 oraz degradowane. Proporcja uwalnianych nici zależna jest od typu komórki, organizmu i warunków środowiskowych, a decyzja o wyborze nici wiodącej i pasażerskiej zależy od stabilności termodynamicznej dupleksu i składu nukleotydowego. Uważa się, że nić o słabszym wiązaniu na końcu 5' oraz posiadająca w pierwszej pozycji uracyl jest najczęściej wybierana jako nić wiodąca (64). Nić wiodąca wraz z białkiem Ago tworzy kompleks RISC (*RNA-induced silencing complex*), który rozpoznaje docelowe mRNA na podstawie komplementarności sekwencji miRNA. Efektem jest zahamowanie translacji albo degradacja transkryptu. W przypadku degradacji, białka z rodziny TNRC6 (*trinucleotide repeat containing protein 6*) wiążą się z Ago i rekrutują kompleksy odpowiedzialne za deadenylację (usuwanie ogona poliadenylowego) oraz usuwanie czapeczki guanylowej w mRNA. Powoduje to destabilizację transkryptu, a następnie jego degradację przez egzorybonukleazę XRN1 (*5'-3' exoribonuclease 1*) (65).

Niekanoniczna biogeneza podzielona jest na niezależną od Drosha i niezależną od Dicer. Ścieżkę niezależną od Dicer przechodzi jako dotychczas jedyny, wspomniany już wcześniej pri-miRNA-451 obecny u kręgowców. Jako zbyt krótki prekursor, po wyeksportowaniu do cytoplazmy, wbudowywany jest bezpośrednio do Ago-2, który przycina nić 3' około 10-11 nukleotydów od końca. Kolejno cząsteczka ta staje się substratem dla



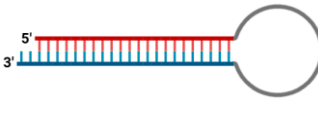
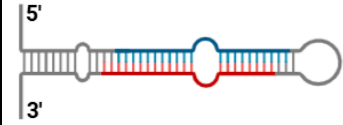
nukleazy PARN (*poly(A)-specific ribonuclease*), która docina koniec 3' generując w ten sposób jedynie nić wiodącą (66, 67). Szlak biogenezy niezależnej od Drosha przechodzą cząsteczki zwane mirtronami. Te nietypowe miRNA są kodowane w niekodujących fragmentach genów – intronach, w związku z tym przetwarzane są podczas splicingu przez spliceosom. Powstałe prekursor, podobnie jak pre-miR-451, charakteryzują się krótkim trzonem, w związku z tym ulegają rozgałęzieniu. Transportowane do cytoplazmy, podlegają dalszym etapom klasycznej obróbki. Przykładowym mirtronem jest miR-1224, będący biomarkerem nowotworowym (47, 67, 68). Obróbki przez Drosha nie wymagają także struktury nazwane endo-shRNA (*endo-short hairpin RNA*). Cząsteczki te tworzą endogenne struktury spinki do włosów i nie posiadają charakterystycznych jednoniciowych sekwencji flankujących, w związku z czym przypominają formy prekursorowe. Są bezpośrednio transportowane z jądra do cytoplazmy poprzez eksportynę 1. Po cięciu przez Dicer, do Ago inkorporowane są jedynie nici ramienia 3p, ze względu na obecność czapeczki metyloguanylowej na końcu 5'. Przykładowym endo-shRNA jest miR-320 (49, 69). Obróbce niezależnej od Drosha ulegają także miRNA pochodzące z małych jąderkowych RNA (ang. *small nucleolar RNAs*, snoRNA) oraz z transportowych RNA (ang. *transfer RNA*, tRNA) (47, 49).

## 2.2. Narzędzia technologii RNAi

W ciągu ostatnich dekad badania nad zjawiskiem RNAi doprowadziły do opracowania trzech narzędzi opartych na tym mechanizmie – siRNA, shRNA (ang. *short hairpin RNA*, krótkie RNA o strukturze spinki do włosów) oraz sztuczne miRNA (ang. *artificial miRNA*, amiRNA) (tab. 1). Cząsteczki te badane są szczególnie intensywnie pod kątem potencjalnego wykorzystania w terapii genowej.

**Tabela 1.** Porównanie narzędzi RNAi.

Wykonano na podstawie: Kotowska-Zimmer i wsp., 2021 (47).

| Narzędzie    | siRNA                                                                             | shRNA                                                                              | amiRNA                                                                              |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Struktura    |  |  |  |
| Odpowiednik  | miRNA                                                                             | pre-miRNA                                                                          | pri-miRNA                                                                           |
| Długość [nt] | 21-22                                                                             | 60                                                                                 | ~ 140-310                                                                           |
| Parowanie    | pełna komplementarność                                                            | pełna komplementarność                                                             | możliwe pętle i niesparowane nukleotydy                                             |
| Obróbka      | -                                                                                 | Dicer                                                                              | Drosha, Dicer                                                                       |
| Ekspresja    | przejściowa                                                                       | przejściowa/stabilna                                                               | przejściowa/stabilna                                                                |
| Nośnik       | lipid                                                                             | wektor                                                                             | wektor                                                                              |
| Promotor     | -                                                                                 | Pol III                                                                            | Pol II                                                                              |
| Dostarczanie | wielokrotne                                                                       | jednorazowe                                                                        | jednorazowe                                                                         |
| Toksyczność  | niska                                                                             | wysoka                                                                             | niska                                                                               |

siRNA znane są od 2001 roku, kiedy to grupa Thomasa Tuschla zastosowała egzogenne, syntetycznie zaprojektowane siRNA do wyciszania ekspresji genów w ssaczych liniach komórkowych (70). Strukturalnie cząsteczki te przypominają dojrzałe miRNA, ponieważ są to dwuniciowe RNA o długości ok. 22 par zasad z charakterystycznymi, wystającymi końcami 3' rozpoznawanymi przez elementy komórkowej maszynerii RNAi. Perfekcyjna komplementarność względem docelowego mRNA powoduje, że mechanizm ich działania polega na degradacji transkryptu. Dzięki możliwości zaprojektowania dowolnej sekwencji, siRNA pozwalają na wyciszenie praktycznie każdego genu, co czyni je potężnym narzędziem zarówno w badaniach podstawowych, jak i w terapii genowej. Projektowanie skutecznych siRNA wymaga jednak uwzględnienia szeregu czynników, w tym stabilności termodynamicznej dupletu oraz zawartości par GC, co wpływa na wydajność i specyficzność wyciszania ekspresji genu. Dostarczane do komórek, cząsteczki te nie przechodzą obróbki komórkowej przez Drosha i Dicer. Chociaż siRNA, ze względu na wysoką specyficzność

działania, w teorii stanowią idealne narzędzie do terapii genowej, w praktyce ich zastosowanie napotyka ograniczenia. Częsteczki te podatne są na degradację przez nukleazy, przez co efekt ich działania jest przejściowy i wymagają wielokrotnego podawania w ciągu życia pacjenta. Ponadto, siRNA mogą wzbudzać wrodzoną odpowiedź immunologiczną poprzez szlaki zależne albo niezależne od receptorów Toll-podobnych (ang. *Toll-like receptors*, TLR), co wpływa negatywnie ich bezpieczeństwo. Aby zminimalizować te ograniczenia, opracowano szereg modyfikacji chemicznych, które poprawiają stabilność, zmniejszają immunogenność i zwiększają skuteczność siRNA. Jednym z przykładów jest 2'-O-metylacja, polegająca na dodaniu grupy metylowej do grupy hydroksylowej przy węglu 2' rybozy. Ta modyfikacja nie tylko wydłuża trwałość cząsteczki, ale również zmniejsza ryzyko aktywacji odpowiedzi immunologicznej (71–74). Obecnie na rynku znajduje się kilka zaaprobowanych przez FDA leków wykorzystujących siRNA. W 2018 roku został zatwierdzony Patisiran, jako pierwszy na świecie terapeutyk wykorzystujący technologię RNAi w terapii dziedzicznej amyloidozy transtyretynowej. W 2020 roku zatwierdzono natomiast Givosiran w leczeniu pacjentów z ostrą porfirią wątrobową (75). W przypadku badań klinicznych, obecnie testuje się około 60 siRNA w leczeniu różnych schorzeń, w tym HD (źródło: <https://clinicaltrials.gov/>).

Wspomniane wady siRNA stały się motorem do rozwoju kolejnych, bardziej trwałych i efektywnych narzędzi RNAi. Już rok po doniesieniach o pierwszym siRNA, opracowano shRNA. Te cząsteczki, przypominające endogenne pre-miRNA, wykorzystano po raz pierwszy do wyciszenia ekspresji genów w modelu *Drosophila melanogaster* oraz w ssaczych liniach komórkowych (76). shRNA zbudowane są z pętli terminalnej oraz trzonu o pełnej komplementarności, zakończonego dwunukleotydowym wystającym końcem 3'. Projektowane są tak, aby ulegały ekspresji pod silnymi promotorami polimerazy III RNA, takimi jak H1 albo U6, co umożliwia ich stabilną i długotrwałą ekspresję w komórce po dostarczeniu w odpowiednich wektorach. Ulegają obróbce jedynie przez Dicer, który docina je do dwuniciowych aktywnych dupleksów siRNA. Początkowo uznawane za niezwykle obiecujące w zastosowaniach terapeutycznych, shRNA szybko ujawniły jednak istotne ograniczenia związane z toksycznością przy nadmiernej ekspresji. W modelach zwierzęcych zaobserwowano zmniejszoną przeżywalność po podaniu shRNA do prąkowia a także przy ekspresji w innych organach (77–82). Zgłębienie tego problemu pozwoliło wysnuć wnioski, iż toksyczność ta wynika z nadmiernego obciążenia i wysycenia maszyneryi komórkowej przetwarzającej RNA. Nadekspresja shRNA prowadzi do konkurencji z endogennymi pre-miRNA o kluczowe białka przetwarzające i transportujące, takie jak Dicer, TRBP, PACT

czy eksportyny. W efekcie dochodzi do zaburzenia homeostazy komórkowej – obniżeniu ulega poziom funkcjonalnych miRNA, a akumulujące się formy prekursorowe dodatkowo nasilają deregulację procesów komórkowych (47, 80, 83). Problem toksyczności shRNA stał się impulsem do optymalizacji konstrukcji i dawkowania tej cząsteczki, ale także do opracowania kolejnego narzędzia – amiRNA.

amiRNA, określane jako shRNA drugiej generacji, znane są także pod nazwami shRNA-miR, miR-shRNA, czy miRNA mimics. Konstrukcyjnie przypominają naturalnie występujące pri-miRNA, z jednoniciowymi sekwencjami flankującymi oraz długim trzonem w którym dopuszczalne są pętle oraz niesparowane nukleotydy. Rdzeń konstrukt stanowi sekwencja siRNA zaprojektowana względem dowolnego docelowego mRNA, osadzona w szkieletcie (kadłubie) naturalnego pri-miRNA. amiRNA zostały zaprojektowane tak, aby włączać się w szlak biogenezy miRNA już na jego najwcześniejszym etapie, co umożliwia ich przetwarzanie przez całą endogenną maszynę RNAi (47, 84). Pierwsze doniesienia o zastosowaniu amiRNA pochodzą z 2006 roku i dotyczą ich użycia do wyciszania ekspresji genów w modelach roślinnych (85). Narzędzie to zostało jednak szybko zaadaptowane do wykorzystania w systemach zwierzęcych, a szczególnie ssaczych. Podobnie jak shRNA, amiRNA mogą być dostarczane do komórek przy pomocy różnych wektorów, co umożliwia ich długotrwałą ekspresję (47, 84). Ekspresja kontrolowana jest przez silne promotory polimerazy II, takie jak CMV (ang. *cytomegalovirus promoter*), CAG (ang. *cytomegalovirus early enhancer/chicken  $\beta$ -actin promoter/rabbit  $\beta$ -globin intron promoter*), czy EF1 $\alpha$  (ang. *elongation factor 1 alpha promoter*) (86). Zastosowanie promotorów polimerazy II umożliwia regulowaną, a także tkankowo- lub czasowo-specyficzną ekspresję, co pozwala na precyzyjne kierowanie aktywności amiRNA jedynie do wybranych tkanek albo komórek. Takie podejście znacząco zwiększa bezpieczeństwo systemu. amiRNA szybko okazały się być znacznie bezpieczniejszą alternatywą dla shRNA mimo porównywalnej efektywności w obniżaniu poziomu ekspresji genów (78, 79, 87, 88). Uważa się, że mniejsze ryzyko toksyczności tych cząsteczek wynika ze znacznie niższego stopnia saturacji endogennej maszyny przetwarzania miRNA. Mechanizm ten tłumaczy się zarówno niższą ekspresją amiRNA w porównaniu do shRNA (89), jak i ich większym podobieństwem strukturalnym do naturalnych pri-miRNA, co sprzyja ich efektywnemu i fizjologicznemu przetwarzaniu. amiRNA są bardzo dobrze tolerowane w organizmach modelowych (88), co otworzyło drogę do prac nad ich zastosowaniem w terapii genowej i możliwym wdrożeniem w leczeniu ludzi (47). Ze względu na swoją złożoność, projektowanie amiRNA stanowi istotne wyzwanie.

Jego sekwencja ma kluczowe znaczenie w przetwarzaniu, a błędne zaprojektowanie amiRNA skutkuje jego nieprawidłową obróbką, prowadzącą do uwalniania heterogennej puli siRNA o zmiennych długościach i sekwencjach, co z kolei może wpływać na zmianę docelowego regionu działania (off-target). Dodatkowym ryzykiem jest możliwość wystąpienia zjawiska przełączania ramion (ang. *arm switching*) – procesu, w którym do Ago inkorporowana jest nie pasażerska zamiast wiodącej (90). Obecnie nie istnieją uniwersalne zasady projektowania amiRNA, gdyż każdy naturalnie występujący pri-miRNA posiada unikatowe cechy, natomiast warto uwzględnić charakterystyczne motywy strukturalne występujące w naturalnych pri-miRNA wpływające na obróbkę przez maszynę komórkową (rys. 4). Istotnym parametrem jest również entropia Shannona, która w sposób numeryczny opisuje zmienność struktury drugorzędowej RNA w danym regionie. Jej wysoka wartość wskazuje na duże prawdopodobieństwo istnienia alternatywnych, konkurencyjnych struktur, natomiast niska entropia oznacza mniejszą zmienność sekwencji i większą stabilność strukturalną, co zwiększa prawdopodobieństwo precyzyjnego rozpoznania i cięcia przez Drosha, sprzyjając prawidłowemu przetwarzaniu amiRNA (47, 56, 91, 92). W badaniach wykorzystujących amiRNA w potencjalnych terapiach najczęściej wykorzystywanymi kadrubami są te pochodzące od ludzkich pri-miR-30a, pri-miR-155, oraz przetwarzany w sposób niekanoniczny pri-miR-451, głównie ze względu na charakterystyczną nieobecność sekwencji pasażerskiej, co ma wpływ na specyficzność i bezpieczeństwo (47). Obecnie w badaniach klinicznych testowanych jest siedem terapeutycznych amiRNA, obejmujących nie tylko leczenie HD, ale również anemii sierpowatej, dystrofii mięśniowej oczno-gardłowej, padaczki skroniowej i stwardnienia zanikowego bocznego (źródło: <https://clinicaltrials.gov/>).

Kluczowym aspektem w projektowaniu terapii genowej jest dostarczanie potencjalnego terapeutu. W komórkach krótkie DNA czy RNA mogą ulec szybkiej degradacji, w związku z czym należy dobrać taki nośnik, aby nie tylko zapewnić dostarczenie cząsteczki w określone dotknięte chorobowo miejsca, ale także zapewnić jej stabilność i możliwie jak najdłuższe działanie. Z kolei sam nośnik powinien być jak najmniej toksyczny i immunogenny (93, 94).

W przypadku siRNA, cząsteczki te najczęściej dostarczane w lipidach, jednak wraz z postępem badań coraz większą uwagę skupiają systemy dostarczania oparte na nanocząsteczkach albo egzosomach, które zapewniają nie tylko większą stabilność cząsteczki, ale także jej precyzyjne dostarczenie w określone miejsce w organizmie (84, 94–96).

shRNA i amiRNA zazwyczaj dostarczane są w postaci konstruktyw genetycznych, których nośnikiem są różnego rodzaju wektory wirusowe, stanowiące obecnie standard w terapii genowej. Wśród nich najczęściej stosowane są wspomniane wcześniej wirusy związane z adenowirusami (ang. *adeno-associated viruses*, AAV, a w szczególności te rekombinowane – rAAV), ale także adenowirusy i lentiwirusy (47, 97).

Adenowirusy, należące do rodziny *Adenoviridae*, wykorzystywane są jako nośniki informacji genetycznej już od lat 80. ubiegłego wieku (98). Należą do grupy wirusów bezosłonkowych, z genomem w postaci dwuniciowego DNA. Łatwo wnikają do komórek dzielących się oraz niedzielących się, lecz nie wbudowują swojego materiału genetycznego w genom gospodarza. Skutkuje to przejściową ekspresją transgeny, co może ograniczać skuteczność jednorazowego podania, zwłaszcza w szybko dzielących się komórkach. Adenowirusy charakteryzują się wysoką immunogennością, jednak obecne modyfikacje pozwalają na jej znaczące ograniczenie (47, 99, 100).

Lentiwirusy należą do retrowirusów, których przykładem jest najczęściej wykorzystywany ludzki wirus niedoboru odporności (ang. *human immunodeficiency virus*, HIV) pozbawiony zdolności do replikacji. W przeciwieństwie do adenowirusów, charakteryzują się jednoniciowym genomem RNA. Istotną cechą dającą przewagę nad adenowirusami jest ich integracja do genomu gospodarza, co pozwala na długotrwałą, stabilną ekspresję w komórkach dzielących i niedzielących się. Jednakże integracja ta wiąże się z ryzykiem wbudowania wirusowego DNA w pobliżu protoonkogenów, co może prowadzić do mutagenyzy insercyjnej i ich aktywacji. W konsekwencji może to prowadzić do niekontrolowanej proliferacji komórek i rozwoju zmian nowotworowych (47, 101, 102).

Za najbardziej obiecujące wektory w kontekście terapii wykorzystującej technologię RNAi uznaje się należące do rodziny *Parvoviridae* wektory AAV. Ich nazwa wynika z faktu, iż do replikacji wymagają obecności wirusa pomocniczego, jakim jest najczęściej adenowirus. AAV są niewielkimi wirusami bezosłonkowymi, o genomie zbudowanym z jednoniciowego DNA zakończonego odwróconymi sekwencjami powtórzonymi (ang. *inverted terminal repeats*, ITR). AAV mogą integrować do genomu gospodarza, natomiast zazwyczaj przybierają formę episomów. Rekombinowane AAV zachowują tę samą strukturę kapsydu co wirusy typu dzikiego, jednak w odróżnieniu od nich, ich genomy pozbawione są sekwencji kodujących białka wirusowe. W ich miejscu umieszcza się sekwencje cząsteczek terapeutycznych lub genów. Ograniczeniem w wykorzystaniu AAV jest, oprócz wysokich kosztów produkcji, ich

pojemność – wynosi jedynie niecałe 5 tysięcy par zasad, co jednak nie jest problemem w przypadku niewielkich kaset ekspresyjnych amiRNA. Dotychczas zidentyfikowano kilkanaście serotypów AAV, charakteryzujących się odmiennym tropizmem, czyli preferencją do infekowania określonych typów komórek. Wirusy te charakteryzują się niską patogennością — nie są znane choroby wywoływane przez te wirusy u ludzi — co, wraz z ich zdolnością do długotrwałej ekspresji transgenów, czyni je doskonałymi nośnikami dla terapii genowej i RNAi. Obecnie wektory AAV są najczęściej wykorzystywanymi nośnikami wirusowymi zarówno w badaniach przedklinicznych, jak i klinicznych, w tym w terapii HD (47, 103–105).

### **3. Eksperymentalne terapie genowe HD**

#### **3.1. Aktualne badania kliniczne**

Obecnie prowadzone są badania kliniczne mające na celu opracowanie skutecznych terapii przyczynowych oraz objawowych dla HD. Testowanie kliniczne podzielone jest na cztery fazy i stanowi istotną część procesu poprzedzającego wprowadzenie leku do obiegu. Pierwsza, najkrótsza faza badań, ma na celu wstępne sprawdzenie bezpieczeństwa oraz optymalizację dawki farmaceutyku. Przeprowadzana jest na stosunkowo niewielkiej grupie uczestników. Druga faza obejmuje kilkuset pacjentów i pozwala na ocenę skuteczności terapii oraz identyfikację potencjalnych działań niepożądanych. Trzecia faza, trwająca nawet kilka lat, może obejmować kilka tysięcy pacjentów i ma kluczowe znaczenie w ocenie efektywności leku na dużą skalę. Do ostatniego etapu badań klinicznych, fazy czwartej, przechodzi jedynie około 30% testowanych leków. Na tym etapie monitorowane jest długoterminowe bezpieczeństwo i skuteczność terapii po jej wprowadzeniu na rynek. Cały proces badań klinicznych jest długotrwały i może trwać nawet do 15 lat (źródło: <https://www.fda.gov/>). Niestety, pomimo wieloletnich wysiłków i ponad 99 rozpoczętych badań klinicznych, wskaźnik sukcesu testowanych terapii w chorobie Huntingtona pozostaje niski. Do 2017 roku wynosił zaledwie 3,5%, a przyczyny niepowodzeń leżą w braku skuteczności leków oraz ich toksyczności (106).

W tabeli 2 przedstawiono aktualnie trwające badania kliniczne nad terapiami HD. Obecnie najbardziej zaawansowane pod względem fazy badań są leki niskocząsteczkowe. Dzięki niewielkim rozmiarom mogą one przekraczać barierę krew-mózg, co umożliwia ich podawanie doustne i tym samym zwiększa komfort pacjentów. Dodatkową zaletą są też

stosunkowo niskie koszty ich produkcji. Większość z tych substancji (na przykład pridopidyna) nie oddziałuje jednak bezpośrednio na przyczynę choroby, a jedynie łagodzi jej objawy. Wyjątkiem jest PTC518 – niskocząsteczkowy modulator splicingu mRNA *HTT*, opracowany przez firmę PTC Therapeutics. Jego mechanizm działania polega na wpływie na składanie RNA poprzez włączenie pseudoeksonu, zawierającego przedwczesny kodon STOP, co prowadzi do aktywacji mechanizmu NMD. W rezultacie dochodzi do nieselektywnego obniżenia poziomu *HTT*. Lek ten charakteryzuje się dobrą dystrybucją w organizmie człowieka, a wstępne wyniki badań są obiecujące. PTC518 okazał się dobrze tolerowany przez pacjentów podczas 21-dniowego stosowania. Zaobserwowano także 60% redukcję ekspresji nieprawidłowego transkryptu *HTT* oraz 35% obniżenie poziomu białka we krwi (107). Po roku terapii poziom *HTT* zmniejszył się o 43% w płynie mózgowo-rdzeniowym (ang. *cerebrospinal fluid*, CSF) i krwi, a także odnotowano redukcję progresji objawów motorycznych (źródło: <https://ir.ptcbio.com>). Co istotne, w badaniach klinicznych testowany był także lek o podobnym działaniu jak PTC518 – branaplam. Ta opracowana przez firmę Novartis pochodna pirydazyny początkowo stosowana była eksperymentalnie w terapii rdzeniowego zaniku mięśni (ang. *spinal muscular atrophy*, SMA). W 2020 roku pojawiły się pierwsze doniesienia wskazujące, że branaplam obniża poziom *HTT*, w związku z tym zdecydowano o rozpoczęciu badań klinicznych nad jego potencjalnym zastosowaniem w terapii HD (VIBRANT-HD). Niestety, w 2022 roku zdecydowano o zakończeniu badań, ponieważ u pacjentów zaobserwowano objawy neuropatii obwodowej oraz podwyższony poziom lekkiego polipeptydu neurofilamentów (ang. *neurofilament light polypeptide*, NfL) – biomarkera wskazującego na uszkodzenie komórek nerwowych. Uznano, że skutki uboczne były spowodowane działaniem leku, co doprowadziło do przerwania dalszego badania branaplamu w terapii HD (źródło: <https://www.novartis.com>).



**Tabela 2.** Aktualne badania kliniczne terapii HD (stan na 02.2025r.).Źródło: <https://clinicaltrials.gov/>

| Numer       | Firma                                                          | Faza | Nazwa leku        | Rodzaj                                        | Podanie                            | Mechanizm działania                     |
|-------------|----------------------------------------------------------------|------|-------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| NCT06585449 | Alnylam Pharmaceuticals                                        | 1    | ALN-HTT02         | siRNA                                         | Iniekcja dokanałowa                | Nieselektywne obniżenie poziomu HTT     |
| NCT06024265 | ExoRNA Bioscience                                              | 1    | ER2001            | amiRNA                                        | Iniekcja dożylna                   | Obniżenie poziomu HTT                   |
| NCT05243017 | UniQure Biopharma B.V.                                         | 1b/2 | AMT-130           | amiRNA                                        | Bezpośrednia iniekcja do prążkówia | Obniżenie poziomu HTT                   |
| NCT05541627 | BrainVectis                                                    | 1/2  | AB-1001           | Transgen CYP46A1                              | Bezpośrednia iniekcja do prążkówia | Poprawa metabolizmu cholesterolu        |
| NCT05822908 | Vico Therapeutics B. V.                                        | 1/2  | VO659             | ASO                                           | Iniekcja dokanałowa                | Allelo-selektywne obniżenie poziomu HTT |
| NCT06826612 | Spark Therapeutics Inc.                                        | 1/2  | SPK-10001         | amiRNA                                        | Bezpośrednia iniekcja do prążkówia | Nieselektywne obniżenie poziomu HTT     |
| NCT05686551 | Hoffmann-La Roche                                              | 2    | Tominersen        | ASO                                           | Iniekcja dokanałowa                | Nieselektywne obniżenie poziomu HTT     |
| NCT05358717 | PTC Therapeutics                                               | 2    | PTC518            | Niskocząsteczkowy modulator splicingu         | Doustnie                           | Obniżenie poziomu HTT                   |
| NCT06469853 | Medibiofarma S.L.                                              | 2    | MBF-015           | Niskocząsteczkowy inhibitor HDAC2             | Doustnie                           | Poprawa funkcji synaps                  |
| NCT04478734 | Fundación Pública Andaluza para la gestión de la Investigación | 2    | Tiamina i biotyna | Witaminy                                      | Doustnie                           | Poprawa metabolizmu energetycznego      |
| NCT05509153 | Western Sydney Local Health District                           | 2    | N-acetylocysteina | Niskocząsteczkowy prekursor glutationu        | Doustnie                           | Redukcja symptomów                      |
| NCT05655520 | Sage Therapeutics                                              | 3    | SAGE-718          | Niskocząsteczkowy modulator NMDA              | Doustnie                           | Redukcja symptomów                      |
| NCT04556656 | Prilenia                                                       | 3    | Pridopidyna       | Niskocząsteczkowy aktywator receptora sigma-1 | Doustnie                           | Redukcja symptomów                      |
| NCT04400331 | Neurocrine Biosciences                                         | 3    | Walbenazyna       | Niskocząsteczkowy inhibitor VMAT2             | Doustnie                           | Redukcja symptomów                      |
| NCT06097780 | Cellavita                                                      | 3    | Nestacell®        | Komórki macierzyste                           | Dożylnie                           | Produkcja czynników neurotroficznych    |

Inne obecnie testowane w badaniach klinicznych podejścia koncentrują się na działaniu bezpośrednio na transkrypt *HTT*, tak jak PTC518. Mechanizm działania tych substancji jest jednak odmienny. Firmy Vico Therapeutics oraz Hoffmann-La Roche opracowały oligonukleotydy antysensowe (ang. *antisense oligonucleotides*, ASO). ASO to krótkie syntetyczne oligonukleotydy RNA albo DNA o długości do 20 nukleotydów, które łączą się na zasadzie komplementarności z docelowym mRNA i zapobiegają powstawaniu białka poprzez kilka mechanizmów. Najpowszechniejszym jest degradacja mRNA, która następuje po rozpoznaniu przez utworzoną hybrydę DNA:RNA przez rybonukleazę H1. Większość leków opartych na ASO zatwierdzonych przez FDA wykorzystuje właśnie ten mechanizm. ASO mogą działać także poprzez utworzenie przeszkody sterycznej. W tym przypadku degradacja transkryptu nie następuje, a translacja jest zahamowana poprzez niemożliwość związania się podjednostek rybosomalnych. Innym mechanizmem działania jest modulacja splicingu. Niestety, ASO, podobnie jak leki niskocząsteczkowe, wymagają częstego podawania i nie przynoszą trwałego efektu terapeutycznego, lecz jedynie czasową poprawę. Jest to spowodowane ich ograniczoną stabilnością – degradowane są przez enzymy nukleolityczne i charakteryzują się krótkim okresem półtrwania. Dodatkowo, nie posiadają zdolności do przenikania bariery krew-mózg. W celu przedłużenia ich trwałości oraz obniżenia reakcji immunologicznej stosuje się liczne modyfikacje chemiczne (108). Testowane w badaniach klinicznych VO659 i tominersen wiążą się z mRNA genu *HTT*. VO659 działa allelo-selektywnie, wiążąc się do wydłużonych ciągów powtórzeń CAG (109), co czyni go potencjalnie skutecznym w leczeniu innych chorób poliQ, takich jak SCA1 oraz SCA3. Zakłada się jego podawanie maksymalnie raz na pół roku. W 2024 roku doniesiono o pozytywnych wynikach fazy 1/2a, wskazujące na 28% redukcję poziomu HTT w CSF i ogólną dobrą tolerancję leku przez pacjentów (źródło: <https://vicotx.com/>). Tominersen jest natomiast niealleloselektywnym, chemicznie zmodyfikowanym 20-nukleotydowym ASO, w pełni komplementarnym do mRNA *HTT*, który obniża poziom zarówno prawidłowego, jak i zmutowanego białka. Początkowo, podczas fazy 1/2 (GENERATION HD1) zaobserwowano obiecujące wyniki po podawaniu leku dokanałowo co 8 tygodni, w postaci znacznego, zależnego od dawki obniżenia poziomu HTT (maksymalnie do 42%) w CSF pacjentów (110). W 2023 roku zaprzestano dalszych badań na badanej grupie osób, w związku z gorszym stanem w porównaniu do pacjentów przyjmujących *placebo* (111). Dodatkowo zaobserwowano występowanie efektów ubocznych. W związku z tym podjęto decyzję o wznowieniu badań nad tominersenem w terapii pacjentów wczesnoobjawowych, u których występuje mniejsze

obciążenie chorobą (GENERATION HD2) (112). W tym badaniu tominersen podawany jest co 4 miesiące w zmniejszonej dawce w porównaniu do poprzednich badań. Na ostateczne wyniki trzeba jednak poczekać, bowiem zakończenie badań planowane jest na 2026 rok (źródło: <https://clinicaltrials.gov/>).

VO659 nie jest jedynym allelo-selektywnym ASO. Podobne podejście zostało zaproponowane również przez firmę Wave Life Sciences. WVE-003 celuje w polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP) rs362273 (SNP3), który występuje wyłącznie w nieprawidłowym mRNA *HTT*. Dzięki temu ASO przyłącza się komplementarnie jedynie do zmutowanego wariantu, a następnie zapobiega jego translacji (113). W czerwcu 2024 roku Wave Life Sciences poinformowało o sukcesie badań w fazie 1b/2a (SELECT-HD). Podawanie leku co 8 tygodni skutkowało obniżeniem poziomu zmutowanej *HTT* w CSF pacjentów do 46%, przy jednoczesnej dobrej tolerancji terapii i braku poważnych efektów ubocznych. U pacjentów zaobserwowano także spowolnienie atrofii jądra ogoniastego, sugerując tym samym potencjalny efekt neuroprotektoryjny (114). Niestety terapia ta byłaby skuteczna tylko u ograniczonej grupy chorych (~40 % pacjentów HD) posiadających SNP3 (113).

Na szczególną uwagę zasługują podejścia terapeutyczne wykorzystujące technologię RNAi.

### 3.2. Podejścia terapeutyczne wykorzystujące RNAi

Obecnie w badaniach klinicznych znajdują się cztery narzędzia wykorzystujące technologię RNAi w terapii genowej HD, w tym jedno oparte na siRNA, oraz trzy wykorzystujące amiRNA (tab. 2). Cząsteczki te prowadzą do nieselektywnego wyciszania ekspresji genu *HTT*. ALN-HTT02, opracowany przez firmę Alnylam Therapeutics, to w pełni komplementarny do mRNA *HTT* syntetyczny siRNA, skoniugowany z 2'-O-heksadecylem (C16). Ta modyfikacja zwiększa stabilność cząsteczki i wydłuża jej czas działania, co jest kluczowe, ponieważ siRNA, podobnie jak ASO, mają stosunkowo krótką trwałość. ALN-HTT02 celuje w ekson 1 *HTT*, a pierwsza faza badań klinicznych rozpoczęła się w listopadzie 2024 roku. Celem badań jest ocena bezpieczeństwa i tolerancji po jednorazowej iniekcji dokanałowej (źródło: <https://www.alnylam.com/>).

Nowatorska strategia została zaprojektowana przez ExoRNA Bioscience. ER2001 jest to plazmidowy konstrukt genetyczny, który koduje zarówno nieselektywne amiRNA o kadłubie

miR-155 skierowane na ekson 1 *HTT*, jak i neuronotropowy fragment glikoproteiny wirusa wścieklizny (ang. *rabies virus glycoprotein*, RVG). To rozwiązanie, podawane dożylnie, pozwala na przeprogramowanie komórek wątroby w taki sposób, aby samodzielnie pakowały cząsteczki w egzosomy — pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, które naturalnie pełnią funkcję transportową — umożliwiając w ten sposób dostarczanie amiRNA do mózgu. Dzięki znacznikowi RVG, egzosomy efektywnie wnikają do neuronów, co zwiększa skuteczność terapii (115, 116). ER2001 obecnie znajduje się na etapie rekrutacji uczestników (źródło: <https://clinicaltrials.gov/>).

Strategię wykorzystującą amiRNA dostarczane w wektorze AAV rozwijają Spark Therapeutics i UniQure Biopharma. Oba te podejścia są nieselektywne. Z uwagi na barierę krew-mózg, terapie oparte na AAV wymagają precyzyjnego podania do prądkowia poprzez neurochirurgiczną procedurę infuzji, obejmującą jądro ogoniaste i skorupę. Jest to zabieg niezwykle inwazyjny, powiązany z ryzykiem powikłań takich jak uszkodzenia mózgu, krwotoki czy reakcje zapalne, a także generujący wysokie koszty. W przypadku terapii SPK-10001 (Spark Therapeutics) wiadome jest, że terapeutyk, dostarczany za pomocą AAV o serotypie 9, celuje w ekson 48 *HTT* (117). Badania kliniczne rozpoczęły się na początku 2025 roku, tak więc ich wyniki pozostają jeszcze niedostępne (źródło: <https://clinicaltrials.gov/>). AMT-130 (znany także jako AAV5-miHTT), opracowany przez firmę UniQure, jest dostarczany za pomocą AAV o serotypie 5, charakteryzującym się wysokim tropizmem do neuronów oraz niską immunogennością (118). Podobnie jak SPK-10001 jest podawany jednorazowo, bezpośrednio do jądra ogoniastego i skorupy. Trwające obecnie badania kliniczne fazy 1/2 obejmują USA oraz Europę. Co istotne, w 2022 roku w Polsce przeprowadzono pierwszą neurochirurgiczną infuzję AMT-130. W połowie 2024 roku, po 24 miesiącach od rozpoczęcia badań, UniQure opublikowało wstępne wyniki, wskazujące na 80% spowolnienie progresji choroby u pacjentów po otrzymaniu wysokiej dawki tego amiRNA. Progresję HD mierzono na podstawie złożonego wskaźnika Unified Huntington's Disease Rating Scale (cUHDRS). Dodatkowo zaobserwowano znaczne obniżenie poziomu NfL w CSF. W związku z obiecującymi wynikami, UniQure otrzymało od FDA status zaawansowanej terapii medycyny regeneracyjnej (ang. *Regenerative Medicine Advanced Therapy*, RMAT). Otwiera to możliwość przyspieszenia badań klinicznych (114). Badania nad nieselektywnym AMT-130 nie zostały jeszcze zakończone, natomiast niosą dużą nadzieję dla pacjentów HD i ich rodzin.

### 3.3 Bezpieczeństwo terapii RNAi

Opracowanie skutecznej i bezpiecznej terapii wykorzystującej technologię RNAi dla chorób poliQ wiąże się z licznymi wyzwaniem naukowymi. Potencjalny terapeutyk powinien cechować się przede wszystkim wysoką efektywnością przy możliwie niskiej dawce. Obecnie przyjmuje się, że około 50% obniżenie poziomu nieprawidłowego białka jest wystarczające do osiągnięcia efektu terapeutycznego (119). Dodatkowo, metoda dostarczania terapeutyku musi być bezpieczna, niewywołująca odpowiedzi immunologicznej i jak najmniej inwazyjna dla pacjenta (120).

Ponadto, opracowanie terapii powinno uwzględniać minimalizację ryzyka wystąpienia efektów ubocznych związanych z niespecyficznym wyciszaniem genów, które mogłyby zakłócać prawidłowe funkcjonowanie komórek. Wspólną wadą wszystkich narzędzi genetycznych bazujących na oddziaływaniu Watsona-Cricka jest ich potencjalna zdolność do niespecyficznego wiązania się z innymi sekwencjami w transkryptomie, tzw. „off-target” (121, 122). Efekty uboczne narzędzi RNAi dzielą się na dwa główne mechanizmy. Pierwszy z nich obejmuje oddziaływania typu miRNA (ang. *miRNA-like*), pojawiające się w sytuacji nawet jedynie 7-nukleotydowej komplementarności regionu źródłowego (*seed*) względem sekwencji docelowej, znajdującej się najczęściej w 3' UTR. W takim przypadku siRNA może funkcjonować analogicznie do miRNA, prowadząc głównie do zahamowania translacji. Drugim mechanizmem są oddziaływania typu siRNA (ang. *siRNA-like*), które występują, gdy sekwencja siRNA jest w pełni komplementarna do transkryptu. Skutkuje to aktywacją degradacji mRNA. Co istotne, siRNA może wówczas wiązać się nie tylko z 3' UTR, ale również z innymi obszarami mRNA, co dodatkowo zwiększa ryzyko niepożądanych efektów off-target (123, 124).

Efekty off-target istotnie ograniczają wartość terapeutyczną cząsteczki, dlatego ich minimalizacja jest kluczowym elementem projektowania bezpiecznych terapii. Jedną z podstawowych strategii ograniczania ryzyka jest precyzyjne dawkowanie potencjalnego terapeutyku. W badaniach często stosuje się nadmiar cząsteczek względem poziomu transkryptu docelowego, co zwiększa ryzyko oddziaływań niespecyficznych. Optymalne dobranie możliwie najniższej dawki, zapewniającej skuteczne wyciszenie genu docelowego, pozwala na redukcję efektów off-target. Dodatkowo, takie podejście zmniejsza również ryzyko wystąpienia niespecyficznych efektów niezwiązanych z komplementarnością sekwencji, w tym ogranicza aktywację odpowiedzi immunologicznej (125). W przypadku siRNA, możliwe jest

także zastosowanie modyfikacji chemicznych zmniejszających niepożądane interakcje kompleksu RISC z transkryptami o częściowej komplementarności. Przykładem jest podstawienie 2'-O-metylorybozylowe w pozycji 2 nici wiodącej, czyli na początku regionu źródłowego, które powoduje ograniczenie efektów poza celem bez wpływu na skuteczność obniżania poziomu ekspresji docelowego genu (126). Skuteczną strategią jest także stosowanie puli różnych siRNA skierowanych przeciwko odmiennym regionom tego samego mRNA. Taka kombinacja znacząco ogranicza ryzyko wystąpienia efektów poza celem. Mechanizm ten wynika z niskiego stężenia każdej pojedynczej cząsteczki siRNA, które łącznie zapewniają skuteczne wyciszenie genu docelowego, natomiast różnice w sekwencjach źródłowych oraz rozproszenie stężeń minimalizują ryzyko niespecyficznego oddziaływania (127, 128).

Już podczas projektowania sekwencji siRNA można zminimalizować ryzyko wystąpienia efektów poza celem. Istnieją proste w obsłudze oprogramowania oferujące bioinformatyczne przewidywania miejsc niespecyficznego wiązania, takie jak NCBI BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*), algorytm Smitha-Watermana czy platforma siSPOTR (47, 124). Bardziej zaawansowane analizy wykorzystują oprogramowanie oparte na języku Python, jednak wymagają one znajomości podstaw programowania.

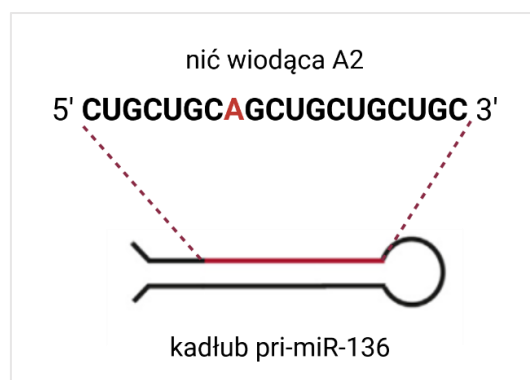
Niezwykle istotnym etapem weryfikacji bezpieczeństwa terapeutycznego RNAi jest ocena niespecyficzných efektów wywołanych jego wprowadzeniem do komórek. Istnieją różnorodne metody wykorzystywane do tego celu. Przykładową jest analiza ekspresji wybranych potencjalnych genów będących off-targetami – ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (ang. *Reverse Transcription quantitative PCR*, RT-qPCR). Poziom ekspresji można także sprawdzić wykorzystując niezwykle precyzyjne transkryptomiczne sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS), które umożliwia analizę ekspresji tysięcy genów w jednym czasie. Możliwe jest także wykorzystanie techniki Western blotting, w celu określenia poziomu białka. Są też w użyciu metody przesiewowe wykorzystujące mikromacierze. Należy jednak pamiętać o właściwym doborze punktów czasowych analizy, gdyż spadek poziomu białka może prowadzić do wtórnych zmian w ekspresji genów, które mogą wpływać na wynik analizy (124).

Bezpieczeństwo RNAi zależy także od prawidłowego docinania prekursorów miRNA, oraz kontrolowania ilości uwalnianej nici wiodącej i pasażerskiej. Nadmiar nici pasażerskiej zwiększa ryzyko jej inkorporacji do Ago i wyciszenia ekspresji niepożądanych genów. Dlatego w projektowaniu amiRNA istotny jest odpowiedni dobór kadłuba oraz sekwencji siRNA,

zapewniający prawidłowe przetwarzanie prekursora i minimalizację uwalniania nici pasażerskiej. Stosowane strategie obejmują między innymi osłabienie stabilności końca 5', projektowanie asymetrycznych siRNA z krótszą nicią pasażerską oraz wprowadzanie niesparowanych nukleotydów, zmieniających stabilność termodynamiczną duplexu, co sprzyja wybiórczemu inkorporowaniu nici wiodącej do Ago (47, 120, 129, 130).

Wraz z poznawaniem funkcji HTT, rośnie przekonanie o konieczności zachowania jej prawidłowej formy. W związku z tym kluczowe staje się opracowanie terapii allelo-selektywnej, celującej tylko w zmutowany transkrypt *HTT*. Niestety, zdecydowana większość obecnie testowanych podejść terapeutycznych opiera się na nieselektywnym obniżeniu ekspresji zmutowanej i prawidłowej formy *HTT*, co może skutkować wystąpieniem niepożądanych efektów ubocznych. Oprócz wspomnianych wyżej terapii eksperymentalnych testowanych w badaniach klinicznych, rozwijane są także nowatorskie strategie allelo-selektywne, których działanie jest oparte na różnych mechanizmach molekularnych. Poza wspomnianą wcześniej szeroko badaną RNAi oraz ASO, przedklinicznie testowane są między innymi nukleazy palca cynkowego (131, 132). Obiecujące wyniki uzyskują także badania wykorzystujące technologię precyzyjnej edycji genomu CRISPR-Cas (ang. *Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats Cas*). Wykorzystując różne warianty nukleazy Cas oraz zróżnicowane modele badawcze, możliwe jest precyzyjne wprowadzenie korekcji w genie *HTT*, co prowadzi do redukcji poziomu nieprawidłowego białka (133–137). Dodatkowo w kontekście badań nad terapią HD badane są także allelo-selektywne związki niskocząsteczkowe (138–140).

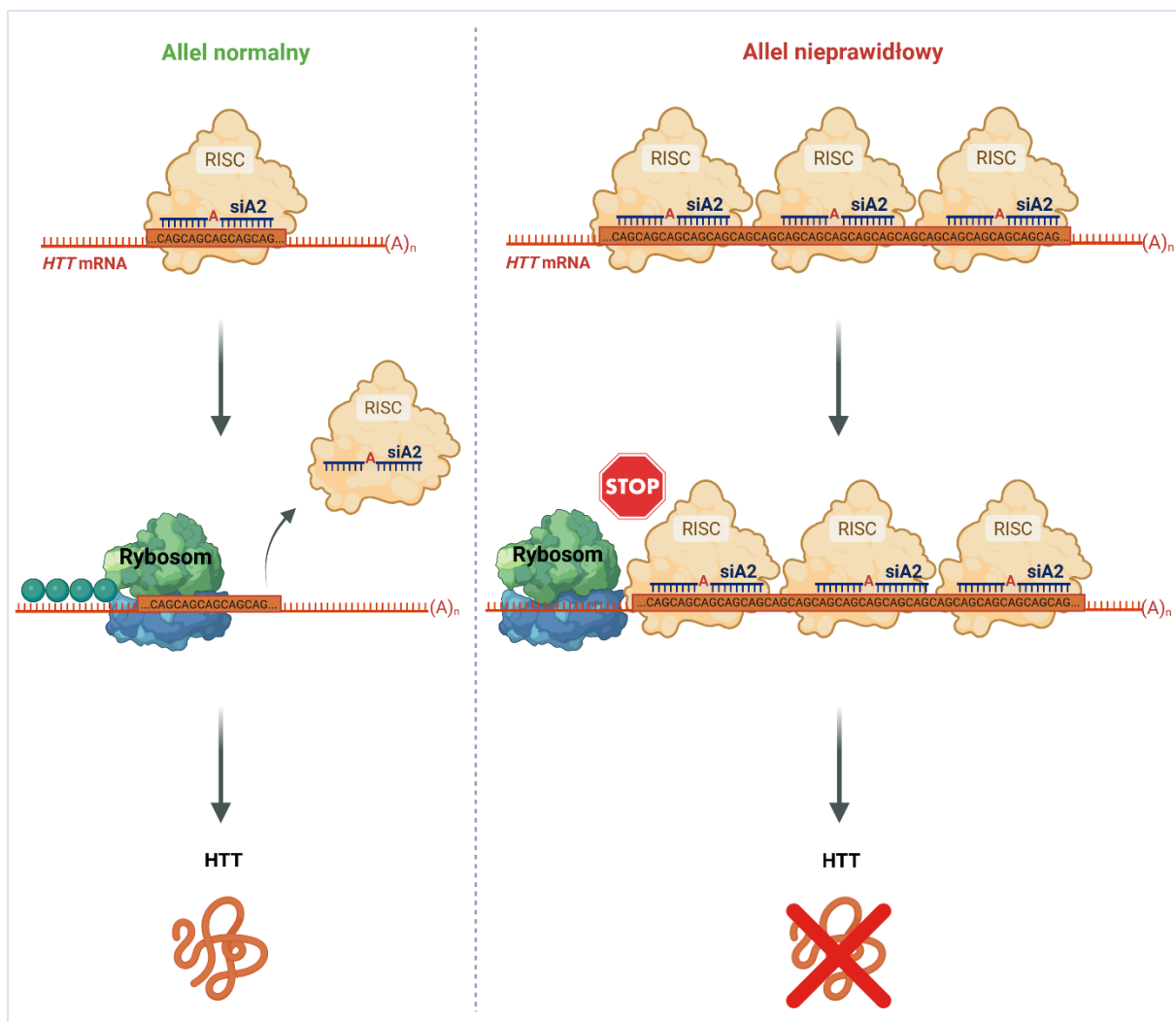
W Zakładzie Inżynierii Genomowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN opracowano amiRNA o nazwie amiR136-A2 (78). Cząsteczka ta składa się z sekwencji siRNA ukierunkowanej na powtórzenia CAG, osadzonej w kadłubie ludzkiego pri-miR-136 (rys. 5). Pojedyncza substytucja nukleotydowa U>A w pozycji 8 nici wiodącej zapewnia allelo-selektywne wyciszenie ekspresji *HTT*.



**Rysunek 5.** Schemat cząsteczki amiR136-A2.

Zakładany mechanizm działania tej cząsteczki opiera się na selektywnej inhibicji translacji poprzez kooperatywne wiązanie się wielu kompleksów RISC do zmutowanego transkryptu *HTT* (rys. 6). Wprowadzenie substytucji w cząsteczce efektorowej osłabia wiązanie kompleksu RISC z prawidłowym transkrypcem, co umożliwia rybosomowi usunięcie mniej stabilnych kompleksów RISC podczas translacji allelu zdrowego. W przypadku nieprawidłowego allelu, obecność wydłużonych powtórzeń CAG sprzyja akumulacji kompleksów RISC, co prowadzi do zatrzymania rybosomu i zahamowania translacji. W rezultacie, zmutowany allel ulega skutecznemu wyciszeniu, przy jednoczesnym zachowaniu ekspresji prawidłowego wariantu. W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano preferencyjne wyciszanie ekspresji zmutowanego *HTT* w mysim modelu HD. Uzyskano 50% obniżenie poziomu zmutowanego białka oraz zmniejszenie liczby agregatów HTT w prążkowiu. W trakcie 20-tygodniowej obserwacji nie odnotowano toksyczności ani aktywacji mikrogleju u myszy. W ten sposób po raz pierwszy przetestowano *in vivo* terapię allelo-selektywną ukierunkowaną na wydłużone powtórzenia CAG i wykazano jej wysoką skuteczność (78, 141).





Rysunek 6. Mechanizm selektywnej inhibicji translacji przez cząsteczkę A2.

## II Cel pracy

Mimo obiecujących wyników, strategia terapeutyczna wykorzystująca cząsteczkę amiR136-A2 wiąże się z kilkoma istotnymi ograniczeniami:

- skuteczne wyciszenie *HTT* w prążkowie i hipokampie osiągnięto jedynie przy zastosowaniu wysokiej dawki wektora AAV,
- stwierdzono niską efektywność wyciszenia *HTT* w korze mózgowej,
- cząsteczka A2 posiada 10 potencjalnie ryzykownych, w pełni komplementarnych sekwencji off-target, co może prowadzić do niepożądanego obniżenia poziomu ekspresji tych genów.

W związku z powyższym zaistniała potrzeba modyfikacji tej strategii terapeutycznej wraz z pogłębieniem analiz specyficzności działania nowo zaprojektowanej cząsteczki amiRNA.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zatem opracowanie ulepszonej i bezpieczniejszej wersji cząsteczki amiR136-A2, charakteryzującej się wysoką specyficznością przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej efektywności działania.

Realizacja celu głównego obejmowała następujące zadania badawcze:

1. Zaproponowanie modyfikacji sekwencji cząsteczki A2 w celu ograniczenia liczby potencjalnych miejsc wiązania poza celem.
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 wybranego amiRNA w mysim modelu HD.
5. Analiza obróbki komórkowej wybranego amiRNA w modelu komórkowym oraz modelu mysim.

### III Materiały i metody

#### 1. Materiały

##### 1.1. Odczynniki chemiczne i gotowe zestawy komercyjne

**Tabela 3.** Wykorzystane odczynniki chemiczne.

| Nazwa                                         | Producent, numer katalogowy     |
|-----------------------------------------------|---------------------------------|
| Albumina surowicy bydlęcej (BSA)              | Cell Signaling Technology, 9998 |
| Agar                                          | BioShop, AGR001.500             |
| Agaroza                                       | EURx, E0301                     |
| Akrylamid/bisakrylamid (29:1) 30% roztwór     | BioShop, ACR009.500             |
| Akrylamid                                     | Sigma-Aldrich, A8887            |
| Ambion™ DNaza I                               | Invitrogen, AM2222              |
| N,N'-Metylenodiakrylamid (Bisakrylamid)       | Sigma-Aldrich, 146072           |
| Bromek etydyny                                | Sigma-Aldrich, E1510            |
| Akutaza                                       | STEMCELL Technologies, 07920    |
| Ampicylina                                    | BioShop, AMP201.25              |
| Antybiotyk, antymykotyk (100x)                | Gibco, 15240062                 |
| BamHI                                         | Thermo Scientific, ER0051       |
| Blastocydyna S                                | Gibco, R21001                   |
| Błękit bromofenolowy                          | Sigma-Aldrich, 114391           |
| β-merkaptoetanol                              | Gibco, 21985023                 |
| Chloroform                                    | Sigma-Aldrich, C2432            |
| Dimetylosulfotlenek (DMSO)                    | Sigma-Aldrich, D2650            |
| Deoksynukleotydy                              | EURx, E0503                     |
| DMEM High Glucose                             | Gibco, 21969035                 |
| Doksycyklina                                  | Sigma-Aldrich, D9891            |
| Sól fizjologiczna buforowana fosforanem (PBS) | Gibco, 14190144                 |
| EcoRI                                         | Thermo Scientific, ER0275       |
| Ekstrakt drożdżowy                            | BioShop, YEX401.1               |
| Etanol absolutny                              | Merck, 1070172511               |
| Fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25:24:1) | PanReac AppliChem, A0889        |
| Geltrex™                                      | Gibco, A1413302                 |
| Glicerol                                      | BioShop, GLY001.1               |
| Glicyna                                       | BioShop, GLN001.5               |
| Glikogen                                      | Thermo Scientific, R0551        |

|                                               |                                |
|-----------------------------------------------|--------------------------------|
| Heksamery                                     | Invitrogen, N8080127           |
| Higromycyna B 50 mg/ml                        | Invitrogen, 10687010           |
| HiMark™ Pre-stained Protein Standard          | Invitrogen, LC5699             |
| Izopropanol                                   | Acros Organics, 327270010      |
| Kwas octowy lodowaty                          | POCH, BA8760114                |
| Kwas solny 35-38%                             | POCH, BA5283115                |
| L-glutamina (100x)                            | Gibco, 25030081                |
| Ligaza T4                                     | Promega, M1801                 |
| Lipofektamina 2000                            | Invitrogen, 11668019           |
| Płodowa surowica bydlęca (FBS)                | EURx, E5050                    |
| MEM, NEAA                                     | Gibco, 10370021                |
| Metanol 99,8%                                 | POCH, BA1990110                |
| Mleko odtłuszczone w proszku                  | Spółdzielnia Mleczarska Gostyń |
| MssI (PmeI)                                   | Thermo Scientific, FD1344      |
| Chlorek sodu (NaCl)                           | BioShop, SOD002.1              |
| Nadsiarczan amonu (APS)                       | BioShop, AMP001.10             |
| NotI                                          | Thermo Scientific, ER0591      |
| Octan sodu                                    | POCH, 204-823-8                |
| Opti-MEM                                      | Gibco, 11058021                |
| PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder     | Thermo Scientific, 26619       |
| NuPAGE™ Tris-Acetate SDS Running Buffer (20x) | Invitrogen, LA0041             |
| STEMdiff™ Neural Progenitor Medium (NPM)      | STEMCELL Technologies, 05833   |
| PBS w tabletkach                              | BioShop, PBS404                |
| PEG-8000                                      | BioShop, PEG800.1              |
| Pen Strep                                     | Gibco, 15140122                |
| Polietylenoimina (PEI)                        | Polysciences, 23966-1          |
| Fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF)          | Sigma-Aldrich, 93482           |
| Bromek heksadimetryny (Polibren)              | Sigma-Aldrich, H9268           |
| Ponceau S                                     | Sigma-Aldrich, P3504           |
| Pożywka SOC                                   | A&A Biotechnology, K-SOC-40    |
| Y-27632 (ROCK inhibitor)                      | STEMCELL Technologies, 72307   |
| rCutSmart Buffer                              | New England Biolabs, B6004S    |
| Alkaliczna fosfataza z krewetek (rSAP)        | New England Biolabs, M0371S    |
| Laurylosiarczan sodu (SDS) 20%                | BioShop, SDS002.500            |
| SDS pellet                                    | BioShop, SDS999.1              |
| Sacharoza                                     | Chempur, 117720907             |

|                                             |                                 |
|---------------------------------------------|---------------------------------|
| STEMdiff™ SMADi Neural Induction Kit        | STEMCELL Technologies, 08582    |
| StemFlex™ Basal Medium                      | Gibco, A3349301                 |
| SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix   | Bio-Rad, 1725270                |
| Trypton                                     | BioShop, TRP402.500             |
| XT Tricine 20x                              | Bio-Rad, #1610790               |
| Tris                                        | BioShop, TRS001.5               |
| TRIzol™ Reagent                             | Invitrogen, 15596018            |
| 0,5% Trypsyna (10x)                         | Gibco, 15400054                 |
| Tween 20                                    | BioShop, TWN510.500             |
| N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED) | BioShop, TEM001.5               |
| QuickExtract DNA Extraction Solution        | Biosearch Technologies, QE0905T |
| Substrat Westar Antares                     | Cyanagen, XLS142                |

Gotowe zestawy komercyjne

Animal Genomic DNA Miniprep Kit (Bio Basic)  
GeneJET Plasmid Miniprep Kit, K0502 (Thermo Fisher Scientific)  
GeneJET Plasmid Maxiprep Kit, K0492 (Thermo Fisher Scientific)  
PicoPure™ RNA Isolation Kit, KIT0204 (Thermo Fisher Scientific)  
GeneJET Gel Extraction Kit, K0691 (Thermo Fisher Scientific)  
Dual-Luciferase® Reporter Assay System, E1910 (Promega)  
SuperScript™ III Reverse Transcriptase, 18080093 (Invitrogen)  
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase, M7805 (Promega)

## 1.2. Oligonukleotydy i startery

**Tabela 4.** Sekwencje oligonukleotydów użytych do stworzenia kaset ekspresyjnych shRNA i amiRNA.

| Nazwa       | Sekwencja 5' → 3'                                                                                                                                                   |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| sh9A        | GATCCGCAGCAGCAGCTGCAGCAGCTGCTTCCTGTCACAGCTGCTGCAACTGCTGCTGCTTTTTG                                                                                                   |
| sh10A       | GATCCGCAGCAGCAGCTGCAGCAGCTGCTTCCTGTCACAGCTGCTGCAGATGCTGCTGCTTTTTG                                                                                                   |
| sh11A       | GATCCGCAGCAGCAGCTGCAGCAGCTGCTTCCTGTCACAGCTGCTGCAGCAGCTGCTGCTTTTTG                                                                                                   |
| sh13A       | GATCCGCAGCAGCAGCTGCAGCAGCTGCTTCCTGTCACAGCTGCTGCAGCTGATGCTGCTTTTTG                                                                                                   |
| sh13G       | GATCCGCAGCAGCAGCTGCAGCAGCTGCTTCCTGTCACAGCTGCTGCAGCTGGTGCTGCTTTTTG                                                                                                   |
| amiR136-11A | AATTCCACTCCACTGCCCCGACGTCGCCTCGGTGGTGTGGATGAGCCCTCGGAGCTGCTGCAGCAGCTGCTGCTGGATTCTTATGCTCCAGCAGCAGCTGCTGCAGCAGTTCAGAGGGTTCTATCATTTTCGTCGGATGGAAAGGAGTGTATTCTGAAGATGC |
| amiR136-13A | AATTCCACTCCACTGCCCCGACGTCGCCTCGGTGGTGTGGATGAGCCCTCGGAGCTGCTGCAGCTGATGCTGCTGGATTCTTATGCTCCAGCAGCATCAGCTGCAGCAGTTCAGAGGGTTCTATCATTTTCGTCGGATGGAAAGGAGTGTATTCTGAAGATGC |

|             |                                                                                                                                                                             |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| amiR136-13G | AATTCCACTCCACTGCCCCGACGTCGCCTCGGTGGTGTGGATGAGCCCTCGGAGC<br>TGCTGCAGCTGGTGCTGCTGGATTCTTATGCTCCAGCAGCACCAGCTGCAGCAGT<br>TCAGAGGGTTCTATCATTTTCGTCGGATGGAAAGGAGTGTATTCTGAAGATGC |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Synteza oligonukleotydów została wykonana w Integrated DNA Technologies (amiRNA) i Metabion (shRNA).

**Tabela 5.** Wykorzystane startery.

| Nazwa                 | Prawy 5' → 3'           | Lewy 5' → 3'             |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| mysia $\beta$ -aktyna | ACTGTCGAGTCGCGTCCA      | ATCCATGGCGAACTGGTGG      |
| HTT                   | GTGCAGTGATGACGCAGAGT    | TCTTCGGGTCTCTTGCTTGT     |
| Htt                   | CCGCTCAGGTTCTGCTTTTA    | TGGACAGGGAACAGTGTTGG     |
| Ccdc177               | TGCCAGCAGAAAAGACACAC    | CGTCAGCTTTGTCTTCACCA     |
| Arsb                  | TGGTGGACTCACATCGGTAA    | ATAGCACTTCTTCGCCCTGA     |
| Kmt2d                 | GCTCAACAGACATTGGCTCA    | GCCAGTCAAGCCTCTTCAAC     |
| Maml1                 | AGGCAGGGTTCCTTACTGT     | TTTGCCTCAGAACAGCCTTT     |
| Mylip                 | GGCAGATGGGTGTTGAGAGT    | GAGCATGTCCAGCACGTCTA     |
| Tmem158               | CAGGATCTGGTCACCTTCTGC   | AAAGTGGGGTTTGTGCTGAG     |
| Ppp1r3f               | GCCGCATGACTAAAACCAAT    | TGCTGCCTCTTCAATGTGTC     |
| Tle1                  | GTGCCTCTTAGGCTGTCTGG    | CCTCACCTTCAGGACTTCA      |
| Zc4h2                 | GAACCCAAGGCAAAAACAGA    | TTACTGCCCCAGTTTGAAC      |
| Iba1                  | TCTGCCGTCCAACTTGAAGCC   | CTCTTCAGCTCTAGGTGGGTCT   |
| Gfap                  | CACCTACAGGAAATTGCTGGAGG | CCACGATGTTCTCTTGAGGT     |
| SOX1                  | ACCAGGCCATGGATGAAG      | CTTAATTGCTGGGGAATTGG     |
| SOX2                  | CAAAAATGGCCATGCAGGTT    | AGTTGGGATCGAACAAAAGCTATT |
| PAX6                  | TGCTCCGGCATGAAATATACTA  | GTCTCCAAATGTGCAGCAAC     |
| OCT4                  | AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG    | ACTTCACCTTCCCTCCAACC     |
| EEF2                  | TCATCGAGGAGTCGGGAGAG    | ACGACCGGGTCAGATTCTTG     |
| pCDH                  | -                       | GCACCCGTTCAATTGCCG       |
| pGreenPuro            | -                       | TGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGA |
| FRT-TO                | AGAGATCGTCGACGAGCTCG    | TAGGAAAGGACAGTGGGAGTG    |
| CAG_promotor_vg       | GGCCCTATAAAAAGCGAAGC    | TAATTACAGCCCGGAGGAGA     |

Synteza starterów została wykonana w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

### 1.3. Plazmidy ekspresyjne

Do ekspresji shRNA użyto plazmid pGreenPuro (System Biosciences). Częsteczki shRNA ulegały ekspresji pod kontrolą promotora polimerazy III RNA – H1. Do ekspresji amiRNA wykorzystano plazmid pCDH-CMV-MCS-EF1 $\alpha$ -copGFP (pCDH) (System Biosciences). Ekspresja docelowych sekwencji była regulowana przez promotor polimerazy II

RNA – CMV. Dodatkowo, oba te plazmidy umożliwiały ekspresję białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP), co pozwalało na ocenę efektywności transfekcji oraz transdukcji.

Do testów lucyferazowych wykorzystano plazmid pmirGLO (Promega) zawierający sekwencję eksonu 1 ludzkiego *HTT* z różnymi długościami powtórzeń CAG (16, 57 oraz 85), odpowiadającymi kolejno allelowi prawidłowemu oraz dwóm wariantom allelu zmutowanego. Oprócz tej sekwencji, plazmid zawierał sekwencje kodujące lucyferazę świetlika oraz Renilli, co umożliwiało normalizację sygnału w testach reporterowych.

Do ekspresji skróconego białka HTT1a wykorzystano plazmid pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT/TO (Thermo Fisher Scientific) dedykowany do wykorzystania w systemie Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific). Transgen ulegał ekspresji pod kontrolą promotora CMV.

#### 1.4. Bufory i pożywki

**Tabela 6.** Wykorzystane bufory.

| Składnik                                     | Stężenie/ilość |
|----------------------------------------------|----------------|
| <b><i>Bufor Tris-Glicyna 10x</i></b>         |                |
| Tris                                         | 250 mM         |
| Glicyna                                      | 1,92 mM        |
| SDS                                          | 1%             |
| <b><i>Towbin 10x</i></b>                     |                |
| Tris                                         | 250 mM         |
| Glicyna                                      | 1,92 mM        |
| <b><i>Towbin 1x</i></b>                      |                |
| Towbin 10x                                   | 10%            |
| Metanol                                      | 20%            |
| SDS                                          | 0,01%          |
| <b><i>Roztwór Ponceau S 1x</i></b>           |                |
| Ponceau S                                    | 0,1 %          |
| Kwas octowy                                  | 5%             |
| <b><i>Bufor PB do izolacji białek 3x</i></b> |                |
| Tris                                         | 120 mM         |
| Sacharoza                                    | 30%            |
| SDS                                          | 6%             |
| <b><i>Bufor PB 1x</i></b>                    |                |
| PB 3x                                        | 33%            |
| PMSF                                         | 2 mM           |
| <b><i>TBS 10x (pH=7,6)</i></b>               |                |
| Tris                                         | 200 mM         |

|                                                      |        |
|------------------------------------------------------|--------|
| NaCl                                                 | 1,5 M  |
| <b>TBS-T</b>                                         |        |
| TBS 10x                                              | 10%    |
| Tween 20                                             | 0,1%   |
| <b>PBS-T</b>                                         |        |
| Tabletki PBS                                         | 5      |
| Tween 20                                             | 0,1%   |
| <b>Bufor zagęszczający do lentiwirusów 4x (pH=7)</b> |        |
| PEG-8000                                             | 40%    |
| NaCl                                                 | 7%     |
| PBS 10x                                              | 10%    |
| <b>Bufor obciążający do białek 4x</b>                |        |
| SDS (pellet)                                         | 8%     |
| β-merkaptotanol                                      | 6%     |
| Glicerol                                             | 38%    |
| 0,5 M Tris-HCl (pH = 6,8)                            | 240 mM |
| Błękit bromofenolowy                                 | 0,1%   |
| <b>Bufor blokujący do membran w PBS-T/TBS-T</b>      |        |
| Mleko odtłuszczone w proszku                         | 5%     |

**Tabela 7.** Pożywki do hodowli bakterii.

| <b>Składnik</b>                              | <b>Stężenie</b> |
|----------------------------------------------|-----------------|
| <b>Pożywka LB (ang. lysogeny broth) pH=7</b> |                 |
| NaCl                                         | 1%              |
| Trypton                                      | 1%              |
| Ekstrakt drożdżowy                           | 0,5%            |
| <b>Pożywka LB z agarem (pH=7)</b>            |                 |
| NaCl                                         | 1%              |
| Trypton                                      | 1%              |
| Ekstrakt drożdżowy                           | 0,5%            |
| Agar                                         | 1,5%            |

## 1.5. Przeciwciała

**Tabela 8.** Wykorzystane przeciwciała.

| <b>Nazwa</b>                        | <b>Producent, numer katalogowy</b> | <b>Rozcieńczenie</b> | <b>Bufor</b>   |
|-------------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------|
| <i>Przeciwciała pierwszorzędowe</i> |                                    |                      |                |
| Anty-huntingtyna                    | Abcam, ab109115                    | 1:1000               | 5% mleko PBS-T |
| Anty-poliQ                          | Sigma-Aldrich, P1874               | 1:1000               | 5% mleko PBS-T |
| Anty-ataksyna 3                     | Proteintech, 13505-1-AP            | 1:1000               | 5% mleko PBS-T |
| Anty-atrofina 1                     | Sigma-Aldrich, HPA031619           | 1:1000               | 5% BSA TBS-T   |



|                                                                |                                        |        |                                           |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------|-------------------------------------------|
| Anty-winkulina                                                 | Cell Signaling, 4650S                  | 1:1000 | 5% BSA TBS-T                              |
| Anty-kalneksyna                                                | Sigma-Aldrich, C4731                   | 1:1000 | 5% mleko PBS-T                            |
| Anty-plektyna                                                  | Cell Signaling, 12254                  | 1:1000 | 5% mleko TBS-T                            |
| Anty-FLAG-tag                                                  | Sigma-Aldrich, F1804                   | 1:1000 | 5% mleko TBS-T                            |
| Anty-dehydrogenaza aldehydu<br>3-fosfoglicerynowego<br>(GAPDH) | Millipore, MAB374                      | 1:5000 | 5% mleko PBS-T                            |
| <i>Przeciwciała drugorzędowe</i>                               |                                        |        |                                           |
| Anty-mysie                                                     | Jackson ImmunoResearch,<br>715-035-150 | 1:1000 | Zależny od przeciwciała pierwszorzędowego |
| Anty-królicze                                                  | Jackson ImmunoResearch,<br>711-035-152 | 1:1000 | Zależny od przeciwciała pierwszorzędowego |

## 1.6. Linie komórkowe

**Tabela 9.** Wykorzystane linie komórkowe.

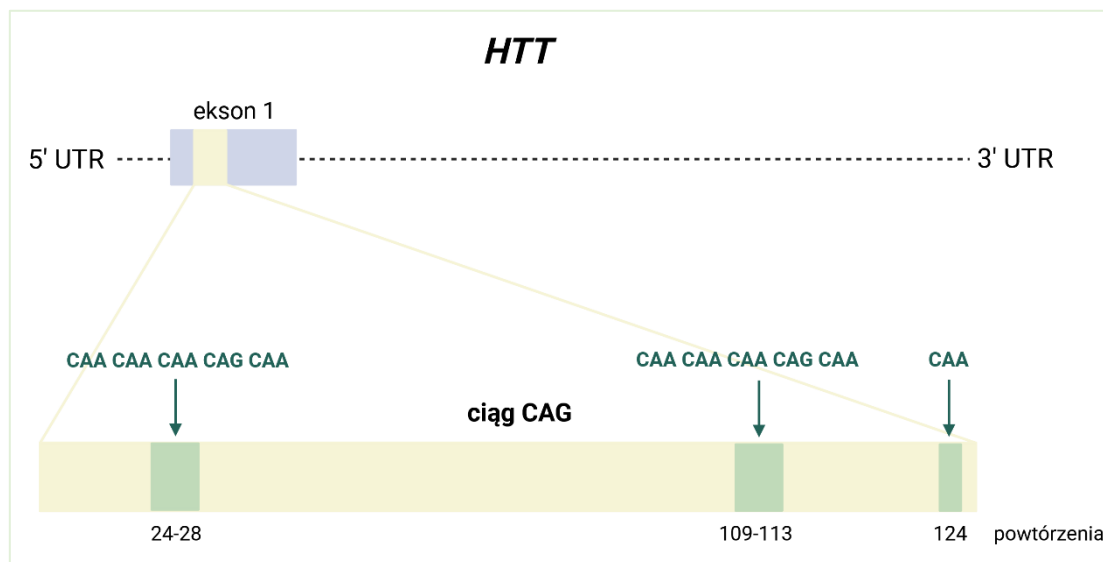
| Nazwa               | Pochodzenie                                                                            | Producent                        |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| HEK293T             | Ludzka nerka zarodkowa                                                                 | American Type Culture Collection |
| HEK293 Flp-In T-REx | Ludzka nerka zarodkowa                                                                 | Thermo Fisher Scientific         |
| GM04281             | Ludzkie fibroblasty od pacjenta HD                                                     | Coriell Institute                |
| GM06153             | Ludzkie fibroblasty od pacjenta SCA3                                                   | Coriell Institute                |
| GM13717             | Ludzkie fibroblasty od pacjenta DRPLA                                                  | Coriell Institute                |
| ND42222             | Ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste wyprowadzone z fibroblastów HD | Coriell Institute                |
| IC39                | Izogeniczna linia kontrolna wyprowadzona z ND42222                                     | Wyprowadzona w ICHB PAN (142)    |

## 1.7. Mysi model HD

W niniejszej pracy wykorzystano transgeniczny model myszy HD – YAC128 (FVB-Tg(YAC128)53Hay/J) (Jackson Laboratory). Model ten posiada pełnej długości gen ludzkiej huntingtyny, którego ekson 1 zawiera ciąg 125 powtórzeń CAG z 9 interrupcjami CAA (rys. 7). Konstrukcja transgenu została opracowana przy użyciu sztucznego chromosomu drożdżowego (ang. *Yeast Artificial Chromosome*, YAC), co pozwala na fizjologiczną ekspresję genu pod kontrolą jego endogennego promotora. Oprócz ludzkiego genu *HTT*, YAC128 posiadają również myszy allel *HTT* z 7 powtórzeniami CAG. Chociaż liczba CAG w allelu mysim jest niższa niż u ludzi, wystarcza do przeprowadzenia analizy allelo-selektywności

zastosowanego amiRNA. YAC128 wykazują silny fenotyp HD, objawiający się utratą objętości mózgu, degeneracją neuronów prążkowania i występowaniem agregatów HTT w późniejszym okresie życia (143–145).

Jako grupę odniesienia w niektórych analizach wykorzystano zdrowe myszy FvB/NJ (Jackson Laboratory).



**Rysunek 7.** Sekwencja transgenu *HTT* w myszach YAC128 wraz z lokalizacją interupcji CAA w obrębie ciągu CAG.

Wykonano na podstawie: Kotowska-Zimmer i wsp., 2022 (78).

Hodowlę myszy prowadzono w Zwierzętarni w Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Doświadczenia zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną Ds. Doświadczeń na Zwierzętach zgodnie z uchwałą 48/2018 z dnia 22.11.2018r. Myszy utrzymywano w indywidualnie wietrzonych klatkach ze stałym dostępem do wody i pokarmu.

## 1.8. Sprzęt laboratoryjny oraz materiały trwałe

Aparat do elektroforezy poziomej MultiSub (Clever Scientific)  
Aparat do elektroforezy pionowej Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad)  
Aparat do elektroforezy pionowej XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen)  
Aparat do elektrotransferu mokrego Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad)  
Automatyczny licznik komórek TC20 (Bio-Rad)  
Blok grzewczy z wytrząsaniem TS-100 (Biosan)  
Cytometr przepływowy Attune NxT (Invitrogen)  
Czytnik płytek Victor X (Perkin Elmer)  
Inkubator bakteryjny z wytrząsaniem 311DS (Labnet)  
Inkubator CO<sub>2</sub> do komórek eukariotycznych (HERACell, Nuaire)

Komora laminarna do pracy z bakteriami Aura Vertical S.D.4 (BioAir Instruments)  
Komora laminarna do pracy z komórkami eukariotycznymi (Heraeus, HERASafe KS15)  
Mikroskop fluorescencyjny z odwróconym kontrastem IX70 (Olympus)  
pH-metr FiveEasy (Mettler Toledo)  
Spektrofotometr DS-11 (DeNovix)  
System dokumentacji żeli i membran G:box (Syngene)  
Termocykler T100 (Bio-Rad)  
Termocykler CFX Connect (Bio-Rad)  
Waga analityczna AGN100C (Axis)  
Wirówka Mini Spin (Eppendorf)  
Wirówka 5810 R (Eppendorf)  
Wytrząsarka kołyskowa MR-1 (Biosan)  
Wytrząsarka Vortex Genie 2 (Scientific Industries)  
Zasilacz do elektroforezy PowerPac Basic (Bio-Rad)  
Zasilacz do elektroforezy EV261 (Censort)  
Filtry polieterosulfonowe 0,45 µm (VWR, 28145-505)  
Membrana nitrocelulozowa Amersham Protran 0.45 µm NC (Cytiva, 10600002)  
Bibuły Whatmana (Cytiva, 3030-917)  
Płytki 96-dołkowe do PCR (Bio-Rad, HSP9601)  
Płytki 96-dołkowe nieprzezroczyste (Sigma-Aldrich, BR781605)

### 1.9. Programy komputerowe oraz bazy danych

**CFX Maestro (Bio-Rad)** – analiza wyników qPCR i RT-qPCR  
**GelPro Analyzer 3.0 (Media Cybernetics)** – analiza densytometryczna  
**FinchTV (Inform Technologies Inc.)** – analiza sekwencjonowań Sangera  
**Prism 8.4.3 (GraphPad Software)** – przygotowanie wykresów oraz analiza statystyczna

**BioRender** – przygotowanie schematów

<https://www.biorender.com/>

**NCBI Nucleotide BLAST** – przewidywanie sekwencji off-target

[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LO C=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LO C=blasthome)

**Primer3Plus** – projektowanie starterów

<https://www.primer3plus.com/>

**Primer-BLAST** – projektowanie starterów

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

**Gene Ontology** – ontologia genów

<https://geneontology.org/>

**SR-plot** – przygotowanie wykresów bąbelkowych

<https://www.bioinformatics.com.cn/en>

## 2. Metody

### 2.1. Mapowanie bioinformatyczne i analiza BLAST

Celem mapowania bioinformatycznego było wyznaczenie miejsc niespecyficznego wiązania cząsteczki A2 w genomie oraz określenie pozycji nukleotydowych w jej sekwencji, których modyfikacja zminimalizuje efekt off-target. Mapowano sekwencję nici wiodącej siRNA A2 (5' CUGCUGCAGCUGCUGCUGC 3') do genomu ludzkiego, wykorzystując program Bowtie (1.2.3). Jako referencyjny genom wykorzystano zestaw danych hg38 z bazy UCSC (University of California, Santa Cruz), w wersji opublikowanej 10 sierpnia 2018 roku, dostępny pod adresem: <https://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/hg38/bigZips/latest/hg38.fa.gz>. Uwzględniono wszystkie możliwe dopasowania sekwencji oraz dopuszczono maksymalnie 3 niesparowania między A2 a sekwencjami w genomie. Mapowanie bioinformatyczne zostało wykonane przez dr Martynę Urbanek-Trzeciak z Zakładu Genetyki Nowotworów ICHB PAN.

Na podstawie uzyskanych wyników zaprojektowano 5 modyfikacji cząsteczki A2, polegających na wprowadzeniu pojedynczej substytucji nukleotydowej w określonej pozycji. W kolejnym etapie cząsteczki sprawdzono pod kątem ilości potencjalnych sekwencji niespecyficznego wiązania w transkryptomie ludzkim przy wykorzystaniu programu NCBI Nucleotide BLAST, z uwzględnieniem następujących parametrów:

- baza danych: RefSeq\_Select (RNA),
- organizm: *Homo sapiens*,
- algorytm wyszukiwania: MegaBLAST,
- rozmiar słowa (ang. *word size*): 16,
- punktacja za dopasowania/niedopasowania (ang. *match/mismatch scores*): 4/-5,
- koszt wstawienia luki (ang. *gap costs*): Existence 12, Extension 8.

## 2.2. Konstrukcja wektorów ekspresyjnych shRNA oraz amiRNA

### 2.2.1. Hybrydyzacja oligonukleotydów

Oligonukleotydy zawierające sekwencje shRNA oraz amiRNA hybrydyzowano w parach. W tym celu dodawano po 1  $\mu$ l każdego oligonukleotydu do 48  $\mu$ l wody, a następnie mieszaninę inkubowano w temperaturze 90°C przez 5 minut, po czym pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę.

### 2.2.2. Ligacja oligonukleotydów z plazmidem ekspresyjnym

Przed przeprowadzeniem ligacji plazmidy ekspresyjne poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Skład mieszanin reakcyjnych przedstawiono w tabelach 10 i 11.

**Tabela 10.** Skład mieszaniny reakcyjnej dla plazmidu pGreenPuro.

| Składnik            | Ilość         |
|---------------------|---------------|
| Plazmid ekspresyjny | 1 $\mu$ g     |
| BamHI               | 2 $\mu$ l     |
| EcoRI               | 1 $\mu$ l     |
| Bufor Tango 2x      | 4 $\mu$ l     |
| H <sub>2</sub> O    | Do 20 $\mu$ l |

**Tabela 11.** Skład mieszaniny reakcyjnej dla plazmidu pCDH.

| Składnik            | Ilość         |
|---------------------|---------------|
| Plazmid ekspresyjny | 1 $\mu$ g     |
| NotI                | 1 $\mu$ l     |
| EcoRI               | 1 $\mu$ l     |
| Bufor O 10x         | 2 $\mu$ l     |
| H <sub>2</sub> O    | Do 20 $\mu$ l |

Próby inkubowano w temperaturze 37°C przez całą noc, a następnie w 80°C przez 20 minut w celu inaktywacji enzymów. Produkt trawienia rozdzielano na 0,9% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Pocięty plazmid wycinano z żelu sterylnym skalpelem, a następnie izolowano przy użyciu zestawu do oczyszczania GeneJET Gel Extraction Kit, według protokołu producenta. Stężenie plazmidowego DNA określano przy pomocy spektrofotometru DeNovix DS-11.

Kolejno przeprowadzono ligację. Skład mieszaniny ligacyjnej przedstawiono w tabeli 12.

**Tabela 12.** Skład mieszaniny ligacyjnej.

| Składnik                    | Ilość                                               |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------|
| Plazmid ekspresyjny         | 100 ng                                              |
| Hybrydowane oligonukleotydy | Wyliczono ze stosunku 1:3 (plazmid:oligonukleotydy) |
| Ligaza T4                   | 1 $\mu$ l                                           |
| Bufor do ligazy 10x         | 1 $\mu$ l                                           |
| H <sub>2</sub> O            | Do 10 $\mu$ l                                       |

Mieszaninę inkubowano w temperaturze 4°C przez noc.

### 2.2.3. Transformacja bakterii metodą szoku cieplnego

Do transformacji użyto kompetentne szczepy bakterii *Escherichia coli* GT116 (InvivoGen) oraz DH5 $\alpha$  (Invitrogen). Do 25  $\mu$ l zawiesiny bakterii dodano 7,5  $\mu$ l mieszaniny ligacyjnej, a następnie całość inkubowano na lodzie przez 30 minut. Po upływie czasu, bakterie inkubowano w warunkach stresu cieplnego (42°C) przez 30 (w przypadku bakterii GT116) albo 45 sekund (w przypadku bakterii DH5 $\alpha$ ), a następnie schłodzono na lodzie przez 2 minuty. Do bakterii dodano 250  $\mu$ l pożywki LB (GT116) albo SOC (DH5 $\alpha$ ) bez antybiotyku. Regenerację bakterii prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem. Następnie całą mieszaninę nanoszono na szalki Petriego zawierające zestaloną pożywkę LB z agarem oraz ampicyliną w stężeniu 100  $\mu$ g/ml. Szalki inkubowano w temperaturze 37°C przez noc.

### 2.2.4. Propagacja bakterii i izolacja plazmidowego DNA w małej skali

Pojedyncze kolonie bakteryjne przenoszono do probówek stożkowych typu Falcon, zawierających 3 ml pożywki LB z ampicyliną (100  $\mu$ g/ml), a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez noc przy wytrząsaniu. Izolację plazmidowego DNA przeprowadzono z 2 ml hodowli z wykorzystaniem komercyjnego zestawu GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific), według protokołu producenta. Stężenie wyizolowanego plazmidowego DNA określono przy pomocy spektrofotometru DeNovix DS-11.

### 2.2.5. Sekwencjonowanie plazmidowego DNA metodą Sanger

W celu potwierdzenia prawidłowej sekwencji, plazmidowe DNA poddano sekwencjonowaniu Sangera w Laboratorium Technik Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Do reakcji przygotowano próby zawierające po 5  $\mu$ l plazmidowego DNA o stężeniu  $\sim$ 120 ng/ $\mu$ l. Dodatkowo, osobno przygotowano po 3  $\mu$ l startera (pGreenPuro dla plazmidu pGreenPuro oraz pCDH dla plazmidu pCDH, tab. 5) o stężeniu 10  $\mu$ M dla każdej reakcji. Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu programu FinchTV.

### 2.2.6. Propagacja bakterii i izolacja plazmidowego DNA w dużej skali

W celu uzyskania dużych ilości plazmidowego DNA, bakterie rozpropagowano na dużą skalę. 1 ml hodowli płynnej przeniesiono do 150 ml pożywki LB z ampicyliną (100  $\mu$ g/ml), a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez noc z wytrząsaniem. Izolację przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher Scientific), według protokołu producenta. Stężenie wyizolowanego plazmidowego DNA określono przy pomocy spektrofotometru DeNovix DS-11. Otrzymane DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

## 2.3. Hodowle komórkowe

Komórki eukariotyczne hodowano w inkubatorach utrzymujących temperaturę 37°C oraz atmosferę zawierającą 5% CO<sub>2</sub>. Komórki linii HEK293T hodowano z wykorzystaniem pożywki DMEM suplementowanej 10% płodową surowicą bydlęcą (ang. *Fetal Bovine Serum*, FBS), 1% L-glutaminą oraz 1% roztworem antybiotyku z antymykotykiem, natomiast linia HEK293 Flp-In T-REx hodowana była w pożywce DMEM z dodatkiem 10% FBS, 1% L-glutaminy, 1% Pen Strep oraz 5  $\mu$ g/ml blastocydyny S. Hodowla ludzkich fibroblastów prowadzona była w pożywce MEM wzbogaconej o 10% FBS, 1% L-glutaminy oraz 1% antybiotyku z antymykotykiem. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste hodowano w pożywce StemFlex z dodatkiem dedykowanego Suplementu (10%) oraz 0,5% Pen Strep. Wszystkie komórki pasażowane były w momencie osiągnięcia  $\sim$ 80% konfluencji z wykorzystaniem trypsyny (1x) albo Akutazy (stosowanej wyłącznie do komórek macierzystych). Dodatkowo, co najmniej godzinę przed pasażem komórek macierzystych dołki hodowlane pokrywano roztworem Geltrex w celu zapewnienia odpowiedniej przyczepności.

Ponadto, po każdym pasażu do hodowli komórek macierzystych dodawano inhibitor apoptozy (ROCK inhibitor) w stężeniu końcowym 10 nM, aby zwiększyć ich przeżywalność.

## **2.4. Analiza efektywności reagentów shRNA oraz amiRNA**

### **2.4.1. Testy lucyferazowe**

Testy reporterowe wykonywano w celu określenia allelo-selektywności oraz wstępnej oceny efektywności shRNA oraz amiRNA. Komórki HEK293T wysiewano na płytkę 24-dołkową w liczbie 100 000 komórek na dołek. Kolejnego dnia kotransfekowano je plazmidem pmirGLO w ilości 50 ng, zawierającym ekson 1 *HTT* z 16, 57, albo 85 powtórzeniami CAG oraz plazmidem pGreenPuro zawierającym sekwencję shRNA albo pCDH z sekwencją amiRNA, w ilościach 5, 10, 50, 150 i 500 ng. Jako kontrolę negatywną w testach shRNA zastosowano plazmid pGreenPuro posiadający sekwencję shRNA nie celującą w żadną sekwencję w ludzkim transkryptomie, o składzie nukleotydowym odpowiadającym cząsteczce A2, określaną jako „Scramble” (SCR). Sekwencja nici wiodącej miała następującą postać: 5'-TCACTCGGCTACGGCTGGGCC-3'. W przypadku badań z użyciem amiRNA, jako kontrolę negatywną wykorzystano plazmid pCDH pozbawiony sekwencji celującej („pusty”). Transfekcję przeprowadzano z wykorzystaniem Lipofektaminy 2000, według zaleceń producenta. Po upływie 4 godzin od transfekcji, niesuplementowaną pożywkę hodowlaną (DMEM) zastępowano kompletną. Efektywność transfekcji monitorowano poprzez obserwację sygnału GFP. Po 48 godzinach od transfekcji mierzono luminescencję pochodzącą z lucyferazy świetlika oraz Renilli, wykorzystując komercyjny zestaw Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) zgodnie z protokołem producenta. Pomiaru sygnału dokonywano na nieprzezroczystej płytce 96-dołkowej z wykorzystaniem czytnika płytek Victor X (Perkin Elmer).

### **2.4.2. Produkcja cząsteczek lentiwirusowych i określanie miana wirusa**

Cząsteczki lentiwirusowe, będące nośnikami shRNA i amiRNA, produkowano w komórkach HEK293T. W tym celu wykorzystano plazmidy kodujące białka wirusowe: pCMV-VSV-G oraz pCMV-dR8.2 dvpr (Addgene). Plazmidy wirusowe oraz wektory ekspresyjne wprowadzano do komórek za pomocą transfekcji z wykorzystaniem polietylenoiminy (PEI). Komórki o pełnej konfluencji na szalkach o średnicy 10 cm poddawano



transfekcji PEI w stosunku 1:3 (DNA:PEI), zgodnie z protokołem podanym na stronie producenta plazmidów wirusowych (Addgene). Wiriony zbierano po upływie 48 i 72 godzin od transfekcji. W tym celu pożywkę z nad hodowli filtrowano przy pomocy filtra polietersulfonowego o porach 0,45 µm, a następnie mieszano z buforem zagęszczającym (4x). Mieszaninę inkubowano co najmniej 24 godziny w temperaturze 4°C, a następnie wirowano przy 1500 RCF przez 45 minut w temperaturze 4°C, w celu oddzielenia wirionów. Osad zawieszano w 1 ml pożywki Opti-MEM (Gibco), a następnie zamrażano w temperaturze –80°C.

W celu określenia miana wirusów, przeprowadzano transdukcję komórek HEK293T z użyciem wirusów rozcieńczonych 10-, 100- oraz 1000-krotnie. Dzień przed infekcją, komórki wysiewano w ilości 100 000 komórek na dołek płytki 6-dołkowej. W momencie podania wirusa komórki dodatkowo liczono, aby precyzyjnie określić liczbę transdukowanych komórek. Podczas transdukcji stosowano pożywkę hodowlaną DMEM o obniżonej zawartości FBS (2%) bez antybiotyku, z dodatkiem polibrenu (8 µg/ml). Po 18 godzinach pożywkę wymieniano na kompletną. Efektywność transdukcji monitorowano poprzez obserwację sygnału GFP. Po upływie 72 godzin, komórki trypsynizowano, a następnie wirowano przy 1600 RPM przez 4 minuty. Osad płukano w 1 ml PBS bez jonów magnezu i wapnia. Po ponownym wirowaniu, komórki zawieszano w 1 ml PBS, a następnie określano procentowy udział komórek wykazujących sygnał GFP przy pomocy cytometru Attune NxT.

W celu określenia miana wirusa w 1 ml, wartość procentową w formie liczbowej mnożono razy rozcieńczenie oraz liczbę transdukowanych komórek. Do wyliczenia ilości mieszaniny wirusa potrzebnej do transdukcji 100 000 ( $1 \times 10^5$ ) komórek przy założonym MOI (ang. *multiplicity of infection*) = 10 (10 wirionów na 1 komórkę) zastosowano następujące obliczenia:

$$x = \frac{1 \times 10^5 \times 10}{\text{miano}}$$

### 2.4.3. Transdukcja

Fibroblasty wysiewano na szalkę 6 cm dzień przed transdukcją w ilości 100 000. Komórki transdukowano wirionami o MOI = 10, uprzednio zmieniając pożywkę na MEM suplementowany 2% FBS z dodatkiem polibrenu (4 µg/ml). Po 18 godzinach pożywkę

zmieniano na kompletną. Efektywność transdukcji monitorowano za pomocą obserwacji sygnału GFP. Po 7 dniach komórki trypsynizowano i izolowano białka.

#### 2.4.4. Izolacja białka i elektroforeza w warunkach denaturujących

Białka izolowano przy pomocy buforu PB. Do osadu komórkowego dodawano bufor, następnie rozpraszano osad w zawiesinie poprzez wielokrotne pipetowanie. Po otrzymaniu klarownego lizatu, próby denaturowano w temperaturze 95°C przez 5 minut. Stężenie białka określano za pomocą spektrofotometru DeNovix DS-11.

Elektroforezę białek przeprowadzano z wykorzystaniem różnych żeli poliakrylamidowych oraz systemów do elektroforezy pionowej: Mini-PROTEAN® Tetra Cell (do żeli wylewanych ręcznie) oraz XCell SureLock™ Mini-Cell (do żeli komercyjnych). Do rozdziału białek wyizolowanych z fibroblastów DRPLA wykorzystywano komercyjne żele gradientowe NuPAGE™ Tris-Acetate Mini Protein Gels (Invitrogen) o grubości 1 mm i zakresie stężenia 3-8%. Białka wyizolowane z fibroblastów HD i SCA3 rozdzielano na ręcznie wylewanych żelach, których składy podano w tabelach 13 i 14.

**Tabela 13.** Skład żelu poliakrylamidowego do elektroforezy białek z fibroblastów HD.

| Składnik                          | 4% żel zagęszczający  | 5% żel rozdzielający   |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 20% akrylamid:bisakrylamid (49:1) | 0,5 ml                | 1,25 ml                |
| Tris-HCl                          | 1,25 ml (pH=6,8, 1 M) | 2,5 ml (pH=8,8, 1,5 M) |
| XT Tricine 20x                    | 0,125 ml              | 0,25 ml                |
| H <sub>2</sub> O                  | 0,6 ml                | 0,95 ml                |
| 10% APS                           | 0,025 ml              | 0,05 ml                |
| TEMED                             | 0,0025 ml             | 0,005 ml               |

**Tabela 14.** Skład żelu poliakrylamidowego do elektroforezy białek z fibroblastów SCA3.

| Składnik                          | 5% żel zagęszczający  | 12% żel rozdzielający  |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 30% akrylamid:bisakrylamid (29:1) | 0,33 ml               | 2 ml                   |
| Tris-HCl                          | 0,25 ml (pH=6,8, 1 M) | 1,3 ml (pH=8,8, 1,5 M) |
| 10% SDS                           | 0,02 ml               | 0,05 ml                |
| 10% APS                           | 0,02 ml               | 0,05 ml                |
| H <sub>2</sub> O                  | 1,4 ml                | 1,6 ml                 |
| TEMED                             | 0,002 ml              | 0,002 ml               |

Do elektroforezy białek z fibroblastów HD stosowano rozcieńczony bufor XT Tricine, natomiast dla białek z fibroblastów DRPLA rozcieńczony bufor NuPAGE™ Tris-Acetate SDS Running Buffer. W przypadku elektroforezy białek z fibroblastów SCA3 wykorzystywano rozcieńczony 10-krotnie bufor Tris-Glicyna. Na żel nakładano 30 µg białka. Przed elektroforezą próby mieszano z buforem obciążającym do białek i poddawano denaturacji przez 5 minut w 95°C. Elektroforezę prowadzono w temperaturze 4°C. Zastosowano 2 markery wielkości: PageRuler™ Plus, dla rozdziału białek o mniejszej masie cząsteczkowej, oraz HiMark™ (Thermo Fisher Scientific), dla rozdziału HTT. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 60 V przez 20 minut, a następnie 2,5-6 godzin przy napięciu 130 V, w zależności od rodzaju wizualizowanego białka.

#### **2.4.5. Western blotting**

Białka przenoszono na membranę nitrocelulozową (Cytiva) metodą transferu mokrego z wykorzystaniem zestawu Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad). Membranę, żel, bibuły Whatmana oraz gąbki moczo przez kilka minut w buforze Towbin 1x wykorzystywanym do transferu. W kasie do elektrotransferu układano kolejno: gąbkę, 3 bibuły, membranę, żel, 3 bibuły oraz gąbkę. Pęcherzyki powietrza usuwano za pomocą walca. Kasetę transferową zamykano, upewniając się, że wszystkie warstwy zostały ułożone ściśle i równomiernie. Dodatkowo weryfikowano, czy membrana była skierowana w stronę elektrody dodatniej (anody), a żel w stronę elektrody ujemnej (katody). Kasetę transferową umieszczano wraz z wkładem chłodzącym w zbiorniku transferowym, który następnie napełniano buforem transferowym. Transfer prowadzono przez 18 godzin przy napięciu 30 V, albo przez 1 godzinę przy napięciu 100 V. Po zakończeniu transferu białka wizualizowano za pomocą buforu Ponceau S (1x). Następnie membranę docinano i blokowano w 5% odtłuszczonego mleku rozpuszczonym w PBS-T albo TBS-T, w zależności od stosowanego przeciwciała. Kolejno inkubowano membranę z przeciwciałami I-rzędowymi (3 godziny albo przez noc), a następnie II-rzędowymi (2 godziny) z wykorzystaniem wytrząsarki kołyskowej. Po każdej inkubacji membranę przepłukiwano 3-krotnie w buforze PBS-T albo TBS-T po 10 minut. Białka wizualizowano z wykorzystaniem substratu chemiluminescencyjnego dla peroksydazy chrzanowej Westar Antares (Cyanogen) przy użyciu urządzenia G:box. Analizę poziomu białek przeprowadzono metodą densytometrii przy użyciu oprogramowania GelPro Analzyer. Intensywność sygnału dla poszczególnych prążków mierzono jako zintegrowaną gęstość

optyczną (ang. *Integrated Optical Density*, IOD). Otrzymane wartości normalizowano względem sygnału białka referencyjnego.

## **2.5. Analiza efektów niespecyficznych**

### **2.5.1. Różnicowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w kierunku prekursorów neuronalnych**

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (linie ND42222 oraz IC39) różnicowano w kierunku neuronalnych komórek macierzystych metodą hodowli w monowarstwie poprzez inhibicję szlaku sygnałowego SMAD. W tym celu stosowano pożywkę STEMdiff SMADi Neural Induction Kit, zgodnie z zaleceniami producenta. Po trzech pasażach pożywkę zmieniano na NPM. Po czwartym pasażu potwierdzano ekspresję markerów *SOX1* (*SRY-box transcription factor 1*), *SOX2* (*SRY-box transcription factor 2*), *PAX6* (*paired box 6*) oraz obniżenie ekspresji markera charakterystycznego dla indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cells*, iPSC) – *OCT4* (*octamer-binding transcription factor 4*) metodą RT-qPCR (procedurę przeprowadzono zgodnie z pkt 2.5.6, 2.7.8 i 2.7.9.).

### **2.5.2. Transdukcja**

Prekursory neuronalne wysiewano na płytkę 12-dołkową w ilości 150 000 na dołek. Następnego dnia komórki transdukowano cząsteczkami lentiwirusowymi o MOI = 10. Siódmego dnia od transdukcji komórki poddawano trypsynizacji, oddzielano od pożywki poprzez wirowanie i izolowano białka oraz RNA.

### **2.5.3. Izolacja białek i elektroforeza w warunkach denaturujących**

Izolację białek i elektroforezę przeprowadzano zgodnie z opisem w punkcie 2.4.4. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 60 V przez 20 minut, a następnie przez 2 godziny przy napięciu 130 V z wykorzystaniem żeli komercyjnych, takich jak w przypadku fibroblastów DRPLA.

#### 2.5.4. Western blotting

Procedurę przeprowadzano zgodnie z opisem w punkcie 2.4.5.

#### 2.5.6. Izolacja całkowitego RNA

Izolację całkowitego RNA przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu PicoPure™ RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific), według protokołu producenta. Stężenie wyekstrahowanego RNA mierzono przy pomocy spektrofotometru DeNovix DS-11.

#### 2.5.7. Sekwencjonowanie nowej generacji

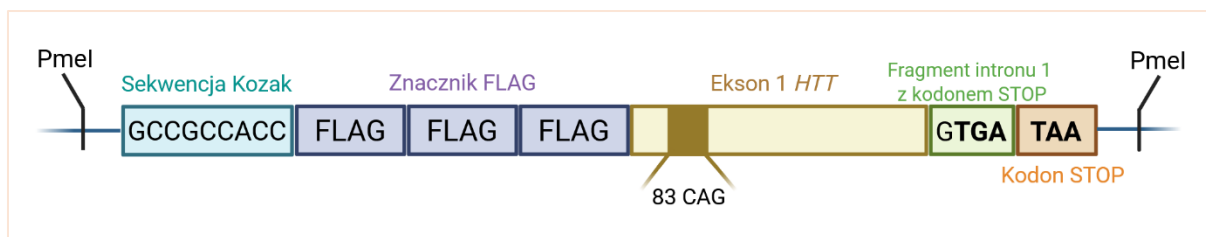
Sekwencjonowanie mRNA, poprzedzone przygotowaniem bibliotek, i analizę bioinformatyczną przeprowadzono w Pracowni Genomiki ICHB PAN z wykorzystaniem sekwenatora Illumina NovaSeq 6000. Do sekwencjonowania przeznaczono 0,5 µg całkowitego RNA, a głębokość wynosiła 100 milionów odczytów.

### 2.6. Ocena poziomu HTT1a

#### 2.6.1. Przygotowanie plazmidu do nadekspresji *HTT1a*

Do przeprowadzenia tego eksperymentu wykorzystano linię komórkową HEK293 Flp-In T-REx, będącą zmodyfikowaną wersją HEK293, zaprojektowaną do indukowalnej ekspresji pożądanых białek. Wprowadzany transgen jest stabilnie integrowany w *locus* FRT (ang. *flippase recognition target*), który jest specyficznie rozpoznawany przez enzym rekombinazę Flp (ang. *flippase*), umożliwiając precyzyjną integrację genu. Dodatkowo, system Tet-On pozwala na kontrolowaną, indukowalną ekspresję transgenu po dodaniu doksycykliny.

Zaprojektowano kasetę ekspresyjną umożliwiającą ekspresję transgenu *HTT1a*, zawierającą sekwencję Kozak, ekson 1 genu *HTT* z 83 powtórzeniami CAG, a także 4 nukleotydy intronu 1 z kodonem STOP. Ponadto, wprowadzono dodatkowy kodon STOP, a w celu ułatwienia wizualizacji białka, umieszczono 3 znaczniki FLAG bezpośrednio przed eksonem (rys. 8).



**Rysunek 8.** Kasetka ekspresyjna umożliwiająca ekspresję transgenu *HTT1a*.

Przeprowadzono klonowanie kasety ekspresyjnej z plazmidu pUC57 (GenScript) do docelowego plazmidu – pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT/TO. W tym celu oba plazmidy poddawano trawieniu enzymem restrykcyjnym MssI (PmeI). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 15.

**Tabela 15.** Skład mieszaniny reakcyjnej dla plazmidów pUC57 oraz pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT/TO.

| Składnik         | Ilość    |
|------------------|----------|
| Plazmid          | 2 µg     |
| PmeI             | 2 µl     |
| Bufor Green 10x  | 2 µl     |
| H <sub>2</sub> O | Do 20 µl |

Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 minut, a następnie przeprowadzono elektroforezę w 0,9% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Po rozdziale wycinano z żelu fragment zawierający kasetę ekspresyjną oraz fragment z pociętym plazmidem pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT/TO, a następnie izolowano przy użyciu zestawu do oczyszczania GeneJET Gel Extraction Kit, według protokołu producenta. Stężenie DNA określano przy pomocy spektrofotometru DeNovix DS-11.

Aby zapobiec ligacji przeciętego plazmidu pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT/TO, przeprowadzono reakcję defosforylacji tępych końców z wykorzystaniem enzymu alkalicznej fosfatazy z krewetek (rSAP). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 16.

**Tabela 16.** Skład mieszaniny defosforylacyjnej.

| Składnik            | Ilość    |
|---------------------|----------|
| Plazmid             | 2 µg     |
| rSAP                | 2 µl     |
| Bufor rCutSmart 10x | 2 µl     |
| H <sub>2</sub> O    | Do 20 µl |

Mieszaninę inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C, a następnie przez 12 minut w 70°C.

Ligację, transformację oraz izolację plazmidów przeprowadzano zgodnie z opisem w punktach 2.2.2.-2.2.6. Do sekwencjonowania Sangera użyto startera FRT-TO (tab. 5).

### **2.6.2. Wyprowadzenie linii komórkowej z indukowaną nadekspresją *HTT1a***

Komórki HEK293 Flp-In T-REx wysiewano na płytki 6-dołkowe w ilości 500 000 komórek na dołek. Następnego dnia przeprowadzono transfekcję plazmidem pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT/TO zawierającym kasetę ekspresyjną *HTT1a* oraz plazmidem pOG44, kodującym rekombinazę Flp, wykorzystując Lipofektaminę 2000 zgodnie z zaleceniami producenta. Po 24 godzinach od transfekcji pożywkę wymieniano na DMEM suplementowany 10% FBS, 1% Pen Strep, 1% L-glutaminą oraz 5 µg/ml blastycydyny S. W momencie osiągnięcia 80% konfluencji, komórki pasażowano na szalki Petriego o średnicy 10 cm, a pożywkę wzbogacano o higromycynę B w stężeniu 100 µg/ml.

### **2.6.3. Indukcja ekspresji *HTT1a* i transdukcja**

Dzień przed indukcją, komórki wysiewano na płytkę 6-dołkową w ilości 300 000 komórek na dołek. Indukcję ekspresji *HTT1a* przeprowadzano poprzez dodanie do hodowli doksycykliny w stężeniu 1 µg/ml. Następnego dnia komórki transdukowano wirionami o MOI = 10, uprzednio wymieniając pożywkę na DMEM suplementowany 2% FBS, 1% L-glutaminą, 1% Pen Strep, 100 µg/ml higromycyny B, 5 µg/ml blastycydyny S, 1 µg/ml doksycykliny oraz 4 µg/ml polibrenu. Po 18 godzinach od transdukcji pożywkę wymieniano w celu usunięcia polibrenu z hodowli. Czwartego dnia po transdukcji komórki trypsynizowano i izolowano białka.

### **2.6.4. Izolacja białka i elektroforeza w warunkach denaturujących**

Izolację białek i elektroforezę przeprowadzano zgodnie z opisem w punkcie 2.4.4. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 60 V przez 20 minut, a następnie przez 1,5 godziny przy napięciu 120 V, z wykorzystaniem żeli komercyjnych takich jak w przypadku fibroblastów DRPLA.

### 2.6.5. Western blotting

Procedurę przeprowadzano zgodnie z opisem w punkcie 2.4.5.

## 2.7. Analiza efektywności i bezpieczeństwa amiRNA *in vivo*

### 2.7.1. Genotypowanie myszy

W celu potwierdzenia prawidłowego genotypu myszy, przeprowadzono PCR z wykorzystaniem dwóch par starterów – jednej amplifikujących fragment mysiego genu *Htt* oraz drugiej amplifikującej fragment ludzkiego genu *HTT* (tab. 5). Do analizy użyto DNA wyizolowany z fragmentów ogonów myszy przy pomocy buforu QuickExtract. W tym celu fragment ogona inkubowano w 50  $\mu$ l buforu w temperaturze 65°C przez 7 minut, następnie wytrząsano i inkubowano w temperaturze 98°C przez 3 minuty. Lizat rozcieńczano 5-krotnie. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR przedstawiono w tabeli 17, a warunki reakcji w tabeli 18.

**Tabela 17.** Skład mieszaniny reakcyjnej PCR do genotypowania myszy.

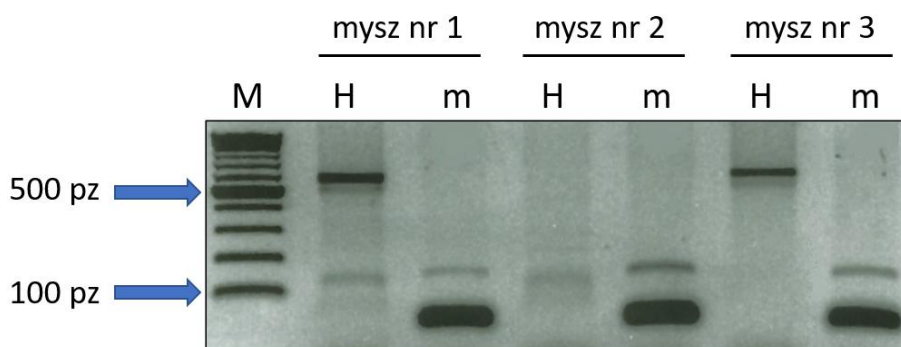
| Składnik                       | Ilość       |
|--------------------------------|-------------|
| DMSO                           | 1 $\mu$ l   |
| Starter prawy (10 mM)          | 0,2 $\mu$ l |
| Starter lewy (10 mM)           | 0,2 $\mu$ l |
| Bufor Green                    | 2 $\mu$ l   |
| MgCl <sub>2</sub>              | 1 $\mu$ l   |
| Dekosynukleotydy               | 0,2 $\mu$ l |
| Polimeraza DNA GoTaq® G2 Flexi | 0,1 $\mu$ l |
| H <sub>2</sub> O               | 4,3 $\mu$ l |
| Matryca DNA                    | 1 $\mu$ l   |

**Tabela 18.** Warunki PCR.

| Etap                   | Temperatura | Czas      | x35 |
|------------------------|-------------|-----------|-----|
| Wstępna denaturacja    | 95°C        | 3 minuty  |     |
| Denaturacja            | 95°C        | 30 sekund |     |
| Przyłączanie starterów | 60°C        | 30 sekund |     |
| Wydlużanie             | 72°C        | 45 sekund |     |
| Wydlużanie końcowe     | 72°C        | 7 minut   |     |



Produkty reakcji rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, a wizualizację przeprowadzano przy pomocy systemu G:box. Obecność prążka na wysokości ~600 par zasad (pz) i ~100 pz świadczyła o genotypie YAC128, natomiast prążek jedynie na wysokości 100 pz wskazywał na mysz zdrową (FvB/WT) (rys. 9).



**Rysunek 9.** Przykładowe zdjęcie żelu agarozowego przedstawiające wynik PCR przeprowadzonego w celu genotypowania myszy.

M – marker wielkości, H – wynik reakcji ze starterami dla *HTT*, m – wynik reakcji ze starterami dla *Htt*. Strzałkami oznaczono długości 100 pz i 500 pz. Mysz nr 2 wykazuje fenotyp myszy WT, a myszy nr 1 i 3 – YAC128.

### 2.7.2. Iniekcje

Procedury eksperymentalne na myszach przeprowadzono w Zwierzętarni Wielkopolskiego Centrum Zaawansowanych Technologii. Iniekcje, pomiar masy ciała, pobór tkanek oraz ogólny nadzór nad zwierzętami sprawowali mgr inż. Dorota Wronka, mgr Anna Karlik oraz dr Łukasz Przybył z Pracowni Modelowych Organizmów Ssaczych ICHB PAN.

Przeprowadzono pojedyncze bilateralne iniekcje do prążkowania w warunkach anestezji wziewnej, zgodnie z następującymi współrzędnymi stereotaktycznymi względem bregmy: AP +0,7 mm, ML ±1,7 mm, DV -3,5 mm. Jako nośnik amiRNA zastosowano wektor AAV o serotypie 5 (AAV5), charakteryzujący się zwiększonym tropizmem do komórek nerwowych. Wektory zostały wyprodukowane przez firmę Virovek. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, które otrzymały wektor niezawierający amiRNA (tzw. „empty”). Zastosowano dwie dawki – niską, oraz wysoką, których szczegółowe wartości przedstawiono w tabeli 19. Każdą grupę reprezentowało 4 osobników, po 2 z obu płci.

**Tabela 19.** Zastosowane dawki wektora wirusowego w poszczególnych eksperymentach.

| Eksperyment     | amiRNA                           |                                  | Pusty wektor                     |
|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                 | Dawka niska                      | Dawka wysoka                     |                                  |
| Krótkoterminowy | 2x10 <sup>11</sup> vg na półkulę | 4x10 <sup>11</sup> vg na półkulę | 2x10 <sup>11</sup> vg na półkulę |
| Długoterminowy  | 1x10 <sup>11</sup> vg na półkulę | 2x10 <sup>11</sup> vg na półkulę | 1x10 <sup>11</sup> vg na półkulę |

vg – genomy wektora (ang. *vector genomes*)

### 2.7.3. Pobór tkanek

Terminację zwierząt w eksperymencie krótkoterminowym oraz pobór tkanek przeprowadzono 11 tygodni po iniekcji, natomiast w przypadku eksperymentu długoterminowego procedurę wykonano 28 tygodni po iniekcji. Myszki uśmiercono poprzez przerwanie rdzenia kręgowego. Pobrano prążkowie, hipokamp oraz korę mózgu, dokonując podziału na dwie półkule, a następnie każdą z nich rozdzielono na trzy części, przeznaczone do izolacji DNA, RNA oraz białek. W przypadku eksperymentu długoterminowego dodatkowo pobrano krew, którą następnie odwirowano w celu oddzielenia surowicy. Tkanki natychmiast zamrożono w temperaturze -80°C.

### 2.7.4. Izolacja białka i elektroforeza w warunkach denaturujących

Białka izolowano z wykorzystaniem buforu PB. Tkanek homogenizowano w buforze poprzez wielokrotne pipetowanie, a następnie inkubowano przez 15 minut na lodzie. Kolejną całość denaturowano (95°C, 5 minut), a stężenie białek określano przy pomocy spektrofotometru DeNovix DS-11.

Rozdział białek przeprowadzano zgodnie z opisem w punkcie 2.4.4 z wykorzystaniem komercyjnych żeli takich jak w przypadku fibroblastów DRPLA. Elektroforezę prowadzono przez 20 minut przy napięciu 60 V, a następnie przez 2,5 godziny przy napięciu 130 V.

### 2.7.5. Western blotting

Procedurę Western blottingu przeprowadzono zgodnie z opisem w punkcie 2.4.5.

### **2.7.6. Izolacja całkowitego RNA z prądkowia**

Izolację przeprowadzono z wykorzystaniem TRIzol Reagent (Invitrogen). Tkanki zawieszono w 250 µl TRIzolu, a następnie homogenizowano poprzez wielokrotne pipetowanie i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Do prób dodano 50 µl chloroformu i wytrząsano. Po 15 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, próby wirowano przy 12000 RCF przez 15 minut w temperaturze 4°C. Fazę wodną przeniesiono do nowej probówki o objętości 1,5 ml i dodano do niej ekwiwalentną ilość izopropanolu. Po wymieszaniu próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, a następnie wirowano przy 12000 RCF przez 8 minut. Supernatant usunięto, a osad zawieszono w 250 µl 75% etanolu. Próby wirowano przy 7500 RCF przez 5 minut, po czym supernatant usunięto. Osad suszono przez 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie zawieszono w 20 µl sterylnej wody Milli-Q i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 60°C. Stężenie wyekstrahowanego RNA określano przy pomocy spektrofotometru DeNovix DS-11.

### **2.7.7. Oczyszczanie całkowitego RNA z zanieczyszczeń DNA**

Do 10 µg RNA dodano 2 µl DNAzy I i 10 µl buforu do DNAzy (Ambion), a następnie objętość próbki uzupełniono sterylną wodą do 100 µl. Próby inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut. Kolejno dodano 300 µl sterylnej wody Milli-Q oraz 2 objętości mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25:24:1). Po wytrząsaniu, próby zwirowano przez 3 minuty przy 15000 RCF w temperaturze 4°C. Fazę wodną przeniesiono do nowej probówki o objętości 1,5 ml i dodano równoważną objętość chloroformu. Po wymieszaniu, próby ponownie wirowano przez 3 minuty przy 15000 RCF w temperaturze 4°C. Fazę wodną przeniesiono do nowej probówki, następnie dodano 1/10 objętości 3 M octanu sodu (pH = 5,2), 2,5 objętości 99% etanolu oraz 1 µl glikogenu. Mieszaninę inkubowano w temperaturze -20°C przez noc, a następnie wirowano przez 20 minut przy 20000 RCF w temperaturze 4°C. Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 750 µl 75% etanolu. Po ponownym zwirowaniu w tych samych warunkach przez 10 minut supernatant odrzucono, osad wysuszono w temperaturze pokojowej, a następnie rozpuszczono w 20 µl sterylnej wody Milli-Q. Stężenie oczyszczonego RNA określano przy pomocy spektrofotometru DeNovix DS-11.

### 2.7.8. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję syntezy komplementarnego DNA (ang. *complementary DNA*, cDNA) na matrycy RNA przeprowadzono z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy SuperScript III (Invitrogen) zgodnie z zaleceniami producenta. Matrycę stanowił wyizolowany i oczyszczony całkowity RNA z prądkowa myszy w ilości 500 ng na próbę. Skład mieszaniny reakcyjnej dla 1 próby i etapy reakcji przedstawiono w tabeli 20.

**Tabela 20.** Etapy reakcji odwrotnej transkrypcji.

| Etap                          | Nazwa składnika           | Ilość    | Warunki                              |
|-------------------------------|---------------------------|----------|--------------------------------------|
| <i>Przylączanie starterów</i> | Matryca RNA               | 500 ng   | 65°C, 5 minut;<br>1 minuta na lodzie |
|                               | Heksamery                 | 1 µl     |                                      |
|                               | Deoksynukleotydy          | 1 µl     |                                      |
|                               | H <sub>2</sub> O          | Do 11 µl |                                      |
| <i>Synteza cDNA</i>           | Odwrotna transkryptaza    | 0,7 µl   | 25°C, 5 minut;<br>50°C, 60 minut     |
|                               | Inhibitor RNaz (RNaseOUT) | 0,7 µl   |                                      |
|                               | 0,1 M ditiotritol (DTT)   | 1 µl     |                                      |
|                               | Bufor 5x                  | 4 µl     |                                      |
| <i>Inaktywacja enzymu</i>     | -                         | -        | 70°C, 15 minut                       |

Reakcja odwrotnej transkrypcji w analizie efektów niespecyficznych *in vivo* została przeprowadzona przez mgr Julię Balcerek.

### 2.7.9. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym

RT-qPCR przeprowadzono przy użyciu termocyklera CFX Connect (Bio-Rad) z wykorzystaniem matrycy cDNA rozcieńczonej 10-krotnie. Wyniki analizowano przy pomocy oprogramowania CFX Maestro (Bio-Rad). Skład mieszaniny reakcyjnej podano w tabeli 21, a warunki w tabeli 22.

**Tabela 21.** Składniki mieszaniny reakcyjnej do qPCR oraz RT-qPCR.

| Składnik                                  | Ilość  |
|-------------------------------------------|--------|
| SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix | 5 µl   |
| Starter prawy (10 mM)                     | 0,5 µl |
| Starter lewy (10 mM)                      | 0,5 µl |
| H <sub>2</sub> O                          | 3 µl   |
| Matryca                                   | 1 µl   |

**Tabela 22.** Warunki RT-qPCR.

| Etap                               | Temperatura | Czas      |     |
|------------------------------------|-------------|-----------|-----|
| Wstępna denaturacja                | 95°C        | 30 sekund |     |
| Denaturacja                        | 95°C        | 15 sekund | x40 |
| Przylączanie starterów i elongacja | 58,8°C      | 30 sekund |     |

RT-qPCR w analizie efektów niespecyficznych *in vivo* został przeprowadzony przez mgr Julię Balcerek.

#### 2.7.10. Izolacja DNA z prążkowie

Izolację DNA przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Animal Genomic DNA Miniprep Kit (Bio Basic) według protokołu producenta. Stężenie wyizolowanego DNA określano przy pomocy spektrofotometru DeNovix DS-11.

#### 2.7.11. Ilościowy PCR

DNA rozcieńczono do stężenia ~10 ng/μl. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 21. Reakcję przeprowadzono z wykorzystaniem termocyklera CFX Connect według warunków podanych w tabeli 23.

**Tabela 23.** Warunki qPCR.

| Etap                               | Temperatura | Czas      |     |
|------------------------------------|-------------|-----------|-----|
| Wstępna denaturacja                | 95°C        | 30 sekund |     |
| Denaturacja                        | 95°C        | 15 sekund | x40 |
| Przylączanie starterów i elongacja | 63°C        | 30 sekund |     |

qPCR został przeprowadzony przez mgr. Michała Smuszkiewicza.

#### 2.7.12. Określenie poziomu NfL

Stężenie białka NfL oznaczano w surowicy krwi myszy 28 tygodni po iniekcji. Analizie poddano myszy traktowane dawką niską, wysoką, wektorem pustym, a także myszy zdrowe oraz chore nietraktowane wektorem. Analizę przeprowadzono w firmie Raybiotech (USA) z wykorzystaniem techniki Simoa Assay. Każda próba analizowana była w trzech powtórzeniach technicznych.

## **2.8. Analiza obróbki komórkowej amiRNA**

### **2.8.1. Transfekcja**

Komórki HEK293T o ~80% konfluencji na szalce o średnicy 6 cm transfekowano 4 µg plazmidu przy użyciu Lipofektaminy 2000, zgodnie z zaleceniami producenta. Po 4 godzinach od transfekcji pożywkę zmieniano na kompletną. Po upływie 24 godzin od transfekcji, komórki trypsynizowano, oddzielano od pożywki poprzez wirowanie, a następnie izolowano RNA.

### **2.8.2. Izolacja całkowitego RNA i oczyszczanie z zanieczyszczeń DNA**

Izolację RNA i oczyszczanie z DNA wykonano tak jak w punkcie 2.7.6 i 2.7.7.

### **2.8.3. Sekwencjonowanie nowej generacji**

Sekwencjonowanie nowej generacji małych RNA, poprzedzone przygotowaniem bibliotek RNA, przeprowadzono z wykorzystaniem materiału pochodzącego z komórek HEK293T oraz materiału z prądkowia myszy YAC128.

Sekwencjonowanie RNA z komórek HEK293T przeprowadzono w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, natomiast sekwencjonowanie RNA z materiału mysiego zrealizowano w firmie Novogene. W obu przypadkach wykorzystano sekwenator Illumina NovaSeq 6000. Dla próbek pochodzących z komórek HEK293T do sekwencjonowania wykorzystano 2 µg całkowitego RNA, a głębokość sekwencjonowania wynosiła 10 milionów odczytów. W przypadku próbek mysich, do sekwencjonowania przeznaczono również 2 µg całkowitego RNA, a głębokość sekwencjonowania wynosiła 30 milionów odczytów. Analizy bioinformatyczne uzyskanych danych przeprowadziła firma Data2biology.

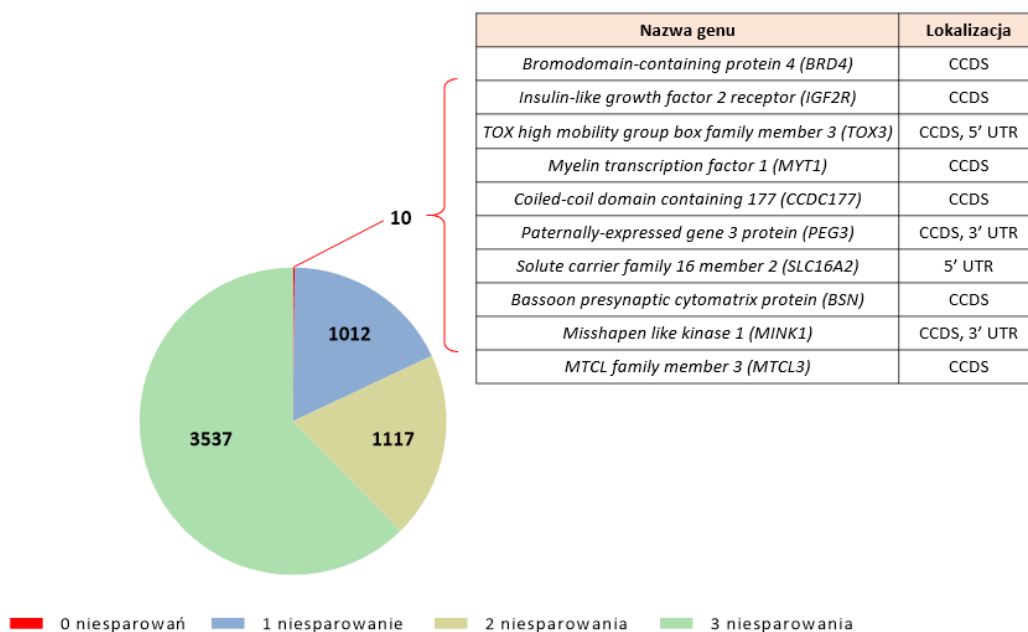
## **2.9. Analiza statystyczna**

Każdy eksperyment przeprowadzono w co najmniej trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych oraz co najmniej trzech technicznych, z wyjątkiem analizy markerów prekursorów neuronalnych, którą wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych. Szczegóły przeprowadzonych testów statystycznych przedstawiono pod poszczególnymi rysunkami. Analizę statystyczną wykonywano z wykorzystaniem programu Prism (GraphPad).

## IV Wyniki

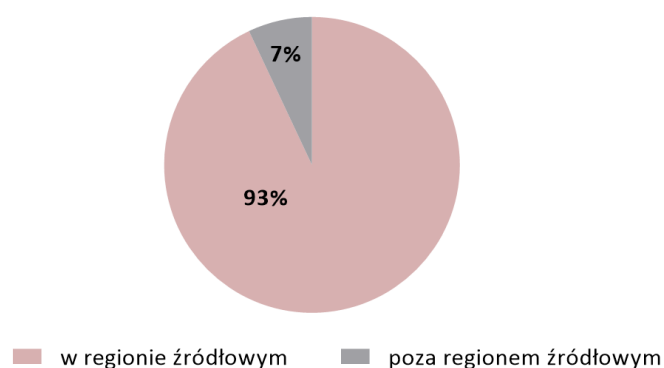
### 1. Optymalizacja sekwencji cząsteczki A2 w celu redukcji potencjalnych efektów off-target

W pierwszym etapie przeprowadzono bioinformatyczne mapowanie sekwencji nici wiodącej A2 do genomu ludzkiego (hg38/GRCh38). Analiza ta miała na celu oszacowanie ryzyka niespecyficznego wiązania A2 w kontekście całogenomowym, a także identyfikację miejsc możliwych substytucji, których wprowadzenie mogłoby ograniczyć liczbę sekwencji poza celem. Wykres kołowy ilustruje rozkład liczby potencjalnych sekwencji off-target z 1, 2 i 3 niedopasowaniami (rys. 10). W tabeli zestawiono 10 genów, w których transkryptach zidentyfikowano fragmenty w pełni komplementarne do nici wiodącej A2. Sekwencje te są szczególnie niebezpieczne, gdyż niezależnie od lokalizacji w obrębie transkryptu mogą skutkować wiązaniem A2 i degradacją mRNA. Dla każdego z tych trafień określono również lokalizację dopasowania. W przypadku dwóch genów (*PEG3*, *MINK1*), pełna komplementarność występowała jednocześnie w regionie kodującym (ang. Consensus Coding Sequence, CCDS) oraz w niekodującym 3' UTR, co może dodatkowo zwiększać ryzyko niepożądanego wyciszenia ekspresji.



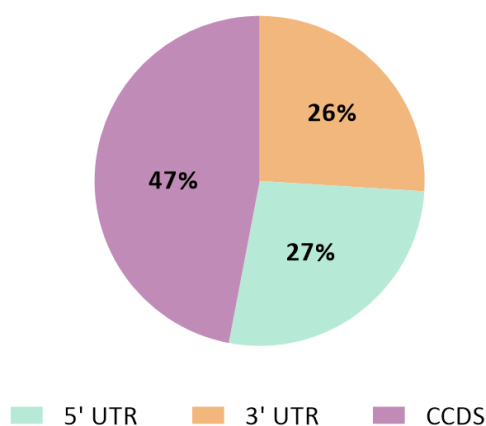
**Rysunek 10.** Liczba sekwencji poza celem w genomie ludzkim z 0, 1, 2 albo 3 niesparowaniami do sekwencji nici wiodącej A2, z wyszczególnieniem 10 w pełni komplementarnych sekwencji.

Dodatkowo, analiza wykazała obecność 1012 sekwencji z jednym niedopasowaniem, 1117 sekwencji z dwoma niesparowaniami, oraz 3537 sekwencji z trzema niesparowaniami względem A2 w genomie człowieka. Tak wysoka liczba sekwencji poza celem wskazała na potrzebę modyfikacji cząsteczki A2 w celu zwiększenia jej specyficzności, w związku z dużym ryzykiem wystąpienia efektu off-target. Warto jednak zaznaczyć, że zdecydowana większość sekwencji off-target zawiera niedopasowania zlokalizowane w regionie źródłowym nici wiodącej A2 – obszarem kluczowym dla specyficznego wiązania z mRNA (rys. 11). W związku z tym ryzyko przyłączenia się cząsteczki do 93% sekwencji jest niskie.



**Rysunek 11.** Procentowy rozkład sekwencji off-target zawierających niesparowania zlokalizowane w regionie źródłowym nici wiodącej A2 albo poza nim.

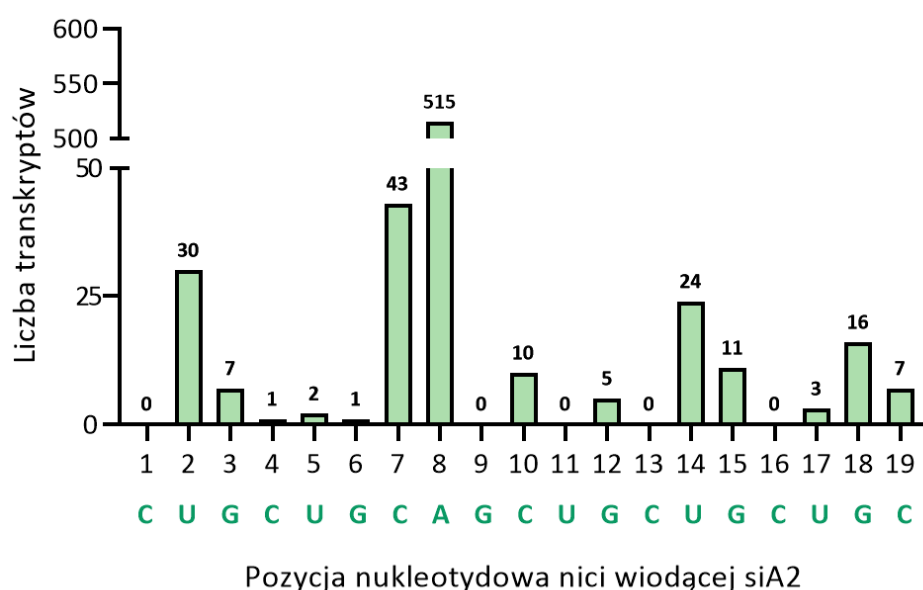
W przypadku sekwencji nie w pełni komplementarnych, możliwe jest wystąpienie zahamowania translacji, szczególnie gdy region docelowy jest zlokalizowany w 3' UTR. Mechanizm ten jest charakterystyczny dla działania endogennych cząsteczek miRNA. Przeprowadzona analiza wykazała, że 26% wszystkich przewidywanych sekwencji off-target zlokalizowanych było właśnie w tym obszarze (rys. 12).



**Rysunek 12.** Procentowy rozkład sekwencji off-target z uwzględnieniem lokalizacji w obrębie transkryptu.

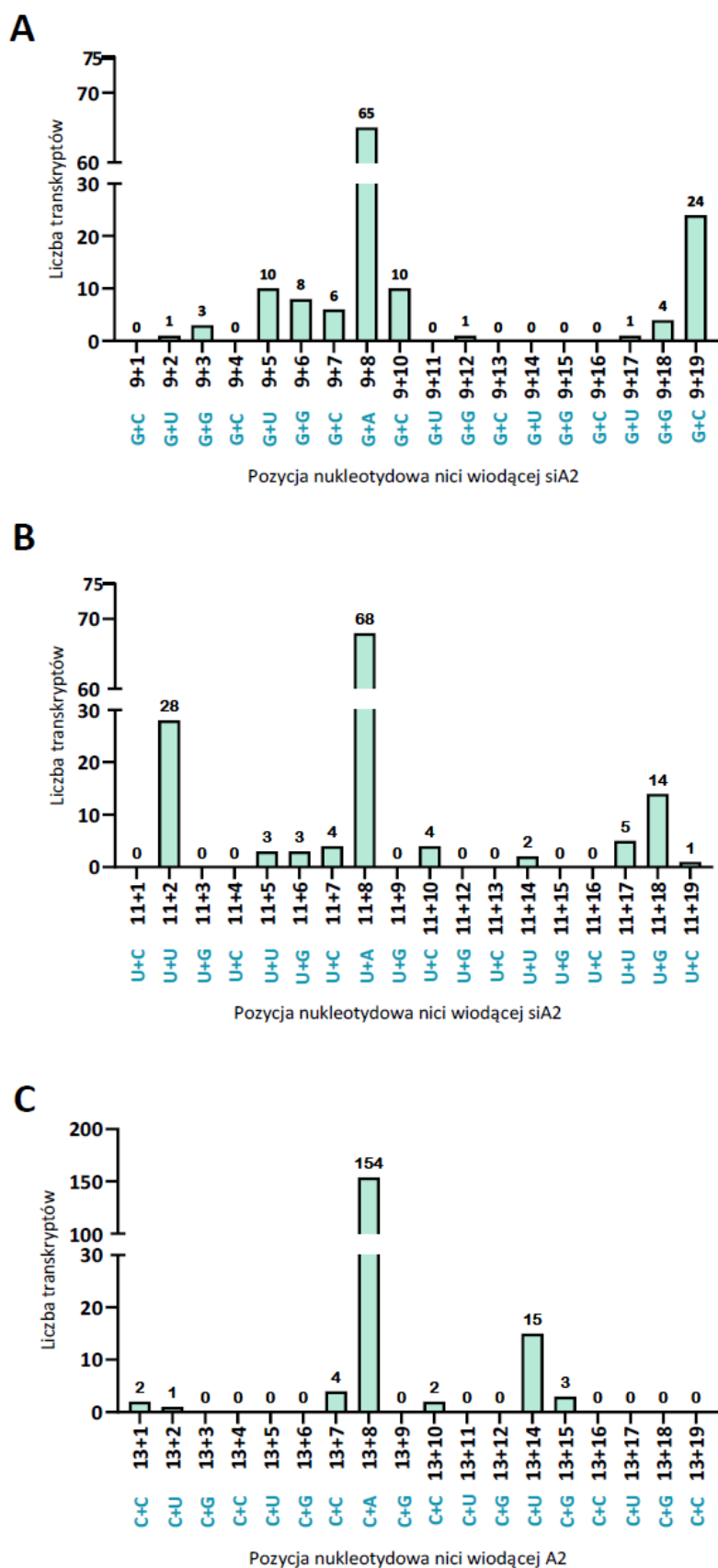


W następnym etapie sprawdzono liczbę sekwencji off-target posiadających pojedyncze niesparowanie względem określonej pozycji nukleotydowej nici wiodącej A2 (rys. 13). Odnotowano największą liczbę sekwencji poza celem (515 przypadków) z niesparowaniem w pozycji 8, czyli w miejscu gdzie cząsteczka A2 posiada substytucję U>A. Są to najprawdopodobniej miejsca występowania czystych ciągów CAG w genomie. Co ciekawe, w pozycjach 1,9,11,13 oraz 16 nie odnotowano żadnych sekwencji z 1 niesparowaniem. Oznacza to, że modyfikacja tych pozycji niesie ze sobą najmniejsze ryzyko efektów off-target.



**Rysunek 13.** Liczba sekwencji poza celem z pojedynczym niesparowaniem w określonej pozycji nukleotydowej nici wiodącej A2.

Kolejno przeanalizowano liczbę sekwencji off-target posiadających dwa niesparowania do sekwencji nici wiodącej A2 przy założeniu, że jedno z tych niesparowań występuje w jednej z tych pozycji nukleotydowych, dla której wcześniej nie odnotowano żadnych sekwencji off-target z pojedynczym niedopasowaniem (rys. 14). Do analizy wybrano jedynie pozycje 9, 11 oraz 13, pomijając pozycje skrajne (1 i 16), ze względu na ich mniejszą rolę w oddziaływaniu z sekwencją docelową w transkrypcie.



**Rysunek 14.** Liczba sekwencji poza celem z podwójnym niesparowaniem, z których jedno jest zawsze w pozycji (A) 9, (B) 11, albo (C) 13 nici wiodącej A2.

We wszystkich trzech przypadkach (A-C) odnotowano znaczące zmniejszenie liczby sekwencji off-target w porównaniu do sytuacji z pojedynczym niesparowaniem (rys. 13). Największa liczba dopasowań w każdym przypadku dotyczyła sytuacji, w której drugie niesparowanie wypadało w pozycji 8, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami. Na podstawie uzyskanych wyników zdecydowano o wprowadzeniu dodatkowej substytucji w pozycje 9, 11 albo 13.

W tabeli 24 przedstawiono zaproponowane substytucje nukleotydowe w sekwencjach nici wiodących zaprojektowanych pięciu cząsteczek. W przypadku czterech zdecydowano o podstawieniu nukleotydu adeniny, natomiast w jednym przypadku, w pozycji 13, zaproponowano także podstawienie guaniny. Nazewnictwo poszczególnych wariantów odnosi się do pozycji nukleotydowej, w której wprowadzono modyfikację, oraz do rodzaju podstawionego nukleotydu. Sekwencja cząsteczki wyjściowej (A2) została zestawiona w celu umożliwienia bezpośredniego porównania.

**Tabela 24.** Sekwencje nici wiodących zaprojektowanych cząsteczek oraz cząsteczki wyjściowej A2 z zaznaczonymi substytucjami.

A – adenina, G – guanina.

| Nazwa | Sekwencja nici wiodącej 5' → 3' |
|-------|---------------------------------|
| A2    | CUGCUGCAGCUGCUGC                |
| 9A    | CUGCUGCACUGCUGC                 |
| 10A   | CUGCUGCAGAUGCUGC                |
| 11A   | CUGCUGCAGCAGCUGC                |
| 13A   | CUGCUGCAGCUGAUGCUGC             |
| 13G   | CUGCUGCAGCUGGUGCUGC             |

Dodatkowo, zaproponowane cząsteczki przeanalizowano z wykorzystaniem algorytmu NCBI BLAST w celu określenia liczby sekwencji off-target w ludzkim transkryptomie, z 0, 1 albo 2 niesparowaniami do ich przewidywanych sekwencji nici wiodących. Zgodnie z założeniem, liczba sekwencji poza celem uległa zmniejszeniu w porównaniu do cząsteczki wyjściowej A2 (tab. 25). W przypadku sekwencji w pełni komplementarnych, dla czterech cząsteczek (9A, 10A, 13G oraz 13A) nie zidentyfikowano żadnych sekwencji off-target. Jedynie dla cząsteczki 11A odnotowano pojedyncze w pełni komplementarne dopasowanie w genie kodującym białko *polypyrimidine tract binding protein 2* (PTBP2). Co istotne, również liczba sekwencji z jednym albo dwoma niedopasowaniami uległa istotnemu obniżeniu

we wszystkich wariantach w porównaniu do A2. Spośród wszystkich analizowanych modyfikacji, cząsteczka 13A wykazała najniższą liczbę sekwencji off-target z jednym i dwoma niesparowaniami, co czyni ją pod tym kątem najbardziej obiecującym kandydatem do dalszych analiz funkcjonalnych.

**Tabela 25.** Liczba sekwencji off-target z 0, 1 albo 2 niesparowaniami w ludzkim transkrypcie względem nici wiodącej siRNA dla nowo zaprojektowanych cząsteczek, w odniesieniu do A2.

| Liczba niesparowań | Cząsteczka |    |     |     |     |     |
|--------------------|------------|----|-----|-----|-----|-----|
|                    | A2         | 9A | 10A | 11A | 13G | 13A |
| 0                  | 10         | 0  | 0   | 1   | 0   | 0   |
| 1                  | 368        | 51 | 34  | 82  | 37  | 18  |
| 2                  | 208        | 30 | 35  | 123 | 65  | 25  |

## 2. Analiza efektywności i allelo-selektywności zaprojektowanych shRNA

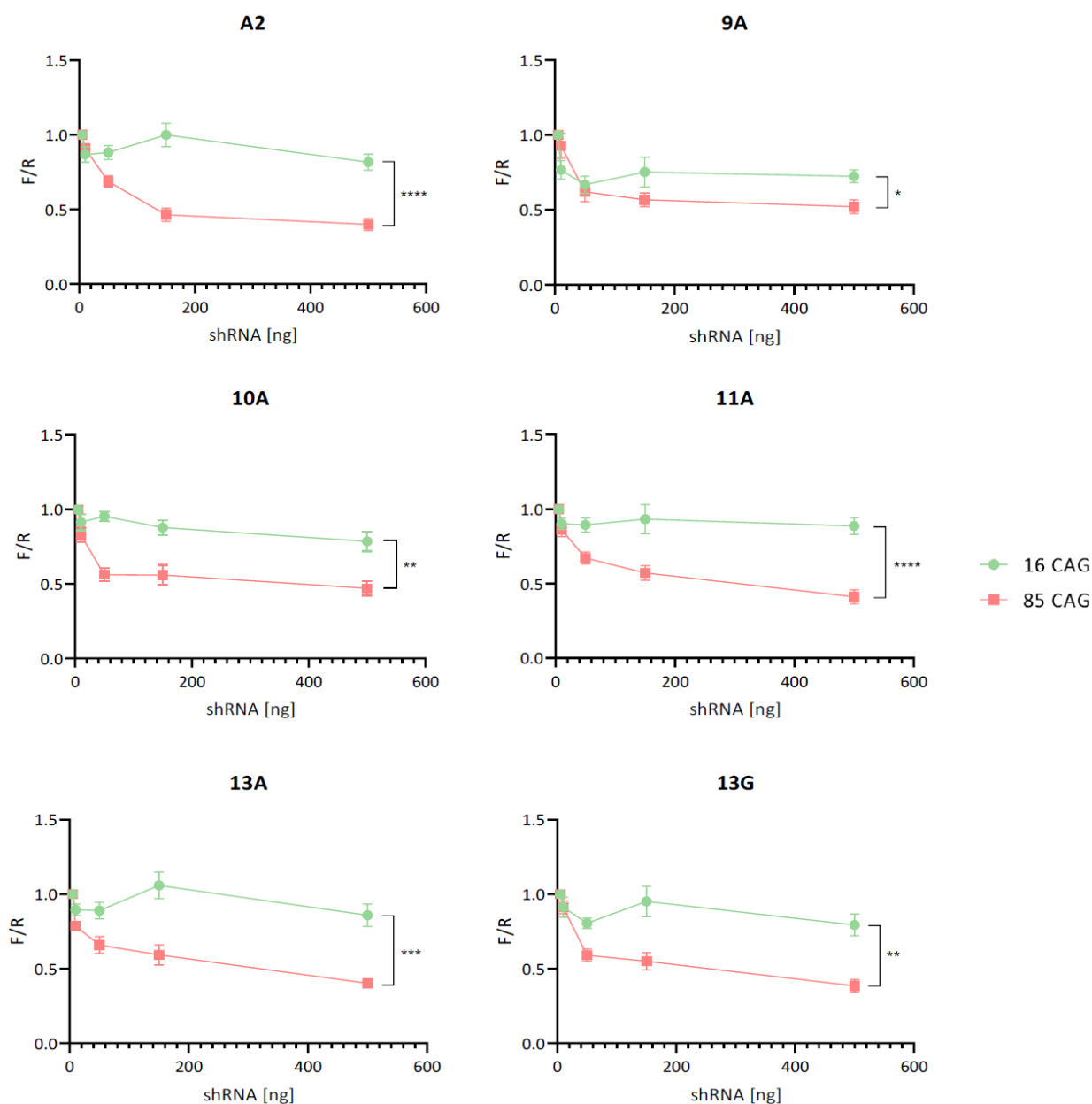
### 2.1. Wstępna ocena działania cząsteczek shRNA w systemie lucyferazowym

Wstępną selekcję nowych wariantów cząsteczki A2 przeprowadzono z wykorzystaniem testu lucyferazowego w komórkach HEK293T. Do tego celu zastosowano uproszczony format cząsteczki – shRNA, zamiast docelowego amiRNA. Cząsteczki te zaprojektowano w formie oligonukleotydów, składających się z trzonu siRNA oraz pętli ludzkiego pri-miR-23. Reporterowa analiza umożliwiła porównanie efektywności wyciszania ekspresji *HTT* (wariantu prawidłowego – 16 CAG oraz zmutowanego – 85 CAG) przez różne shRNA.

Analiza wykazała, iż wszystkie cząsteczki obniżały poziom nieprawidłowej HTT w badanym modelu, natomiast efektywność i selektywność poszczególnych cząsteczek zależała od pozycji wprowadzonej substytucji (rys. 15). W przypadku cząsteczek sh9A i sh10A odnotowano relatywnie niższe wyciszenie ekspresji allelu zmutowanego (do ~50%) w porównaniu do shA2. Jednocześnie, dla sh9A zaobserwowano także umiarkowaną, 30% redukcję ekspresji allelu normalnego, co wskazuje na ograniczoną selektywność tej cząsteczki. Wyraźnie wyższą preferencyjnością wobec allelu zmutowanego charakteryzowały się natomiast cząsteczki sh11A, sh13G oraz sh13A. Największą efektywnością wyciszenia tego allelu charakteryzowała się cząsteczka sh13G (61%), która była porównywalnie efektywna jak shA2. Podobny poziom odnotowano dla sh11A i sh13A (kolejno 60% i 59% wyciszenia).

Największą allelo-selektywnością charakteryzowała się cząsteczka sh11A ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*), co wskazuje na silną preferencję cząsteczki sh11A wobec allelu zmutowanego przy jednoczesnym ograniczonym wpływie na allel prawidłowy.

Na podstawie tych wyników, zdecydowano o przeznaczeniu do dalszych analiz cząsteczek najbardziej efektywnych oraz cechujących się najwyższą preferencją względem allelu zmutowanego – sh11A, sh13A oraz sh13G.



**Rysunek 15.** Analiza wyciszenia ekspresji *HTT* w systemie lucyferazowym.

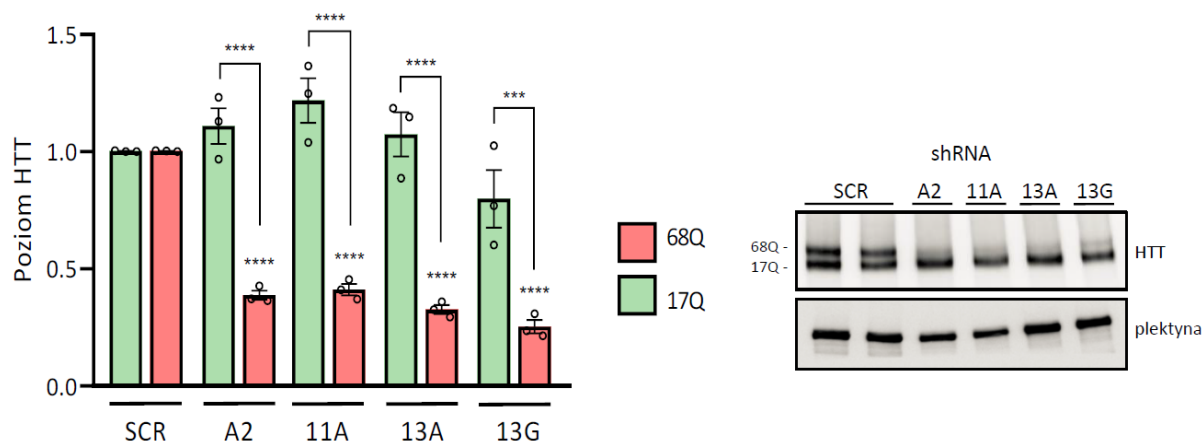
Komórki linii HEK293T transfekowano plazmidami kodującymi shRNA (w tym kontrolne shSCR) w ilościach 5, 10, 50, 150 i 500 ng oraz plazmidami z sekwencją eksonu 1 *HTT* z 16 albo 85 powtórzeniami CAG w ilości 50 ng. Pomiar sygnału bioluminescencji przeprowadzono 48 godzin po transfekcji. Punkty na wykresie przedstawiają średnie wartości stosunku aktywności lucyferazy świetlika do lucyferazy Renilli (F/R)  $\pm$  SEM (standardowy błąd pomiaru), obliczone na podstawie trzech powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Wyniki normalizowano względem sygnału dla cząsteczki shSCR. Kolor zielony odpowiada wynikowi dla wariantu 16 CAG, a czerwony dla 85 CAG. Analizę statystyczną przeprowadzono metodą dwukierunkowej ANOVA z zastosowaniem korekty Sidaka. Wartości  $p$  wyników uzyskanych dla różnych długości powtórzeń CAG przy dawce 500 ng amiRNA oznaczono za pomocą gwiazdek:  $p < 0,05$  – \*;  $p < 0,01$  – \*\*;  $p < 0,001$  – \*\*\*;  $p < 0,0001$  – \*\*\*\*.

## 2.3. Ocena efektywności wybranych shRNA w modelu fibroblastów HD

Wybrane cząsteczki shRNA przeanalizowano pod kątem efektywności w modelu fibroblastów pochodzących od pacjenta HD posiadającego 68 powtórzeń CAG (68Q) w allelu zmutowanym oraz 17 powtórzeń CAG (17Q) w allelu prawidłowym. W tym celu, komórki transdukowano cząsteczkami lentiwirusowymi zawierającymi shRNA, a następnie wykonano analizę poziomu HTT metodą Western blotting.

Wyniki tej analizy były zgodne z obserwacjami uzyskanymi w systemie reporterowym. Zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie poziomu zmutowanej HTT, wynoszące odpowiednio 59%, 68% i 75% ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*) dla cząsteczek sh11A, sh13A i sh13G (rys. 16). Jednocześnie nie zaobserwowano redukcji poziomu białka prawidłowego. Wszystkie analizowane cząsteczki wykazywały podobną preferencję względem allelu zmutowanego w porównaniu do shA2.

Wyniki te potwierdzają, że wprowadzenie dodatkowego niesparowania w sekwencji nici wiodącej cząsteczki A2 względem docelowego mRNA nie prowadzi do obniżenia jej efektywności działania. Ze względu na zbliżony profil aktywności wybranych wariantów, zdecydowano się na ich ponowną ocenę, tym razem w formacie docelowym – amiRNA.



**Rysunek 16.** Analiza poziomu białka HTT w fibroblastach HD.

Komórki linii GM04281 (68/17Q) transdukowano wirionami zawierającymi sekwencje shA2, sh11A, sh13A oraz sh13G a także kontrolę negatywną shSCR, przy MOI=10. Po 7 dniach przeprowadzono analizę metodą Western blotting. Słupki na wykresie przedstawiają średnie poziomy białka  $\pm$  SEM obliczone na podstawie trzech powtórzeń biologicznych oraz przynajmniej trzech powtórzeń technicznych. Kolorem czerwonym oznaczono poziom białka zmutowanego, a kolorem zielonym – normalnego. Poziom HTT znormalizowano względem poziomu białka referencyjnego – plectyny. Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem jednokierunkowej ANOVA z zastosowaniem korekty Tukeya. Wartości  $p$  oznaczono za pomocą gwiazdek:  $p < 0,001$  –\*\*\*;  $p < 0,0001$  –\*\*\*\*.

### **3. Analiza efektywności i allelo-selektywności wybranych amiRNA**

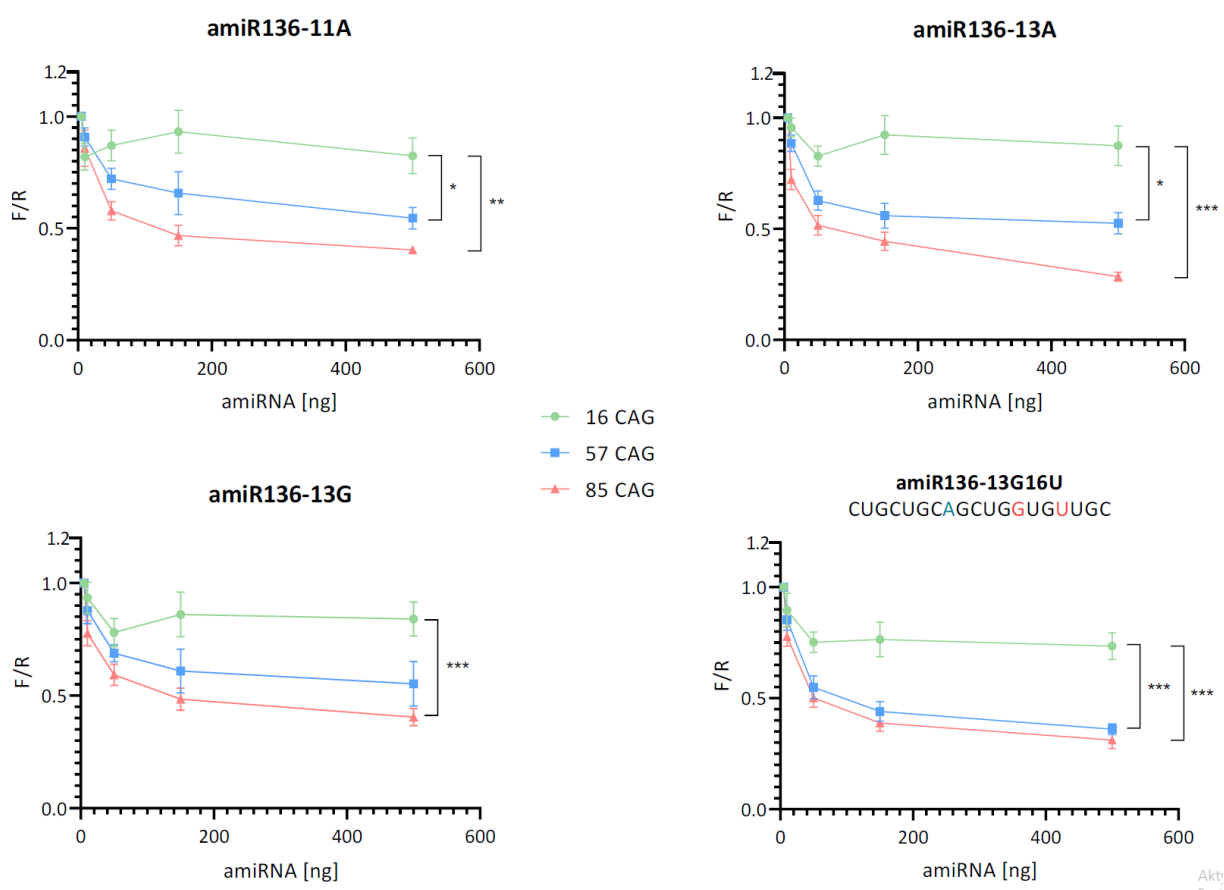
#### **3.1. Wstępna ocena działania cząsteczek amiRNA w systemie lucyferazowym**

Projektując cząsteczki amiRNA, sekwencje siRNA 11A, 13A oraz 13G umieszczono w kadłubie ludzkiego pri-miR-136, tym samym, w którym testowano wcześniej cząsteczkę A2. Co ciekawe, podczas etapu transformacji uzyskano również przypadkowo konstrukt zawierający sekwencję amiRNA z trzema niesparowaniami względem ciągu CAG (pozycje 8:A, 13:G, 16:U), który nazwano amiR136-13G16U (rys. 17). Zdecydowano o włączeniu tego wariantu do dalszych analiz obok pozostałych zaprojektowanych cząsteczek. Eksperyment z wykorzystaniem systemu reporterowego przeprowadzono analogicznie jak w przypadku shRNA. Dodatkowo zastosowano konstrukt odpowiadający krótszemu wariantowi allelu nieprawidłowego, zawierający 57 powtórzeń CAG.

Zaobserwowano, iż cząsteczki amiRNA charakteryzowały się podobną efektywnością względem swoich odpowiedników w formie shRNA (rys. 17). Najniższy stopień wyciszenia ekspresji allelu zmutowanego odnotowano dla wariantu amiR136-11A (60%), natomiast najwyższy dla amiR136-13A (72%). Dla wariantu amiR136-13G16U uzyskano zbliżony poziom wyciszenia obu alleli zmutowanych (57 i 85 CAG), który wynosił ~65% przy 500 ng amiRNA. Minimalna redukcja ekspresji allelu prawidłowego, mieszcząca się w zakresie 10-27%, potwierdza wysoką preferencję cząsteczek do allelu nieprawidłowego. Eksperyment ten potwierdził dodatkowo, iż wprowadzenie trzeciej substytucji względem ciągu CAG w pozycji 16 nie obniża efektywności i selektywności cząsteczki.

Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych analiz wybrano cząsteczki amiR136-13A oraz amiR136-13G16U, charakteryzujące się wysoką efektywnością i allelo-selektywnością.





**Rysunek 17.** Analiza wyciszenia *HTT* w systemie lucyferazowym.

Komórki linii HEK293T transfekowano plazmidami kodującymi amiRNA w ilościach 5, 10, 50, 150 i 500 ng oraz plazmidami z sekwencją eksonu 1 *HTT* z 16, 57 albo 85 powtórzeniami CAG w ilości 50 ng. Pomiar sygnału bioluminescencji przeprowadzono 48 godzin po transfekcji. Punkty na wykresie przedstawiają średnie wartości stosunku aktywności lucyferazy świetlika do lucyferazy Renilli (F/R)  $\pm$  SEM, obliczone na podstawie trzech powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Wyniki normalizowano względem sygnału dla plazmidu nieposiadającego sekwencji amiRNA, tzw. „pustego”. Kolor zielony odpowiada wynikowi dla wariantu z 16 CAG, niebieski dla 57 CAG, a czerwony dla 85 CAG. Analizę statystyczną przeprowadzono metodą dwukierunkowej ANOVA z zastosowaniem korekty Sidaka. Wartości  $p$  wyników uzyskanych dla różnych długości powtórzeń CAG przy dawce 500 ng amiRNA oznaczono za pomocą gwiazdek:  $p < 0,05$  – \*;  $p < 0,01$  – \*\*;  $p < 0,001$  – \*\*\*.

### 3.2. Ocena efektywności wybranych amiRNA w modelu fibroblastów HD, SCA3 i DRPLA

W kolejnym eksperymencie przetestowano wybrane amiRNA w modelach fibroblastów pochodzących od pacjentów. Oprócz HD, zakres badań rozszerzono o modele komórkowe dwóch innych chorób poliQ – SCA3 oraz DRPLA. Zastosowanie trzech niezależnych modeli komórkowych, reprezentujących różne jednostki chorobowe z grupy poliQ, miało na celu nie tylko ocenę skuteczności działania zaprojektowanych cząsteczek amiRNA w warunkach

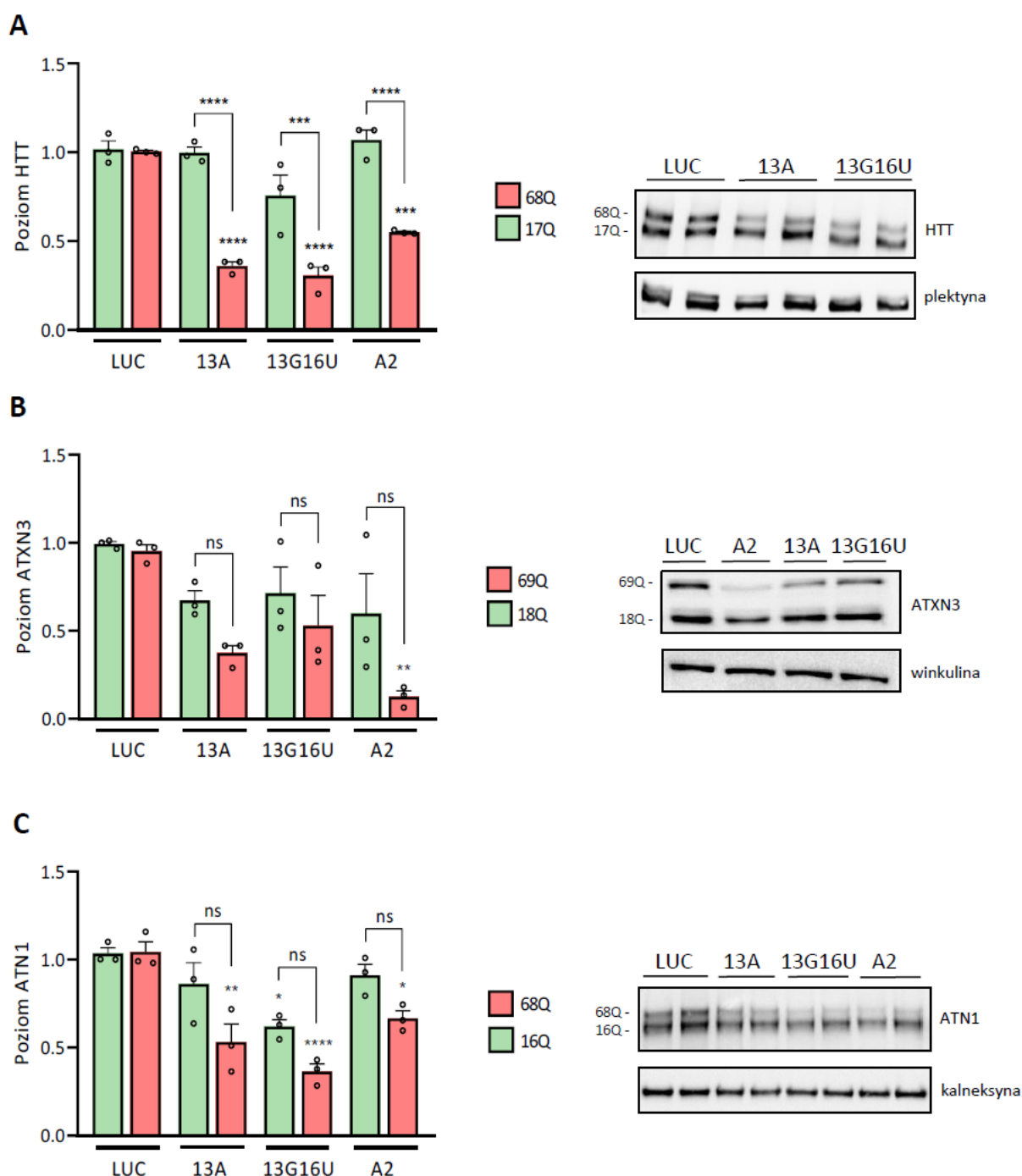
bardziej zbliżonych do rzeczywistego kontekstu chorobowego, ale również weryfikację ich uniwersalności, czyli potencjalnego zastosowania w terapii innych chorób charakteryzujących się ekspansją CAG.

W modelu fibroblastów od pacjenta HD, największe obniżenie poziomu białka zmutowanego uzyskano po zastosowaniu amiR136-13G16U (70%,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*) (rys. 18A). W przypadku amiR136-13A, cząsteczka ta charakteryzowała się lepszą selektywnością niż amiR13G16U i uzyskała 64% ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*) obniżenie poziomu białka zmutowanego (ang. *mutant HTT*, mHTT), przy jednoczesnym całkowitym braku wyciszenia allelu normalnego. Obie te cząsteczki okazały się być bardziej efektywne od amiR136-A2 pod względem redukcji poziomu mHTT.

W modelu SCA3 zaobserwowano odmienny profil redukcji poziomu nieprawidłowego białka (rys. 18B). Największy poziom redukcji zmutowanej ATXN3 (mATXN3) uzyskano po zastosowaniu amiR136-A2 (87%,  $p < 0,01$ , \*\*). W przypadku pozostałych cząsteczek zaobserwowano jedynie trend spadku poziomu mATXN3, który nie osiągnął istotności statystycznej. Poziom normalnego białka nie uległ istotnej zmianie.

W fibroblastach DRPLA także zaobserwowano odmienną efektywność dla każdego amiRNA (rys. 18C). Cząsteczka amiR136-A2 nie powodowała istotnej statystycznie redukcji poziomu białka, z kolei amiR136-13A wpłynęła istotnie na ekspresję allelu zmutowanego, obniżając poziom zmutowanej ATN1 (mATN1) o ~50% ( $p < 0,01$ , \*\*). Istotną statystycznie redukcję poziomu białka normalnego odnotowano w przypadku amiR136-13G16U (38%,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Pozostałe cząsteczki nie miały wpływu na poziom prawidłowej ATN1.

Dla każdego z badanych modeli poliQ zaobserwowano odmienne poziomy wyciszenia ekspresji po zastosowaniu różnych amiRNA. Dodatkowo, cząsteczki te utraciły allelo-selektywność w fibroblastach SCA3 i DRPLA. Z tego względu nie wyłoniono jednego wspólnego kandydata na uniwersalną cząsteczkę terapeutyczną o jednakowym profilu efektywności i allelo-selektywności. W celu pełniejszej oceny działania badanych amiRNA w SCA3 oraz DRPLA konieczne byłoby rozszerzenie badań o inne modele badawcze. W przypadku HD, najbardziej obiecującą cząsteczką okazała się amiR136-13A, która zapewniła silne i statystycznie istotne obniżenie poziomu mHTT bez wpływu na ekspresję allelu prawidłowego. Ze względu na jej wysoką efektywność potwierdzoną w dwóch niezależnych modelach HD oraz najniższą liczbę sekwencji poza celem zdecydowano o jej wyborze do dalszych analiz.



**Rysunek 18.** Analiza poziomów białek poliglutaminowych w fibroblastach (A) HD, (B) SCA3 i (C) DRPLA.

Komórki linii GM04281 (HD, 68/17Q), GM06153 (SCA3, 69/18Q) i GM13717 (DRPLA, 68/16Q) transdukowano cząsteczkami lentiwirusowymi zawierającymi sekwencje amiR136-A2, amiR136-13A oraz amiR136-13G16U, a także kontrolę negatywną o sekwencji celującej w gen lucyferazy – amiR136-LUC (MOI=10). Po 7 dniach przeprowadzono analizę metodą Western blotting. Słupki na wykresie przedstawiają średnie poziomy białka  $\pm$  SEM obliczone na podstawie trzech powtórzeń biologicznych oraz przynajmniej trzech powtórzeń technicznych. Kolorem czerwonym oznaczono poziom białka zmutowanego, a kolorem zielonym – normalnego. Poziom białek poliQ znormalizowano względem poziomów białek referencyjnych – plektyny, winkuliny oraz kalneksyny, odpowiednio. Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem jednokierunkowej ANOVA z zastosowaniem korekty Tukeya. Wartości  $p$  oznaczono za pomocą gwiazdek:  $p < 0,05$  – \*;  $p < 0,01$  – \*\*;  $p < 0,001$  – \*\*\*;  $p < 0,0001$  – \*\*\*\*. ns – wynik nieistotny statystycznie.

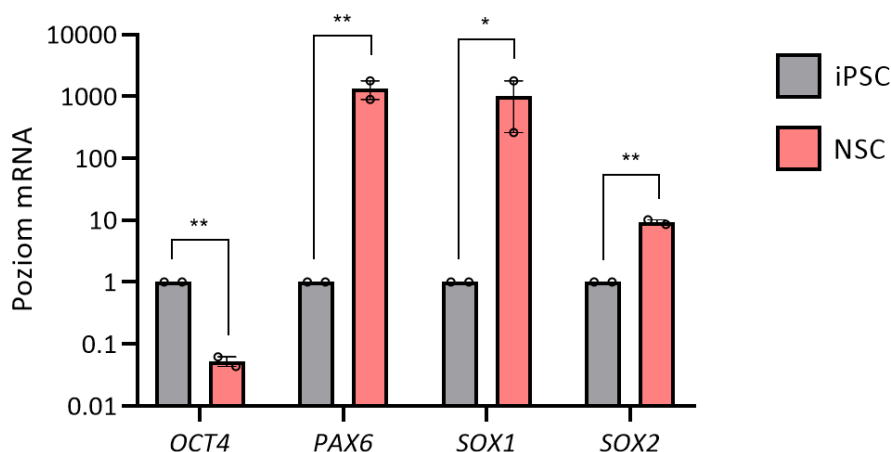
#### 4. Analiza efektów niespecyficznych w modelu ludzkich prekursorów neuronalnych

Celem niniejszego eksperymentu była kompleksowa analiza zmian ekspresji genów, ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnych efektów off-target, w transkrypcyjnym komórkowym, po zastosowaniu amiR136-13A w modelu ludzkich prekursorów neuronalnych (ang. *neural stem cells*, NSC) HD, wyprowadzonych z iPSC.

##### 4.1. Określenie markerów prekursorów neuronalnych

iPSC HD różnicowano w kierunku NSC na drodze hodowli w monowarstwie. Klucowym etapem weryfikacji prawidłowego przebiegu różnicowania była ocena poziomu ekspresji markerów charakterystycznych dla NSC (*SOX1*, *SOX2*, *PAX6*) oraz markera pluripotencji (*OCT4*), w celu potwierdzenia osiągnięcia prawidłowego fenotypu. W tym celu, po czwartym pasażu komórek przeprowadzono analizę ekspresji genów metodą RT-qPCR. Otrzymane wyniki zostały znormalizowane względem poziomu ekspresji genu referencyjnego *EEF2* (*Eukaryotic Elongation Factor 2*).

W wyniku analizy ekspresji markerów różnicowania stwierdzono znaczny, statystycznie istotny wzrost ekspresji genów *SOX1*, *SOX2* oraz *PAX6*, przy jednoczesnym obniżeniu poziomu *OCT4*, markera komórek pluripotencjalnych, co potwierdza utratę cech charakterystycznych dla iPSC (rys. 19). Wynik ten potwierdza prawidłowy fenotyp NSC.

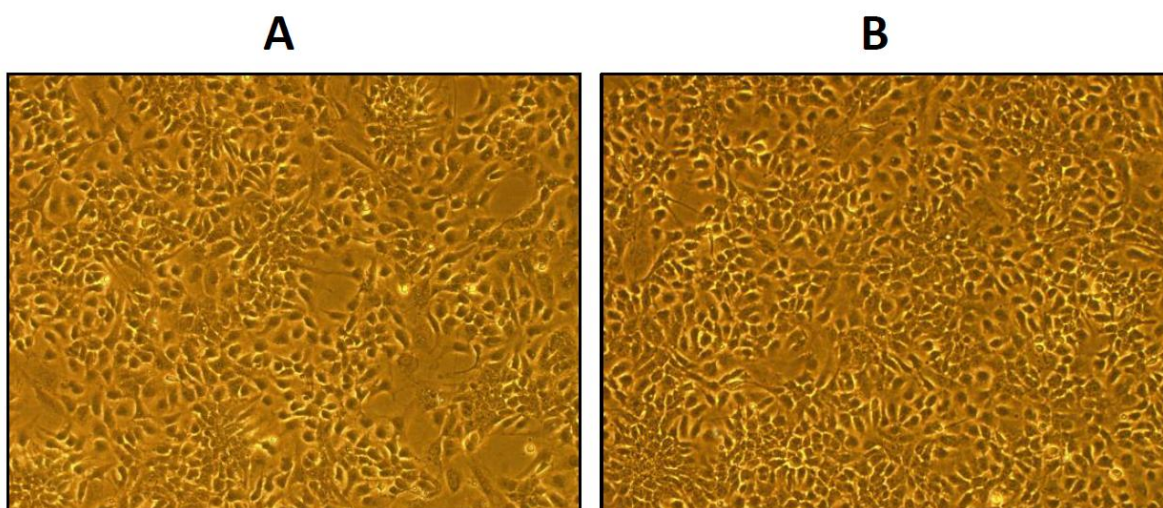


**Rysunek 19.** Poziom ekspresji genów *OCT4*, *PAX6*, *SOX1* oraz *SOX2* w NSC.

Poziom ekspresji mierzono przy pomocy RT-qPCR po 4 dniu pasażu NSC wyprowadzonych z iPSC. Wynik znormalizowano względem poziomu ekspresji w iPSC. Słupki na wykresie przedstawiają średnie poziomy mRNA  $\pm$  SEM obliczone na podstawie dwóch powtórzeń biologicznych oraz trzech powtórzeń technicznych. Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem testu t-Studenta. Wartości  $p$  oznaczono za pomocą gwiazdek:  $p < 0,05$  – \*;  $p < 0,01$  – \*\*.

#### 4.2. Analiza poziomu HTT

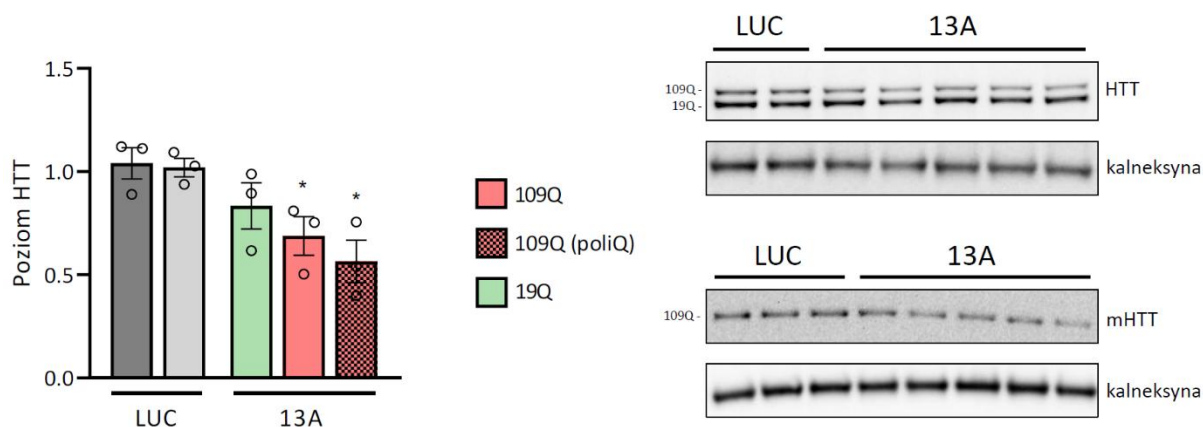
Kolejnym istotnym etapem, poprzedzającym analizę transkryptomiczną, było określenie efektywności amiR136-13A w NSC HD. W tym celu komórki poddano transdukcji lentiwirusowej. Nie zaobserwowano istotnych różnic fenotypowych pomiędzy komórkami transdukowanymi amiR136-13A a amiR136-LUC (rys. 20).



**Rysunek 20.** Obraz mikroskopowy NSC HD (ND42222) 72 godziny od transdukcji (A) amiR136-13A oraz (B) amiR136-LUC.

Następnie przeprowadzono analizę poziomu HTT z wykorzystaniem metody Western blotting oraz dwóch przeciwciał – anti-HTT, rozpoznające całkowitą HTT oraz anti-poliQ, specyficzne do regionu poliglutaminowego, umożliwiające selektywną detekcję mHTT.

Zastosowanie cząsteczki amiR136-13A doprowadziło do istotnego statystycznie obniżenia poziomu mHTT o ~40% ( $p < 0,05$ , \*), potwierdzonego przy użyciu obu przeciwciał (rys. 21). Efekt ten był jednak niższy niż w modelu fibroblastów HD. Obserwowany trend redukcji poziomu białka zmutowanego przy jednoczesnym braku wpływu na ekspresję allelu prawidłowego wskazuje na korzystny profil selektywności działania cząsteczki amiR136-13A. Wynik ten jest spójny z danymi uzyskanymi przy użyciu przeciwciała anti-poliQ, wykazującego istotne obniżenie poziomu mHTT.



**Rysunek 21.** Analiza poziomu HTT w ludzkich NSC HD.

NSC HD (109/19Q) transdukowano wirionami zawierającymi sekwencję amiR136-13A oraz cząsteczkę będącą kontrolą negatywną – amiR136-LUC, przy MOI=10. Po 7 dniach przeprowadzono analizę metodą Western blotting. Słupki na wykresie przedstawiają średnie poziomy białka  $\pm$  SEM obliczone na podstawie trzech powtórzeń biologicznych oraz przynajmniej trzech powtórzeń technicznych. Kolorem czerwonym oznaczono poziom białka zmutowanego, a kolorem zielonym – normalnego. Poziom HTT znormalizowano względem poziomu białka referencyjnego – kalneksyny. Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem testu t-Studenta, porównując wynik dla mHTT po traktowaniu amiR136-LUC z wynikiem dla mHTT po traktowaniu amiR136-13A. Wartość  $p$  oznaczono za pomocą gwiazdki:  $p < 0,05$  – \*. ns – wynik nieistotny statystycznie. poliQ – przeciwciało anty-poliQ.

#### 4.3. Analiza transkryptomyczna

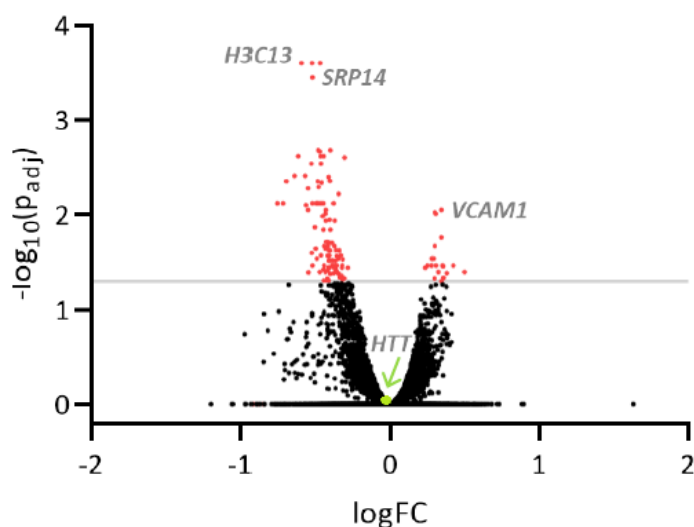
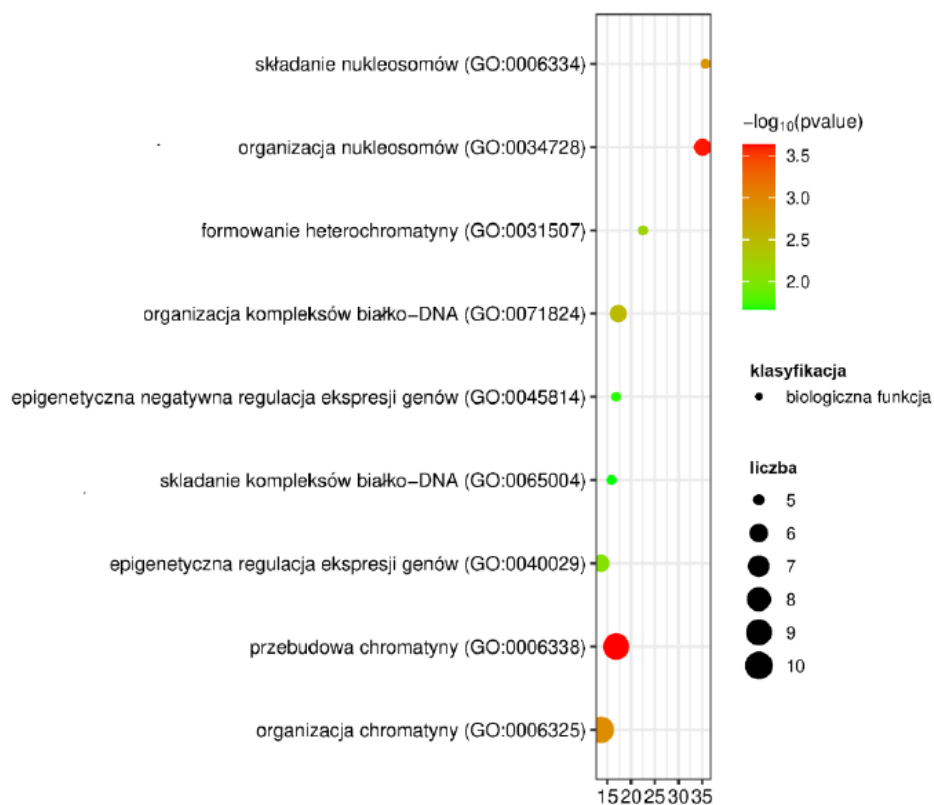
W kolejnym etapie przeprowadzono sekwencjonowanie mRNA. Analiza bioinformatyczna wykazała, iż próby należące do jednej grupy eksperymentalnej wykazują zbliżone rozkłady ekspresji, co potwierdza ich wewnętrzną jednorodność (rys. S1, materiały suplementarne). Rozkład logarytmicznej liczby odczytów dla poszczególnych próbek wskazuje na wysoką jakość i spójność uzyskanych danych. Obserwowane różnice pomiędzy grupą NSC zdrowych a NSC HD odzwierciedlają rzeczywiste zmiany biologiczne. Taki wynik wspiera wiarygodność dalszych analiz ekspresji genów.

Kolejno przeprowadzono różnicową analizę ekspresji genów, porównując zmiany transkryptomyczne pomiędzy następującymi grupami:

- NSC HD po 7 dniach od transdukcji amiR136-13A w odniesieniu do kontroli negatywnej (amiR136-LUC),
- NSC HD traktowanymi amiR136-LUC względem komórek HD nietraktowanych,
- NSC HD traktowanych amiR136-13A względem komórek zdrowych (izogeniczna linia IC39/WT).

Porównanie NSC HD transdukowanych amiR136-13A do amiR136-LUC wykazało niewielkie zmiany w profilu ekspresji genów (rys. 22A). Statystycznie istotne zmiany odnotowano dla 122 genów, z czego poziomy ekspresji 102 genów uległy obniżeniu, a 20 – podwyższeniu. Poziom ekspresji *HTT* nie uległ statystycznie istotnym zmianom. Na szczególną uwagę zasługuje gen *SRP14* (*signal recognition particle 14*), którego ekspresja została istotnie obniżona po transdukcji amiR136-13A. Gen ten wykazuje częściową komplementarność do sekwencji nici wiodącej 13A – zawiera dwa niesparowania i osiem powtórzeń CAG, co może wskazywać na potencjalny efekt off-target wymagający dalszej weryfikacji (146). *SRP14* koduje białko uczestniczące w kotranslacyjnym kierowaniu białek do retikulum endoplazmatycznego. Warto jednak podkreślić, że zmiana jego ekspresji była umiarkowana ( $\log_2FC = -0,5229$ ). Analiza ontologii genów (ang. *Gene Ontology*) ujawniła, iż deregulowane geny związane są głównie z procesami przebudowy i organizacji chromatyny (rys. 22B). Brak zmian w ekspresji kluczowych genów związanych z apoptozą, odpowiedzią zapalną czy stresem komórkowym sugeruje, że zastosowanie amiR136-13A nie powoduje aktywacji niepożądanych szlaków i potwierdza korzystny profil bezpieczeństwa tej cząsteczki w NSC.



**A****amiR136-13A vs amiR136-LUC****B**

**Rysunek 22.** Różnicowa analiza ekspresji genów pomiędzy NSC HD transdukowanych lentiwirusami niosącymi amiR136-13A a NSC HD transdukowanych lentiwirusami niosącymi amiR136-LUC.

(A) Wykres *volcano plot*. Oś X przedstawia logarytm przy podstawie 2 ze zmiany ekspresji genu ( $\log_2FC$ ), natomiast oś Y – ujemny logarytm dziesiętny ze skorygowanej wartości  $p$  ( $-\log_{10}(p_{adj})$ ). Kolorem czerwonym oznaczono statystycznie istotne zmienione geny ( $p < 0,05$ ) (tab. S1, materiały suplementarne).

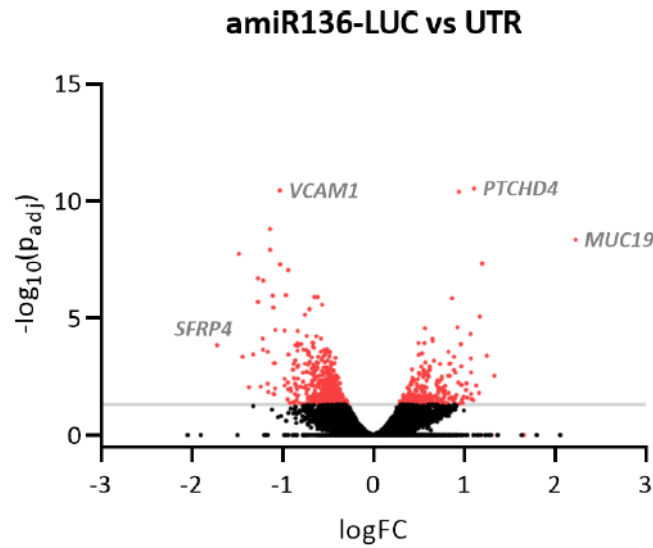
(B) Wykres bąbelkowy prezentujący ontologię deregulowanych genów.

Liczba analizowanych prób w każdej grupie wynosiła 3.

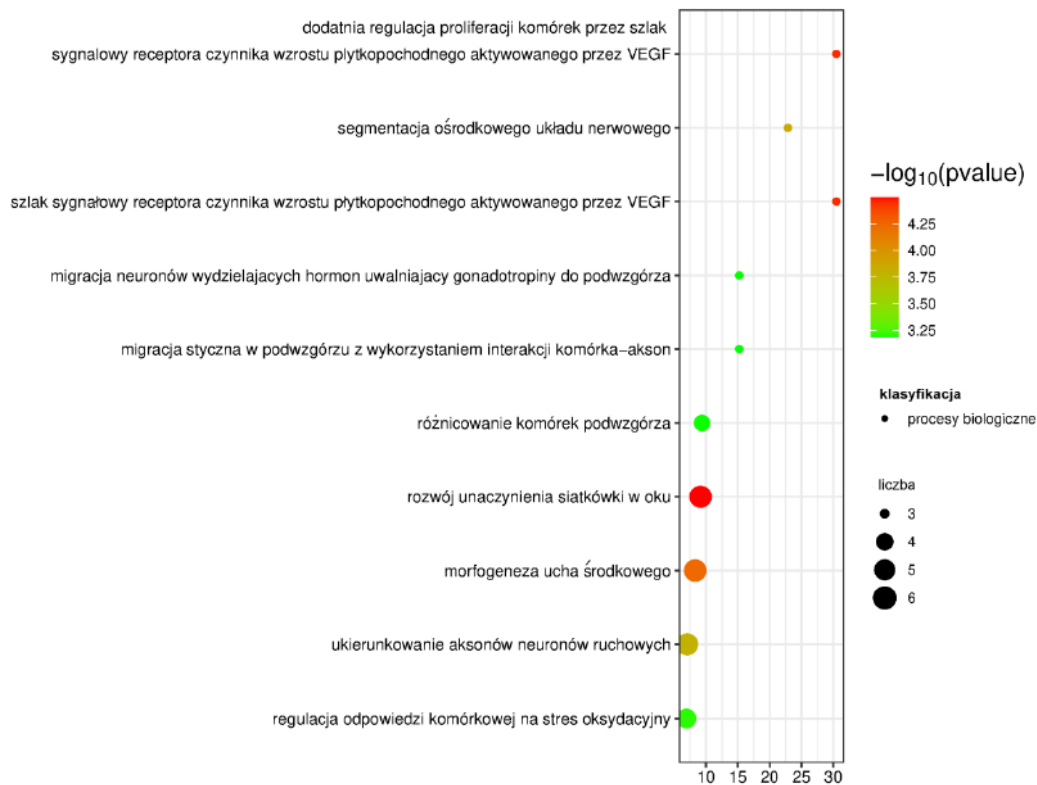


Aby przeanalizować wpływ transdukcji lentiwirusowej na ekspresję genów, przeprowadzono analizę różnicowej ekspresji genów pomiędzy NSC HD transdukowanymi cząsteczkami lentiwirusowymi niosącym amiR136-LUC, a NSC HD nietraktowanymi. Porównanie to ujawniło znaczące zmiany transkryptomiczne, obejmujące 810 genów o istotnie zmienionej ekspresji (rys. 23A). Analiza funkcjonalna wskazała że deregulowane geny są zaangażowane w liczne procesy biologiczne, takie jak neurogeneza, angiogeneza, ścieżka sygnałowa VEGF, a także z procesy rozwojowe (rys. 23B). Uzyskane dane pokazują, że sam proces transdukcji lentiwirusowej może prowadzić do istotnych zmian transkryptomicznych, zwłaszcza w komórkach tak wrażliwych jak NSC.

**A**



**B**



**Rysunek 23.** Różnicowa analiza ekspresji genów pomiędzy NSC HD transdukowanymi lentiwirusami niosącymi amiR136-LUC a NSC HD nietraktowanymi (ang. *untreated*, UTR).

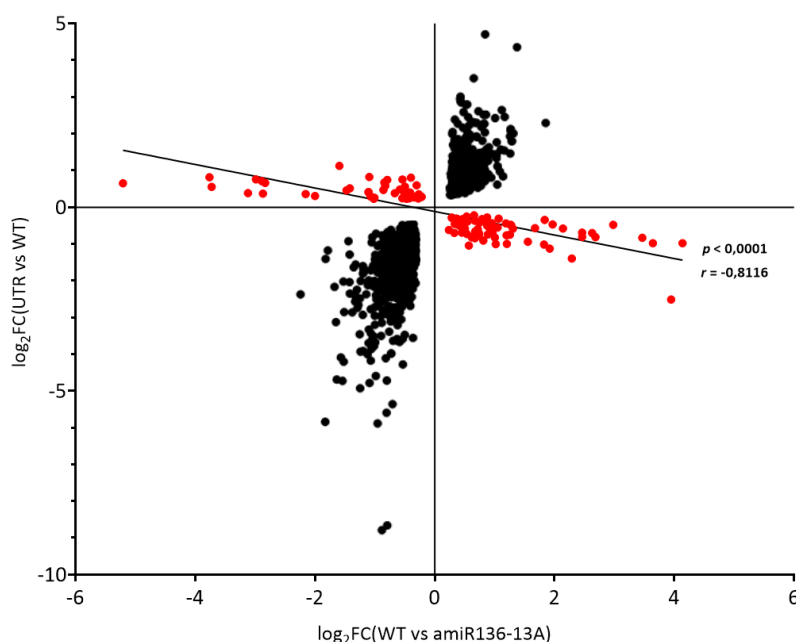
(A) Wykres *volcano plot*. Oś X przedstawia logarytm przy podstawie 2 ze zmiany ekspresji genu (logFC), natomiast oś Y – ujemny logarytm dziesiętny ze skorygowanej wartości  $p$  ( $-\log_{10}(p_{adj})$ ). Kolorem czerwonym oznaczono statystycznie istotne zmienione geny ( $p < 0,05$ ).

(B) Wykres bąbelkowy prezentujący ontologię deregulowanych genów.

Liczba analizowanych prób w każdej grupie wynosiła 3.

Aby ocenić potencjalny efekt przywracania prawidłowego profilu ekspresji genów po zastosowaniu amiR136-13A, porównano wspólną pulę genów istotnie zmienionych zarówno w porównaniu NSC HD UTR vs WT NSC (komórki zdrowe), jak i NSC HD traktowanych amiR136-13A vs WT NSC.

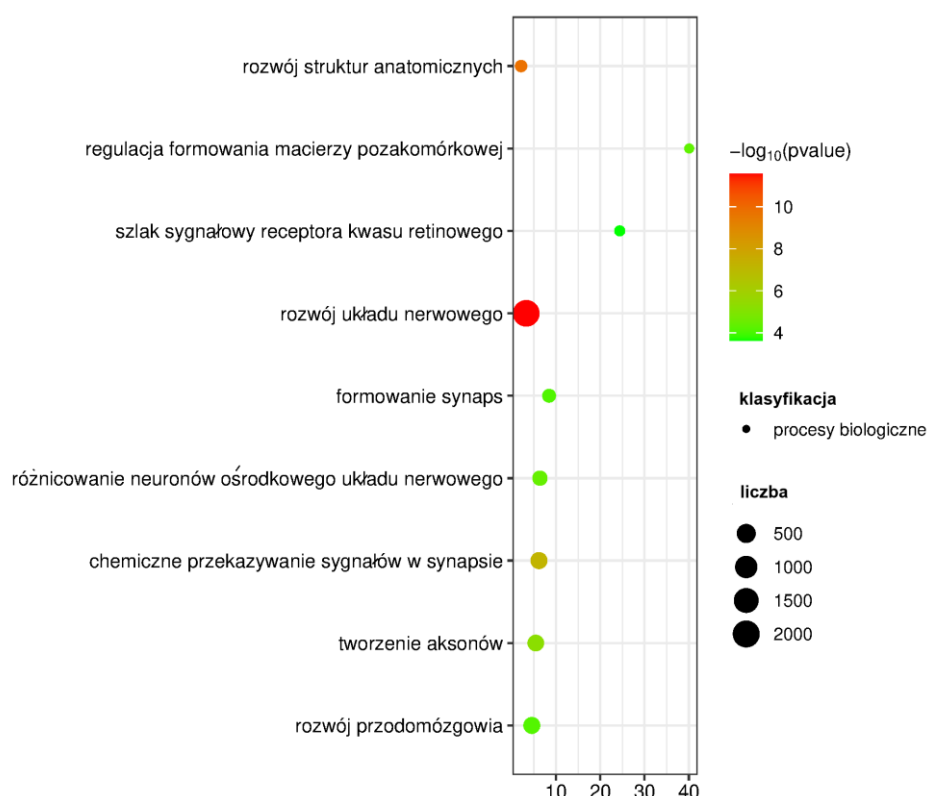
Zaobserwowano silną, istotną statystycznie odwrotną korelację ( $r = -0,8116$ ;  $p < 0,0001$ ), co wskazuje, że wprowadzenie do NSC HD cząsteczki amiR136-13A skutkowało częściowym „odwróceniem” profilu deregulacji 111 genów w kierunku poziomów ekspresji typowych dla komórek zdrowych (rys. 24). Zjawisko to może wynikać z obniżenia poziomu mHTT przez amiR136-13A, co prowadzi do pośredniego wpływu na ekspresję innych genów deregulowanych w wyniku obecności nieprawidłowej HTT.



**Rysunek 24.** Różnicowa analiza ekspresji genów. Oś X przedstawia logarytm przy podstawie 2 ze zmiany ekspresji genów ( $\log_2FC$ ) istotnie zmienionych ( $p < 0,05$ ) w NSC traktowanych amiR136-13A w porównaniu do NSC WT. Oś Y przedstawia  $\log_2FC$  dla tych samych genów w nietraktowanych NSC HD względem NSC WT. Każda kropka reprezentuje jeden wspólny gen istotnie zmieniony w obu porównaniach. Kolorem czerwonym oznaczono geny wykazujące kierunek zmiany przeciwny w obu porównaniach – czyli takie, dla których zastosowanie amiR136-13A prowadziło do ekspresji bardziej zbliżonej do poziomu obserwowanego w zdrowych komórkach WT. Ukośna linia obrazuje korelację Pearsona pomiędzy zmianami ekspresji:  $r = -0,8116$ ,  $p < 0,0001$ . Liczba analizowanych prób w każdej grupie wynosiła 3.

Co ciekawe, analiza ontologii genów, których ekspresja uległa przywróceniu po zastosowaniu amiR136-13A w kierunku poziomów obserwowanych w komórkach zdrowych, wykazała istotne wzbogacenie procesów biologicznych związanych z rozwojem układu

nerwowego. W szczególności, znacząco reprezentowane były procesy takie jak rozwój struktur anatomicznych układu nerwowego, formowanie synaps, różnicowanie neuronów, tworzenie aksonów, a także chemiczne przekazywanie sygnałów synaptycznych. Wyniki te sugerują, że obniżenie poziomu mHTT może skutkować przywróceniem prawidłowej aktywności genów związanych z neurogenezą i funkcjonowaniem synaps, co wskazuje na możliwość odwrócenia niektórych efektów patologicznych wywołanych przez mHTT (rys. 25).

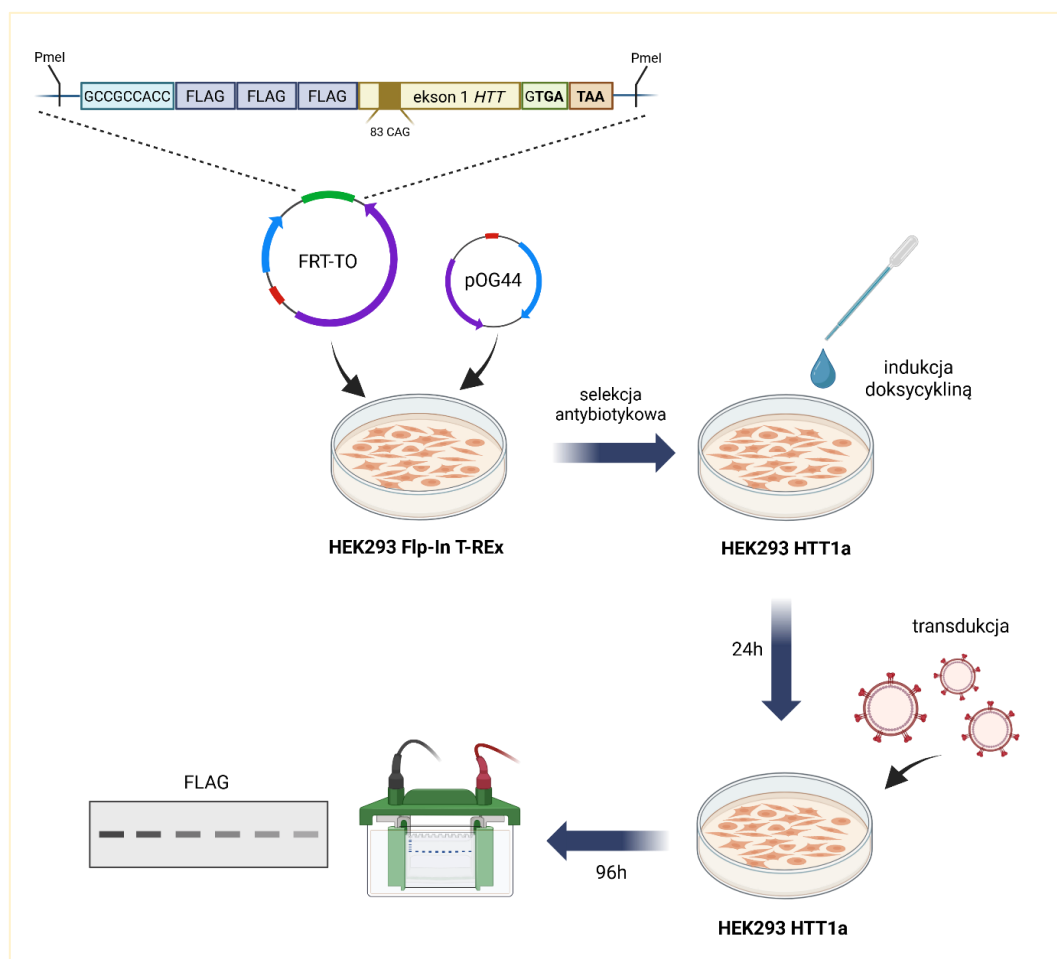


**Rysunek 25.** Wykres bąbelkowy prezentujący ontologię deregulowanych genów, których ekspresja po zastosowaniu amiR136-13A zbliżyła się do poziomów w NSC WT.

## 5. Ocena efektywności amiRNA w obniżeniu poziomu toksycznego białka HTT1a

Ważnym etapem badań było określenie efektywności redukcji poziomu krótkiej formy HTT – HTT1a, która powstaje na skutek alternatywnej poliadenylacji transkryptu *HTT*. Liczne badania wskazują, że HTT1a wykazuje szczególnie wysoką tendencję do tworzenia agregatów w komórkach nerwowych, co przekłada się na jej wysoce toksyczny charakter. Z tego względu skuteczna redukcja poziomu HTT1a uznawana jest za jeden z istotnych celów strategii terapeutycznych (33, 34).

Ze względu na trudności w detekcji endogennej formy HTT1a przy użyciu klasycznych przeciwciał w modelach komórkowych HD, zdecydowano o zastosowaniu uproszczonego systemu ekspresyjnego. W tym celu, eksperyment przeprowadzono z wykorzystaniem linii HEK293 Flp-In T-REx z indukowalną ekspresją HTT1a oznakowanego potrójnym epitopem FLAG w celu ułatwienia detekcji. Po indukcji ekspresji doksycykliną, komórki poddano transdukcji lentiwirusowej wektorem ekspresyjnym amiR136-13A, a następnie przeprowadzono analizę poziomu białka (rys. 26).

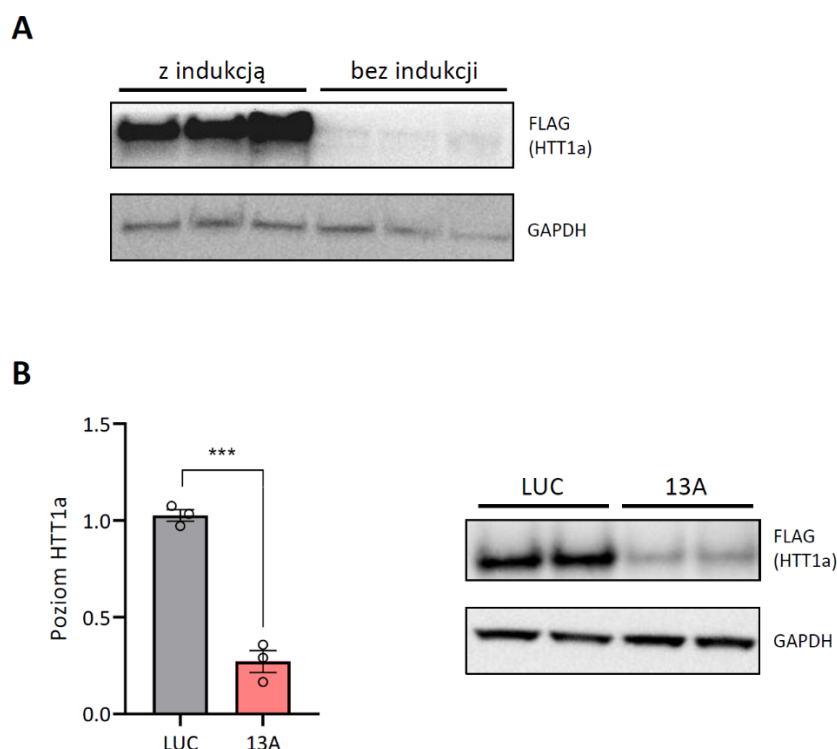


**Rysunek 26.** Schemat eksperymentu.

Przed wykonaniem transdukcji, sprawdzono skuteczność indukcji ekspresji krótkiej formy *HTT* (rys. 27A). Wykazano, iż dodanie doksycykliny skutkuje ekspresją transgenu i powstaniem HTT1a.

Wyniki eksperymentu wykazały istotne statystycznie obniżenie poziomu HTT1a o około 75% ( $p < 0,001$ , \*\*\*) po zastosowaniu cząsteczki amiR136-13A (rys. 27B). Uzyskany

rezultat potwierdza, że cząsteczka ta jest skuteczna również wobec skróconej, patologicznej formy białka HTT, co dodatkowo potwierdza jej terapeutyczny potencjał.



**Rysunek 27.** Analiza poziomu HTT1a w indukowanym systemie HEK293 Flp-In T-REx.

Komórki indukowano doksycykliną w celu nadekspresji krótkiej formy *HTT* z 83 powtórzeniami CAG w genie, a następnie transdukowano wirionami zawierającymi sekwencję amiR136-13A oraz kontrolę negatywną amiR136-LUC, przy MOI = 10. Po 4 dniach przeprowadzono analizę metodą Western blotting z wykorzystaniem przeciwciała anty-FLAG.

(A) Reprezentacyjny wynik analizy Western blotting potwierdzający indukowalną ekspresję transgenu *HTT1a*.

(B) Ocena efektywności amiRNA w obniżeniu poziomu toksycznego białka HTT1a. Słupki na wykresie przedstawiają średnie poziomy białka  $\pm$  SEM obliczone na podstawie trzech powtórzeń biologicznych oraz przynajmniej trzech powtórzeń technicznych. Poziom HTT1a znormalizowano względem poziomu białka referencyjnego – GAPDH. Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem testu t-Studenta. Wartość  $p$  oznaczono za pomocą gwiazdek:  $p < 0,001$  – \*\*\*.

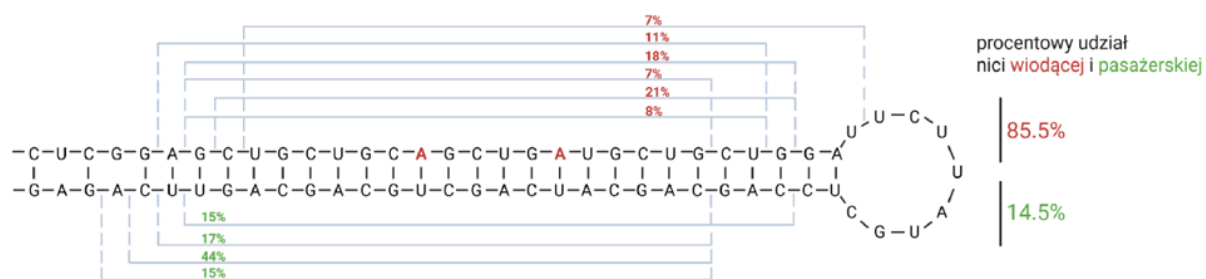
## 6. Analiza obróbki komórkowej amiR136-13A w modelu komórkowym

Niezwykle istotnym etapem oceny bezpieczeństwa amiR136-13A było określenie jej obróbki komórkowej przez maszynę RNAi. W tym celu przeprowadzono analizę NGS na materiale pochodzącym z komórek HEK293T traktowanych cząsteczką amiR136-13A.

## 6.1. Analiza uwalnianych wariantów 13A

Pierwszym etapem analizy było określenie procentowego udziału uwalnianych wariantów nici wiodących i pasażerskich z formy prekursorowej amiR136-13A (rys. 28). Odnotowano wyraźną przewagę udziału nici wiodącej (85,5%) względem nici pasażerskiej (14,5%). Wynik ten świadczy o niskim prawdopodobieństwie wystąpienia efektów niespecyficznych wynikających z inkorporacji do Ago nici pasażerskiej. Zaobserwowano także, że cięcie przez Drosha nie zachodzi w jednym, ściśle określonym miejscu, lecz prowadzi do powstania heterogennej puli wariantów z różnym końcem 5'. Wariantem o największej częstotliwości uwalniania (21% całej puli) okazała się forma 21-nukleotydowa (CUGCUGCAGCUGAUGCUGCUG), dla której niesparowania do ciągów CAG znajdują się w pozycji 8 i 13, tak jak zakładano przy projektowaniu. Innym wariantem o podobnym procentowym udziale (18%) była sekwencja 22-nukleotydowa (GCUGCUGCAGCUGAUGCUGCUG), w której niesparowania do ciągów CAG znajdują się w pozycji 9 i 14. Zmianie uległa także w tym przypadku sekwencja regionu źródłowego. Sumarycznie, procentowy udział wariantów nici wiodącej z niesparowaniami w pozycji 9 i 14, o końcu 5' rozpoczynającym się w tym samym miejscu wynosiła 35,2%, natomiast dla nici wiodącej o niesparowaniach w pozycji 8 i 13 – 29,8%.

Z punktu widzenia projektowania cząsteczek terapeutycznych, homogenność końca 5' jest istotna, ponieważ to właśnie znajdujący się w tym miejscu region źródłowy decyduje o rozpoznawaniu docelowego mRNA i efektywności działania kompleksu RISC (147). Stabilny i jednolity profil obróbki może przekładać się na większą przewidywalność działania cząsteczki.



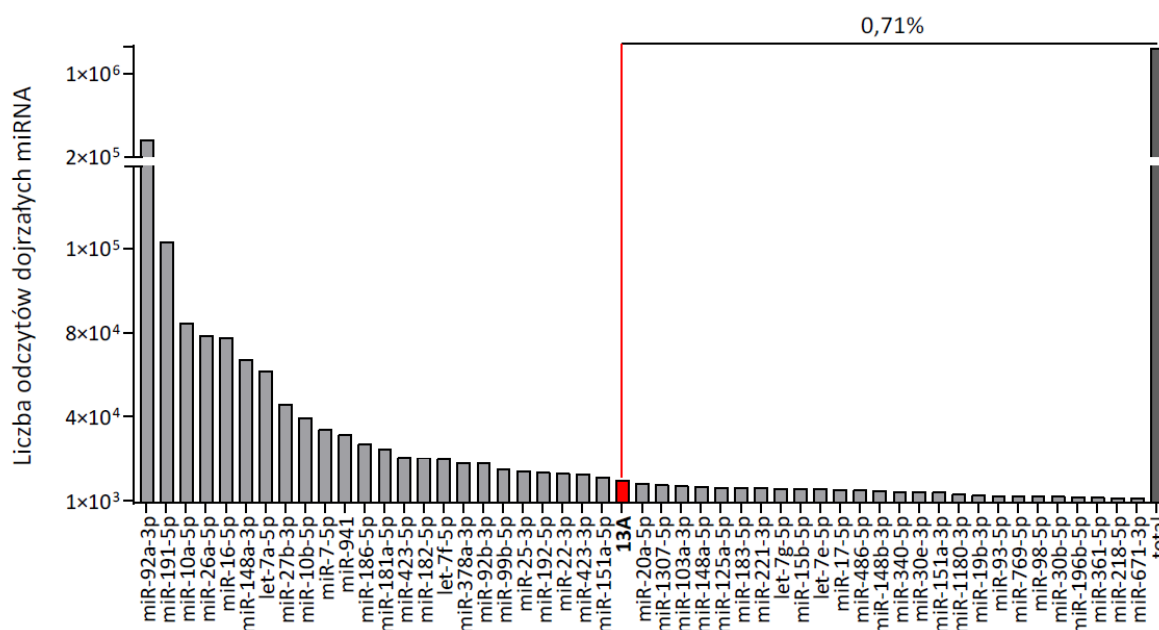
**Rysunek 28.** Warianty najczęściej uwalnianych nici wiodących oraz pasażerskich 13A w komórkach HEK293T.

## 6.2. Określenie poziomu ekspresji 13A w porównaniu do endogennych miRNA

Kolejnym etapem analizy było porównanie poziomu ekspresji dojrzałej formy amiR136-13A do ekspresji endogennych miRNA. Celem było określenie, czy wprowadzenie amiRNA mogło prowadzić do zaburzenia funkcjonowania endogennego szlaku RNAi, w tym do potencjalnego wysycenia jego elementów, takich jak białka kompleksu RISC.

Analiza ekspresji 50 endogennych miRNA o najwyższej liczbie odczytów w modelu HEK293T wykazała, że udział dojrzałej formy cząsteczki 13A w całkowitej puli miRNA był znikomy i wynosił zaledwie 0,71% (rys. 29). Tak niski poziom ekspresji 13A w stosunku do całościowej puli miRNA sugeruje, że cząsteczka nie konkuruje z endogennymi miRNA o białka szlaku RNAi i nie ma negatywnego wpływu na ich poziom ekspresji.

Podsumowując, przeprowadzone analizy wykazały, że cząsteczka amiR136-13A charakteryzuje się zarówno korzystnym stosunkiem uwalniania nici wiodącej do pasażerskiej, jak i niskim ryzykiem wysycenia endogennego szlaku RNAi. Tym samym, uzyskane wyniki stanowią silny argument potwierdzający bezpieczeństwo cząsteczki amiR136-13A.



**Rysunek 29.** Liczba odczytów dla 50 miRNA o najwyższej ekspresji w komórkach HEK293T po transfekcji komórek plazmidem ekspresyjnym amiR136-13A. Uwzględniono sumaryczną ilość odczytów dla wszystkich wariantów nici wiodącej.



## 7. Analiza efektywności i bezpieczeństwa amiRNA *in vivo*

Kluczowym etapem analizy bezpieczeństwa i efektywności cząsteczki amiR136-13A była walidacja w modelu zwierzęcym HD. W tym celu wykorzystano transgeniczne myszy YAC128 (125/7Q). Eksperyment zaplanowano w dwóch etapach – krótkoterminowym, mającym na celu ustalenie optymalnej dawki oraz wstępną ocenę efektywności cząsteczki, oraz długoterminowym, ukierunkowanym na określenie długofalowego efektu oraz bezpieczeństwa zastosowania amiRNA. Taka strategia stanowi istotny etap weryfikacji skuteczności i bezpieczeństwa kandydata terapeutycznego przed jego ewentualnym zastosowaniem w przyszłych badaniach klinicznych.

### 7.1. Ocena efektywności amiR136-13A w eksperymencie krótkoterminowym

Myszy YAC128 podzielono na trzy grupy (po 4 osobniki): otrzymujące niską ( $2 \times 10^{11}$  vg) albo wysoką dawkę ( $4 \times 10^{11}$  vg) wektora AAV5 niosącego amiR136-13A, a także grupę kontrolną otrzymującą pusty wektor (ang. *empty*) w ilości odpowiadającej dawce niskiej. Iniekcje stereotaktyczne przeprowadzono w 14 tygodniu życia myszy, bilateralnie do prążkowie. Po upływie 11 tygodni od podania wektorów, zwierzęta uśmiercono, a następnie pobrano mózgi, z których wydzielono trzy regiony: prążkowie, korę mózgową oraz hipokamp. Z każdej z tych struktur izolowano białka, które następnie poddawano analizie Western blotting. Do detekcji wykorzystano dwa przeciwciała: anti-HTT oraz anti-poliQ.

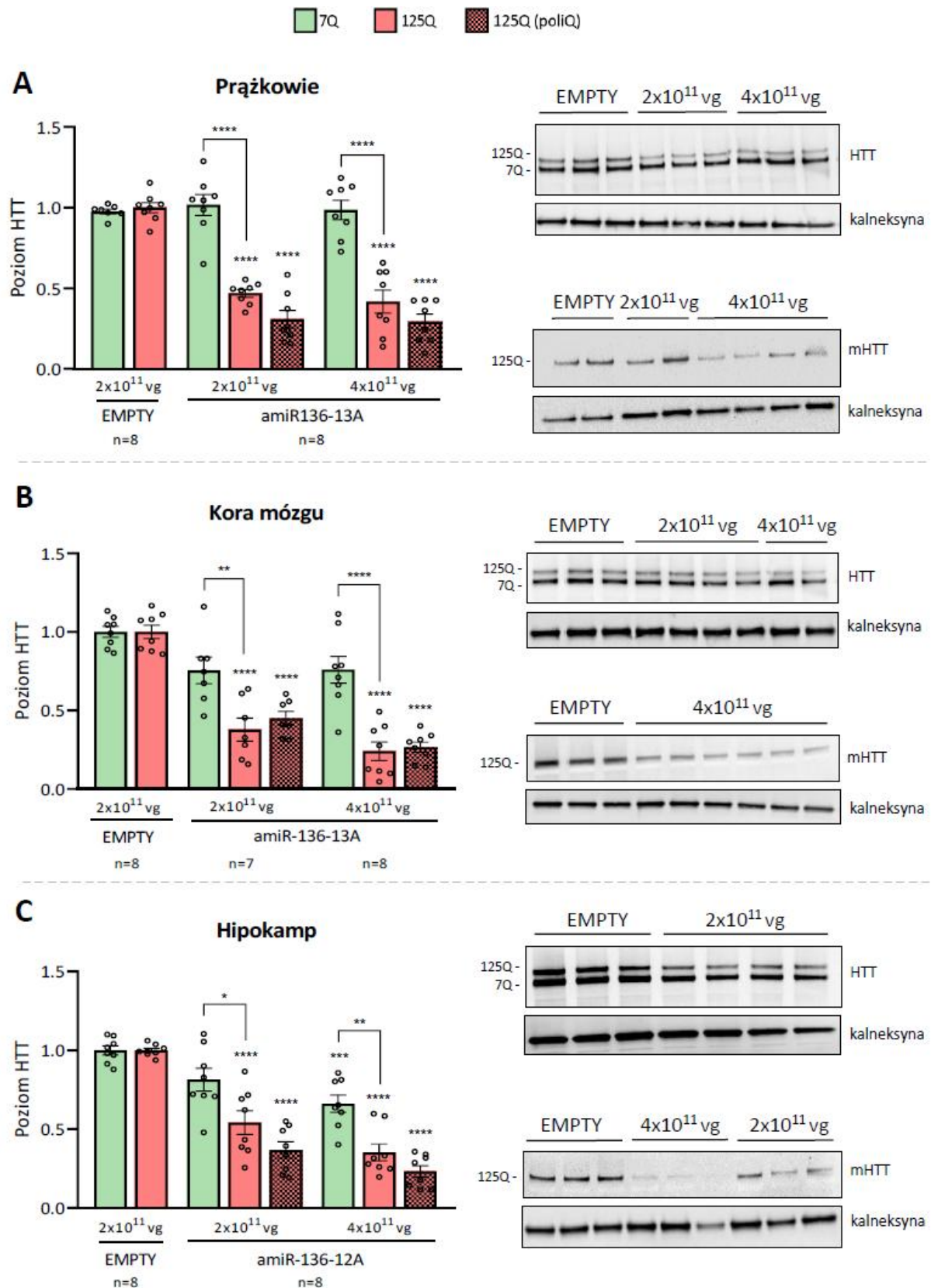
W prążkowie – strukturze najbardziej dotkniętej chorobowo, a jednocześnie miejscu bezpośredniego podania wektora – zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie poziomu mHTT o około 70% ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*), potwierdzone przy użyciu obu przeciwciał (rys. 30A). Co ciekawe, efekt ten był zbliżony dla obu zastosowanych dawek – niskiej oraz wysokiej. W przypadku białka mysiego, będącego w tym eksperymencie odpowiednikiem wariantu prawidłowego HTT, nie odnotowano redukcji jego poziomu, co wskazuje na wysoką allelo-selektywność działania amiR136-13A w prążkowie.

W korze mózgowej odnotowano 75% obniżenie poziomu mHTT po podaniu wyższej dawki oraz ~60% w przypadku dawki niskiej (rys. 30B). Oba wyniki były istotne statystycznie ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Należy jednak zaznaczyć, iż w przypadku grupy traktowanej niską dawką analizowano 7 pólkuł, zamiast 8. W obu grupach nie odnotowano istotnej zmiany poziomu białka prawidłowego, co wskazuje na zachowanie allelo-selektywności w tej części mózgu.

W hipokampie, podobnie jak w korze, odnotowano wyraźniejsze obniżenie poziomu mHTT przy zastosowaniu wysokiej dawki (~70%,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*), w porównaniu do grupy traktowanej niższą dawką (~55%,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*) (rys. 30C). Zaobserwowano także istotną statystycznie redukcję poziomu białka normalnego w przypadku dawki wysokiej (34%,  $p < 0,001$ , \*\*\*), co wskazuje na częściową utratę selektywności w tym obszarze mózgu przy zastosowaniu tej dawki.

Uzyskane wyniki potwierdzają wysoką efektywność amiR136-13A w redukcji poziomu mHTT w analizowanym modelu *in vivo*, zarówno w strukturze docelowej, jaką jest prążkowie, jak i w korze mózgu oraz hipokampie. Zaobserwowano wyraźną preferencję cząsteczki względem allelu zmutowanego, co jest niewątpliwą zaletą i spełnia założenie jednego z celów, jakim było zachowanie allelo-selektywności.

Ze względu na wysokie wyciszenie ekspresji *mHTT* we wszystkich trzech analizowanych strukturach, zdecydowano o redukcji dawki o połowę w eksperymencie długoterminowym.



**Rysunek 30.** Analiza poziomu HTT w (A) prążkowie, (B) korze mózgu i (C) hipokampie myszy w eksperymencie krótkoterminowym.

Analizę Western blotting wykonano na materiale pobranym 11 tygodni po iniekcji myszy YAC128 wektorem AAV5 z cząsteczką amiR136-13A w dwóch dawkach oraz kontrolą negatywną (*empty*). Słupki na wykresie przedstawiają średnie poziomy białka  $\pm$  SEM obliczone na podstawie siedmiu albo

ośmiu powtórzeń biologicznych oraz przynajmniej trzech powtórzeń technicznych. Kolorem czerwonym oznaczono poziom białka zmutowanego, a kolorem zielonym – normalnego. Poziom HTT znormalizowano względem poziomu białka referencyjnego – kalneksyny. Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem jednokierunkowej ANOVA z zastosowaniem korekty Tukeya. Wartości  $p$  oznaczono za pomocą gwiazdek:  $p < 0,05$  – \*;  $p < 0,01$  – \*\*;  $p < 0,001$  – \*\*\*;  $p < 0,0001$  – \*\*\*\*. ns – wynik nieistotny statystycznie, n – liczba półkul mózgu.

## 7.2. Ocena efektywności amiR136-13A w eksperymencie długoterminowym

Do tego eksperymentu wykorzystano ten sam model myszy, a zwierzęta podzielono na trzy grupy (po 4 osobniki): otrzymujące niską ( $1 \times 10^{11}$  vg) albo wysoką dawkę ( $2 \times 10^{11}$  vg) wektora AAV5 kodującego amiR136-13A, a także grupę kontrolną otrzymującą pusty wektor (ang. *empty*) w ilości odpowiadającej dawce niskiej. Iniekcje przeprowadzono w 10 tygodniu życia myszy, bilateralnie do prążkowania. Po upływie 28 tygodni od podania wektorów zwierzęta uśmiercono, a następnie pobrano mózgi, których poszczególne części przeznaczono do analizy poziomu HTT, tak jak w eksperymencie krótkoterminowym.

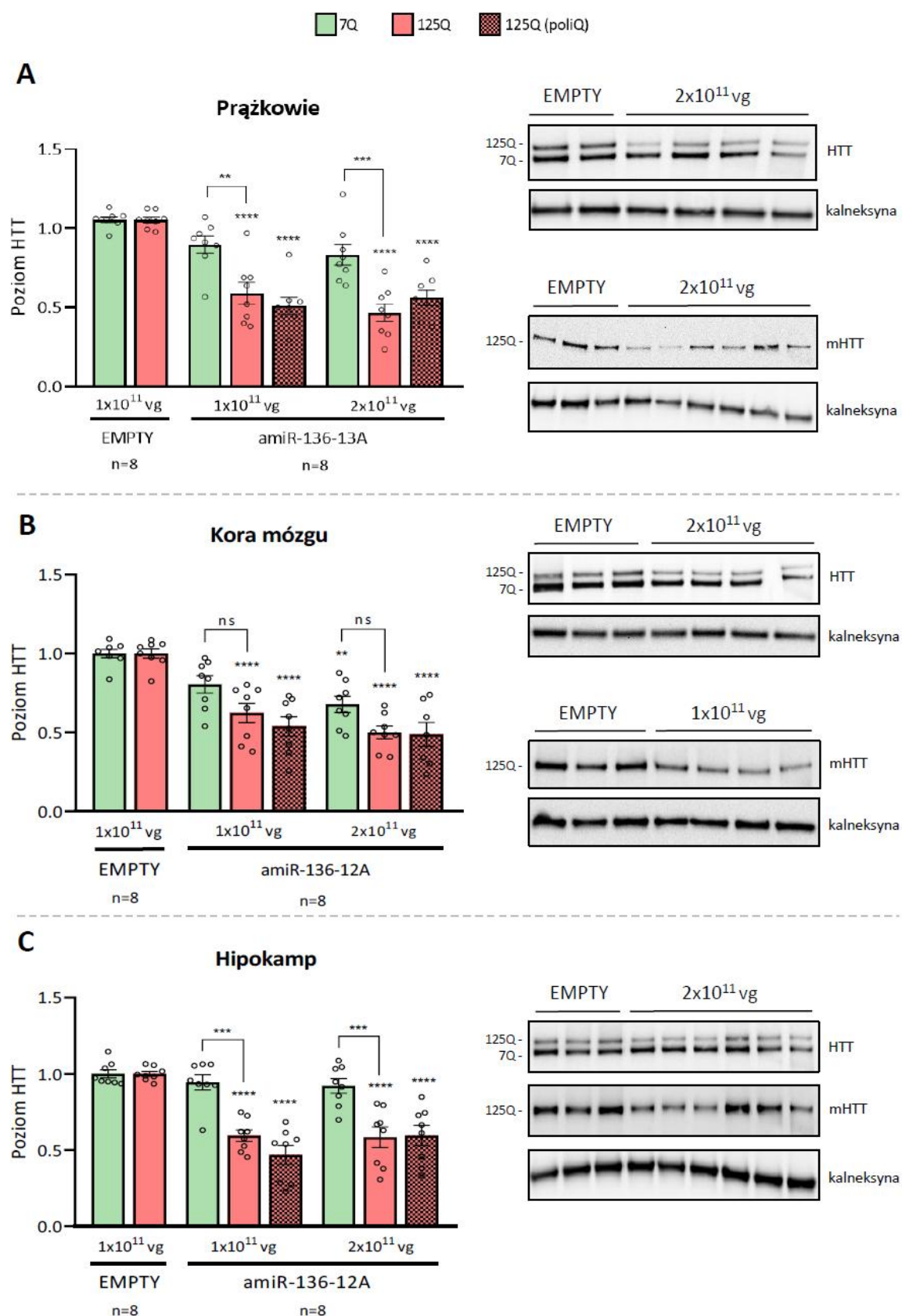
W wyniku tego eksperymentu, w prążkowie zaobserwowano statystycznie istotne, ~50% ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*) obniżenie poziomu mHTT po zastosowaniu obu dawek wektora wirusowego, potwierdzone przy użyciu dwóch przeciwciał (rys. 31A). Nie odnotowano istotnej redukcji poziomu białka prawidłowego. Choć poziom wyciszenia *mHTT* w tej strukturze był niższy niż w eksperymencie krótkoterminowym, uzyskany efekt nadal można uznać za wystarczający z perspektywy terapeutycznej.

W korze mózgowej osiągnięto redukcję mHTT na podobnym poziomie (~50%,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*) dla obu zastosowanych dawek (rys. 31B). W tym wypadku zaobserwowano niewielkie, lecz istotne statystycznie obniżenie poziomu białka prawidłowego w grupie z wyższą dawką (32%,  $p < 0,01$ , \*\*), co sugeruje niewielki spadek allelo-selektywności cząsteczki w tej strukturze mózgu.

W hipokampie poziom redukcji zmutowanego białka był porównywalny do dwóch pozostałych struktur i wyniósł około 50% ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*) (rys. 31C). W tym regionie mózgu nie zaobserwowano obniżenia poziomu prawidłowej HTT.

Podsumowując, cząsteczka amiR136-13A wykazała trwałą i wysoką skuteczność w preferencyjnym obniżaniu poziomu zmutowanego białka HTT we wszystkich analizowanych strukturach mózgu, nawet przy zastosowaniu zredukowanej dawki terapeutycznej. Efekt ten utrzymywał się co najmniej do 28 tygodnia od iniekcji. Wyniki te

potwierdzają potencjał terapeutyczny amiR136-13A oraz wspierają jej dalszą ocenę pod kątem bezpieczeństwa.



**Rysunek 31.** Analiza poziomu HTT w (A) prążkowie, (B) korze mózgu oraz (C) hipokampie myszy w eksperymencie długoterminowym.

Analizę Western blotting wykonano na materiale pobranym 28 tygodni po iniekcji myszy YAC128 wektorem AAV5 z cząsteczką amiR136-13A w dwóch dawkach oraz kontrolą negatywną (*empty*). Słupki na wykresie przedstawiają średnie poziomy białka  $\pm$  SEM obliczone na podstawie ośmiu

powtórzeń biologicznych oraz przynajmniej trzech powtórzeń technicznych. Kolorem czerwonym oznaczono poziom białka zmutowanego, a kolorem zielonym – normalnego. Poziom HTT znormalizowano względem poziomu białka referencyjnego – kalneksyny. Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem jednokierunkowej ANOVA z zastosowaniem korekty Tukeya. Wartości  $p$  oznaczono za pomocą gwiazdek:  $p < 0,01$  – \*\*;  $p < 0,001$  – \*\*\*;  $p < 0,0001$  – \*\*\*\*. ns – wynik nieistotny statystycznie, n – liczba półkul mózgu.

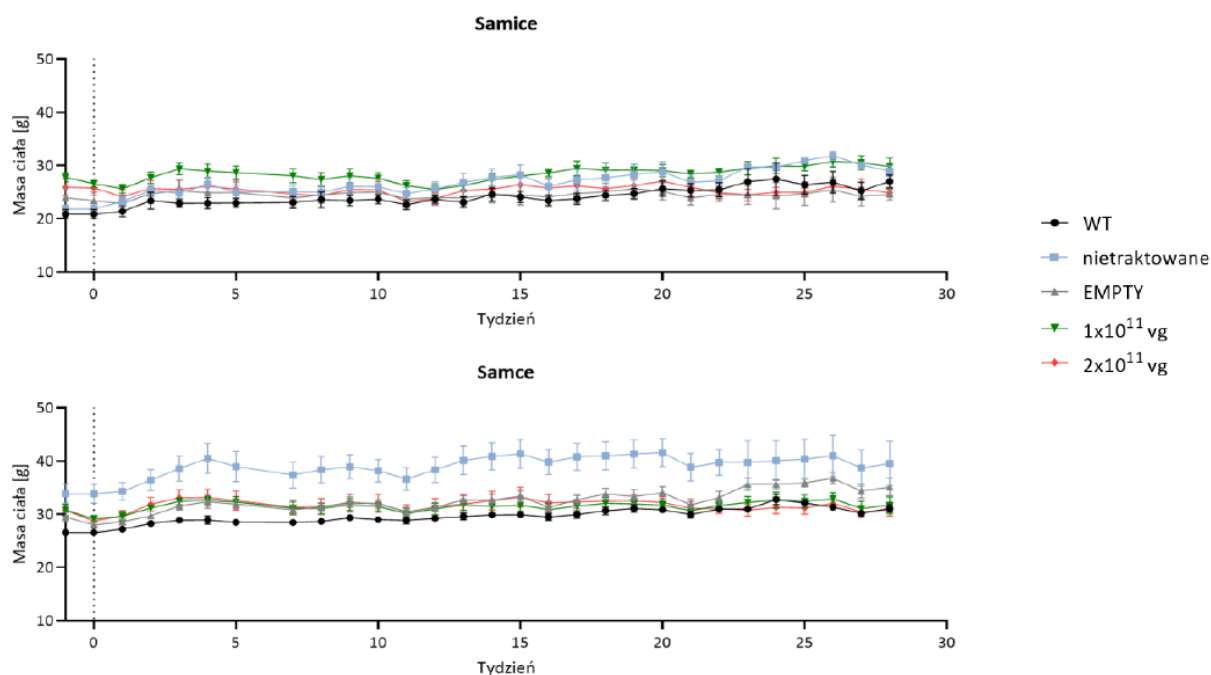
### 7.3. Analiza zmian w przyroście masy ciała

W trakcie trwania eksperymentów zwierzęta regularnie monitorowano pod kątem zmian w przyroście masy ciała. Pomiaru dokonywano raz w tygodniu, obejmując zarówno myszy traktowane wektorem AAV5 z cząsteczką w dwóch dawkach, jak i wektorem pustym, a także zwierzęta zdrowe (WT) oraz nietraktowane YAC128.

Zgodnie z danymi literaturowymi, myszy YAC128 wykazują tendencję do przybierania na wadze w porównaniu do myszy WT (143, 148). Zostało to zaobserwowane i potwierdzone również w niniejszych badaniach na grupie samców, gdzie osobniki YAC128 nietraktowane charakteryzowały się większą masą ciała niż ich odpowiedniki WT (rys. 32). W przypadku grupy samic, zarówno YAC128 jak i WT charakteryzowały się zróżnicowanymi masami ciała, co utrudnia jednoznaczną interpretację wyniku i pozostaje niezgodne z doniesieniami literaturowymi.

Pomimo braku statystycznie istotnych różnic między analizowanymi grupami osobników, zaobserwowano interesujący trend w dynamice przyrostu masy ciała u samców w końcowych tygodniach eksperymentu. Osobniki traktowane niską i wysoką dawką wykazywały stabilność w masie ciała, zbliżoną do tej obserwowanej u myszy zdrowych. Natomiast osobniki z grupy kontrolnej (*empty*) zaczęły pod tym względem przypominać myszy YAC128 nietraktowane, co może sugerować korzystny wpływ terapii na ogólny stan fizjologiczny zwierząt. Ponadto, brak widocznych odchyłań bądź anomalii w dynamice przyrostu masy ciała myszy może świadczyć o dobrej tolerancji amiR136-13A oraz sugeruje brak ogólnoustrojowej toksyczności.

Warto również podkreślić, że stan zwierząt był monitorowany przez cały okres trwania obu eksperymentów, i nie odnotowano żadnych niepokojących zmian w ich zachowaniu, co dodatkowo potwierdza bezpieczeństwo terapii.



**Rysunek 32.** Przyrost masy ciała myszy w eksperymencie długoterminowym.

Pomiaru masy ciała dokonywano raz w tygodniu przez cały czas trwania eksperymentu. Punkty na wykresie przedstawiają średnią wartość masy ciała w danym tygodniu  $\pm$  SEM dla poszczególnych grup. Analiza obejmowała myszy YAC128 traktowane wektorem AAV5 zawierającym amiR136-13A w dwóch dawkach ( $1 \times 10^{11}$  vg oraz  $2 \times 10^{11}$  vg), grupę kontrolną otrzymującą pusty wektor (*empty*), a także grupy odniesienia: osobniki nietraktowane oraz zdrowe (WT). Liczebność każdej grupy (n) wynosiła 4 myszy. Analiza statystyczna przeprowadzona metodą dwukierunkowej ANOVA z zastosowaniem korekty Tukeya nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami.

#### 7.4. Określenie liczby kopii genomów wektora

Celem określenia liczby kopii genomów wektora było sprawdzenie jego dystrybucji w poszczególnych strukturach mózgu, a także analiza zależności między wyciszeniem ekspresji *mHTT* a ilością wektora w tkance. W tym celu z prążkowie, hipokampu i kory mózgu myszy w eksperymencie krótkoterminowym wyizolowano DNA, a następnie na otrzymanym materiale wykonano qPCR z zastosowaniem starterów na promotor CAG, pod którym amiRNA ulegał ekspresji.

Wyniki wskazują na przewidywaną dystrybucję wektora wirusowego w mózgu (rys. 33). Największą liczbę kopii genomu AAV w mikrogramie DNA zaobserwowano w prążkowie (do  $5,21 \times 10^9$  vg/ $\mu$ g) w prawej półkuli myszy nr 2, czyli miejscu iniekcji, co wskazuje na skuteczne i lokalne dostarczenie cząsteczki. Nieco mniejsze ilości odnotowano w hipokampie, natomiast najniższe w korze mózgowej, która znajduje się najdalej od miejsca



podania. Rozkład ilości genomów wektora jest zgodny z przewidywanym rozprzestrzenianiem się wirusa w obrębie mózgu.

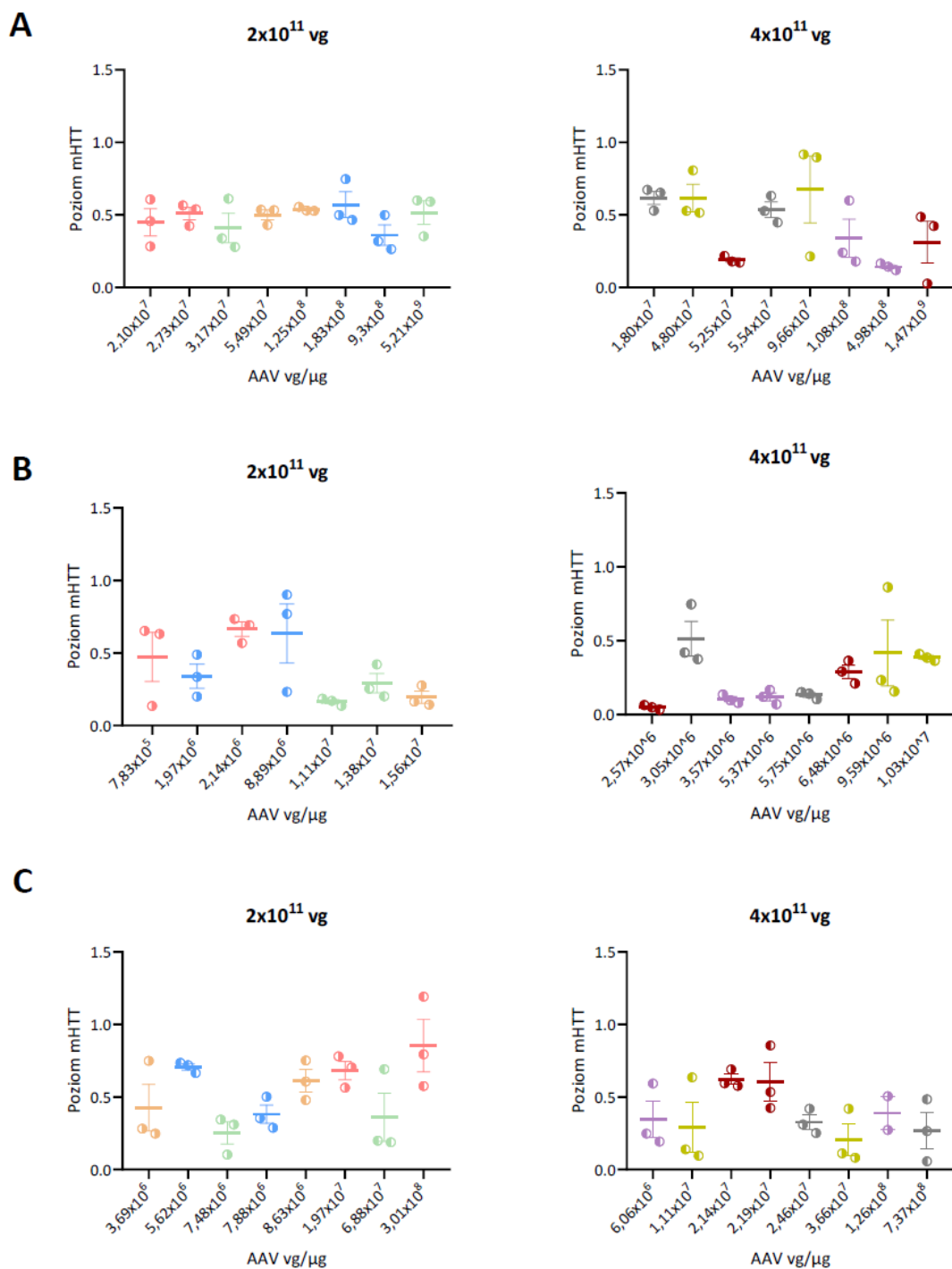
W prążkowie, przy zastosowaniu niskiej dawki, odnotowano ustabilizowane obniżenie poziomu mHTT, niezależne od liczby kopii wektora, co może świadczyć o osiągnięciu progu wysycenia maszynery komórkowej przetwarzającej amiRNA. W przypadku dawki wysokiej zaobserwowano niewielką zależność między poziomem mHTT a liczbą kopii genomów AAV5, ale także większą zmienność między osobnikami, co może sugerować indywidualne różnice w ekspresji wektora.

W korze mózgu, dla dawki niskiej, zaobserwowano umiarkowaną zależność pomiędzy poziomem mHTT a liczbą kopii genomów wektora. W przypadku wyższej dawki, mimo, że poziom mHTT pozostał znacznie obniżony w większości próbek, zależność ta uległa zatarciu.

W hipokampie, w przypadku dawki wysokiej zaobserwowano podobny trend do obserwowanego w prążkowie – większa liczba kopii genomu wiązała się z niższym poziomem mHTT. Natomiast w przypadku dawki niskiej wzorzec ten był odwrotny.

Uzyskane wyniki wskazują na skuteczne dostarczenie cząsteczki amiR136-13A. Zaobserwowane zmienności i brak wyraźnej korelacji między poziomem wyciszenia *mHTT* a liczbą kopii wirusa mogą wynikać z indywidualnych różnic biologicznych między zwierzętami, a także aspektów technicznych związanych z izolacją DNA i białka z różnych fragmentów tkanki.

mysz 1   mysz 2   mysz 3   mysz 4   mysz 5   mysz 6   mysz 7   mysz 8



**Rysunek 33.** Zależność poziomu mHTT od liczby kopii genomu wektora AAV5 w mikrogramie DNA w (A) prążkowie, (B) korze mózgu, oraz (C) hipokampie myszy w eksperymencie krótkoterminowym. Kropki na wykresie przedstawiają średnią wartość z trzech powtórzeń technicznych dla jednej półkuli mózgu będącej jednym powtórzeniem biologicznym (kropki zacienione po stronie prawej – prawa półkula, a po lewej – lewa półkula)  $\pm$  SEM. Poziom ekspresji wektora normalizowano względem poziomu ekspresji mysiej  $\beta$ -aktyny. Analiza obejmowała myszy YAC128 traktowane wektorem AAV5 zawierającym amiR136-13A w dwóch dawkach ( $2 \times 10^{11}$  vg oraz  $4 \times 10^{11}$  vg). Analiza statystyczna nie została przeprowadzona.

## 7.5. Analiza efektów niespecyficznych

Niezwykle istotnym aspektem bezpieczeństwa potencjalnej terapii opartej na RNAi jest ocena efektów niespecyficznych typu off-target, wynikających z pełnej albo częściowej komplementarności cząsteczek do niezamierzonych transkryptów. Zgodnie z wcześniejszą analizą bioinformatyczną si13A nie posiada w pełni komplementarnych sekwencji poza celem w transkryptomie ludzkim i mysim. W związku z tym, przeprowadzono analizę NCBI BLAST dla organizmu *Mus musculus* dla trzech najczęściej uwalnianych wariantów nici wiodącej: CUGCUGCAGCUGAUGCUG (21%), GCUGCUGCAGCUGAUGCUGCUG (18%) oraz AGCUGCUGCAGCUGAUGCUGCU (11%), wyselekcjonowanych na podstawie wyniku opisanego w punkcie 6.1., przy dopuszczeniu 1 niesparowania z sekwencją docelową, analogicznie jak w przypadku analizy opisanej w rozdziale 1.

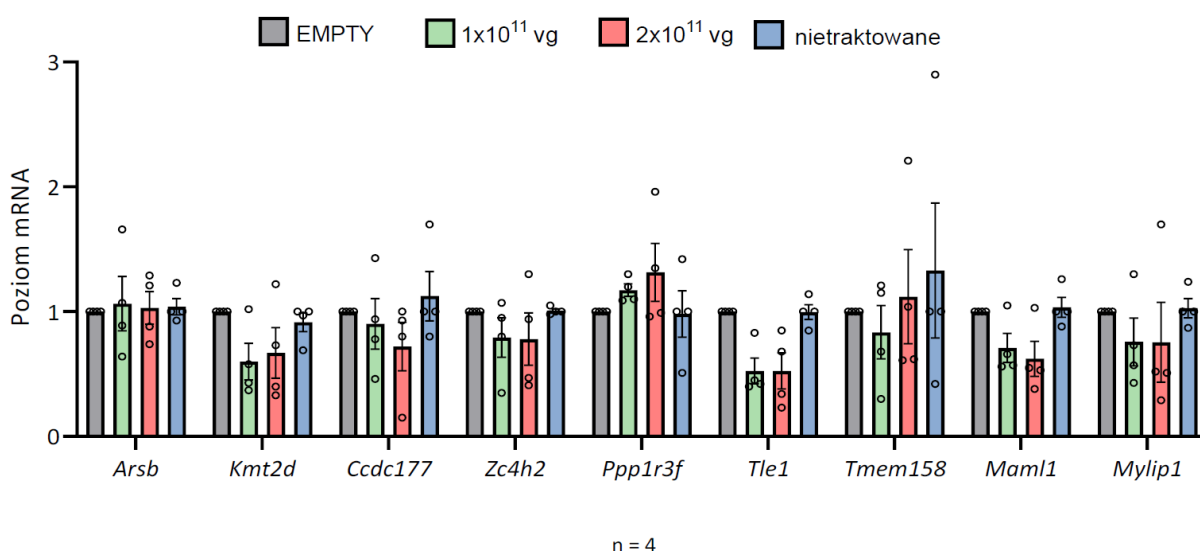
W wyniku analizy zidentyfikowano 9 potencjalnych miejsc wiązania cząsteczki si13A, znajdujących się w sekwencjach kodujących (tab. 26). W celu określenia poziomu ich ekspresji, wyizolowano RNA z prądkowia myszy 28 tygodni od iniekcji wektorem AAV5 niosącym amiR136-13A (dawka niska –  $1 \times 10^{11}$  vg i wysoka –  $2 \times 10^{11}$  vg), wektorem kontrolnym (*empty*), a także od osobników nietraktowanych. Następnie przeprowadzono analizę ekspresji genów metodą RT-qPCR.

**Tabela 26.** Geny zawierające sekwencję z pojedynczym niesparowaniem do przewidywanych uwalnianych wariantów si13A.

| Nazwa genu                                                       | Lokalizacja |
|------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>Arylsulfatase B (Arzb)</i>                                    | CCDS        |
| <i>Histone-lysine N-methyltransferase 2D (Kmt2d)</i>             | CCDS        |
| <i>Coiled-coil domain containing 177 (Ccdc177)</i>               | CCDS        |
| <i>Zinc finger Cys<sub>4</sub>His<sub>2</sub>-type (Zc4h2)</i>   | CCDS        |
| <i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3F (Ppp1r3f)</i>     | CCDS        |
| <i>Transducin-like enhancer of split 1 (Tle1)</i>                | CCDS        |
| <i>Transmembrane protein 158 (Tmem158)</i>                       | CCDS        |
| <i>Mastermind-like protein 1 (Maml1)</i>                         | CCDS        |
| <i>Myosin regulatory light chain interacting protein (Myli1)</i> | CCDS        |

Odnotowano, iż poziom ekspresji analizowanych genów nie uległ istotnym zmianom pomiędzy grupami eksperymentalnymi (rys. 34). Dla niektórych genów (np. *Ppp1r3f*,

*Tmem158*) widać pewien rozrzut wartości, co może wynikać z naturalnej zmienności ekspresji tych genów u różnych osobników, mimo to nie przekłada się to na statystycznie istotne zmiany. Eksperyment ten potwierdza, iż amiR136-13A nie wywołuje efektów niespecyficznych typu off-target w badanym modelu.



**Rysunek 34.** Analiza poziomu mRNA genów off-target z 1 niesparowaniem do nici wiodącej 13A w prążkowi myszy.

Analizie RT-qPCR poddano RNA wyizolowane z prążkowi 28 tygodni po iniekcji. Poziom mRNA znormalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego –  $\beta$ -aktyny. Słupki na wykresie przedstawiają średnie poziomy mRNA  $\pm$  SEM obliczone na podstawie 4 powtórzeń biologicznych (n=4 myszy) i 3 powtórzeń technicznych. Wartości stanowią średnią z lewej i prawej półkuli mózgu. Analiza statystyczna przeprowadzona metodą dwukierunkowej ANOVA z zastosowaniem korekty Tukeya nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy analizowanymi grupami.

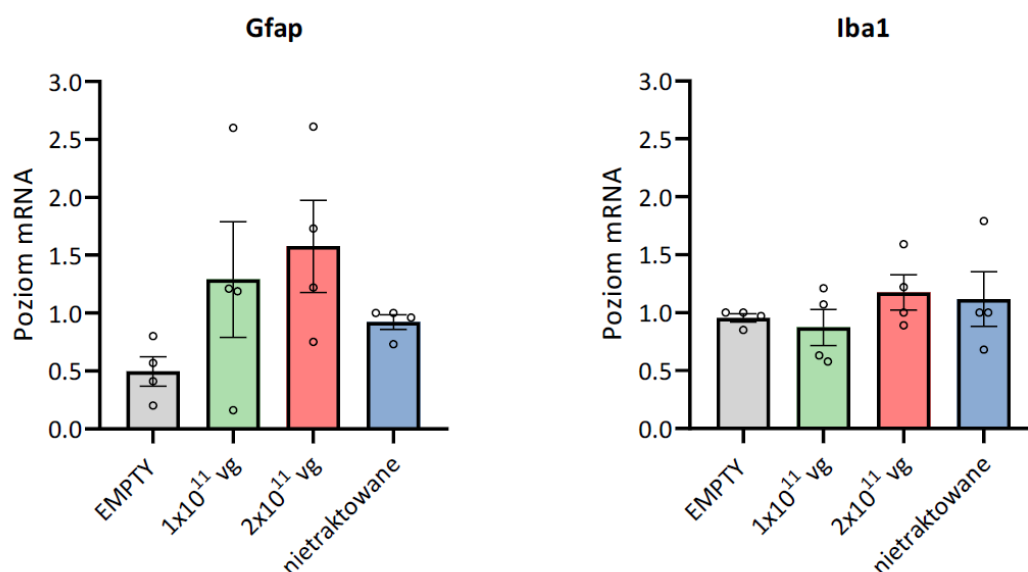
## 7.6. Określenie markerów progresji choroby

Istnieje wiele markerów progresji HD, których podwyższone poziomy są ściśle skorelowane z nasileniem objawów chorobowych i wskazują na toczący się proces neurodegeneracji bądź aktywację odpowiedzi zapalnej w organizmie. Do najczęściej analizowanych w modelach eksperymentalnych jak i badaniach klinicznych należy między innymi kwaśne białko włóknkowe (ang. *glial fibrillary acidic protein*, Gfap) obecne w astrocytach. Wzrost jego poziomu świadczy o aktywacji astrogleju (149). Kolejnym markerem jest białko wiążące wapń (ang. *ionized calcium-binding adapter molecule 1*, Iba1), stanowiący wskaźnik aktywacji mikrogleju, a jego podwyższone poziomy odnotowano m.in.

w prążkowi pacjentów HD (150). Markery te są charakterystyczne dla odpowiedzi zapalnej w OUN. Ponadto, coraz częściej analizuje się także poziom NfL. Białko to jest uznanym markerem degeneracji neuronów – jego stężenie we krwi oraz CSF wzrasta w wyniku uszkodzenia komórek nerwowych, które uwalniają ten komponent cytoszkieletu (149).

W modelu myszy YAC128 podwyższone poziomy wspomnianych markerów są wyraźnie skorelowane z rozwojem objawów neurodegeneracyjnych, takich jak zanik struktur mózgu, utrata neuronów oraz nasilona aktywacja komórek glejowych. Analiza poziomu *Gfap*, *Iba1* i NfL w tym modelu pozwala nie tylko na monitorowanie skuteczności zastosowanej terapii, ale również na ocenę potencjalnych efektów ubocznych związanych z reakcją zapalną albo uszkodzeniem neuronów. W związku z tym, przeprowadzono analizę poziomu tych markerów w materiale pochodzącym od myszy YAC128 traktowanych niską i wysoką dawką wektora AAV5 z amiR136-13A w eksperymencie długoterminowym. Poziom ekspresji markerów *Gfap* oraz *Iba1* analizowano metodą RT-qPCR na materiale pochodzącym z prążkowiec myszy, natomiast stężenie NfL określono w surowicy krwi z wykorzystaniem technologii immunoenzymatycznej – Simoa Assay.

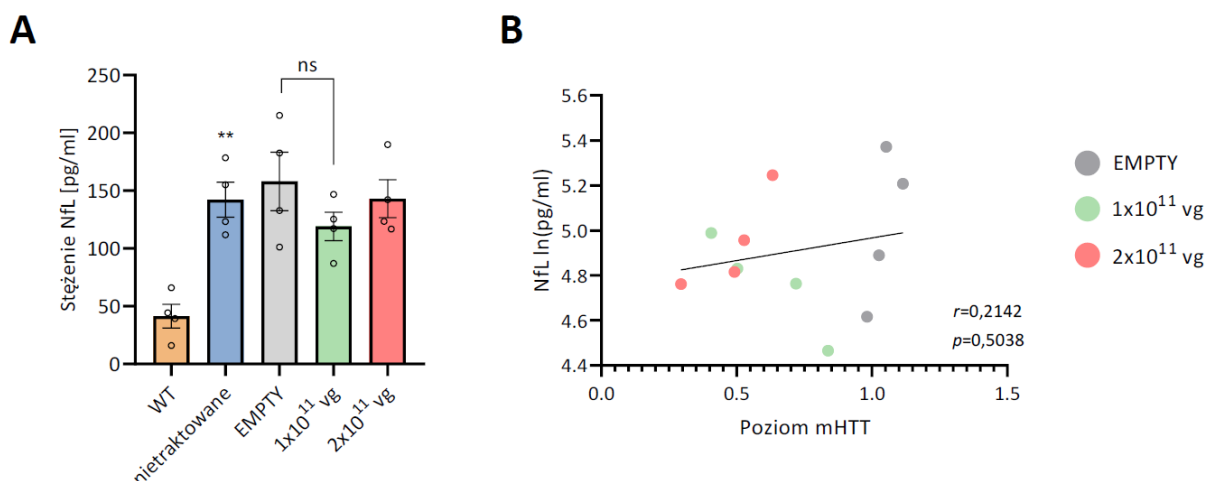
W przypadku analizy ekspresji *Gfap* zaobserwowano tendencję wzrostową w grupach poddanych działaniu amiRNA w porównaniu do grupy kontrolnej (*empty*), natomiast zmiany te nie były istotne statystycznie, co wskazuje na brak aktywacji astrogleju (rys. 35). Z kolei poziom ekspresji *Iba1* nie różnił się pomiędzy badanymi grupami, co sugeruje brak aktywacji mikrogleju. Wyniki te potwierdzają, iż cząsteczka amiR136-13A dostarczana w wektorze AAV5 nie wywołuje odpowiedzi zapalnej w badanym modelu.



**Rysunek 35.** Analiza poziomu mRNA markerów progresji HD – *Gfap* oraz *Iba1*.

Analizie RT-qPCR poddano RNA wyizolowane z prążkowiec myszy 28 tygodni po iniekcji. Poziom mRNA znormalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego –  $\beta$ -aktyny. Słupki na wykresie przedstawiają średnie poziomy mRNA  $\pm$  SEM obliczone na podstawie czterech powtórzeń biologicznych ( $n=4$  myszy) z których każde stanowiło średnią z lewej i prawej półkuli mózgu oraz co najmniej trzech powtórzeń technicznych. Analiza statystyczna przeprowadzona metodą jednokierunkowej ANOVA z zastosowaniem korekty Tukeya nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami.

W przypadku analizy poziomu NfL, u myszy YAC128 odnotowano istotnie statystycznie podwyższone stężenie tego białka w porównaniu do poziomu u myszy WT ( $p < 0,01$ , \*\*), co potwierdza obecność zmian o charakterze neurodegeneracyjnym w badanym modelu (rys. 36A). Choć redukcja stężenia NfL po zastosowaniu amiR136-13A w dawce niskiej była widoczna, różnice te nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej. Dodatkowo, analiza współczynnika korelacji nie wykazała istotnego związku pomiędzy poziomem mHTT w prążkowiec a stężeniem NfL w surowicy (rys. 36B). Wynik ten może być konsekwencją niewielkiej grupy badanych osobników, a także zmienności osobniczej.



**Rysunek 36.** Stężenie NfL w surowicy krwi myszy w eksperymencie długoterminowym (A) oraz jego korelacja z poziomem mHTT (B).

Analizie Simoa Assay poddano surowicę krwi pobraną od myszy 28 tygodni od iniekcji. Liczebność grupy (n) wynosiła 4 myszy.

(A) Słupki na wykresie przedstawiają średnie stężenia NfL  $\pm$  SEM obliczone na podstawie trzech powtórzeń technicznych. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem jednokierunkowej ANOVA z zastosowaniem korekty Tukeya. Wartość  $p$  dla porównania wyniku osobników WT z osobnikami nietraktowanymi oznaczono za pomocą gwiazdek:  $p < 0,01$  – \*\*. ns – wynik nieistotny statystycznie.

(B) Korelacja pomiędzy poziomem mHTT (średnia mHTT dla każdej myszy) w prążkowie a stężeniem NfL w surowicy krwi tych samych osobników (korelacja Pearsona:  $r=0,2142$ ,  $p=0,5038$ ). Stężenie NfL przedstawiono w postaci wartości logarytmu naturalnego.

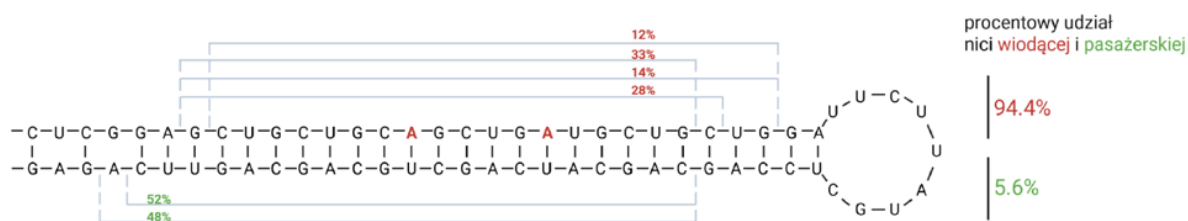
## 7.7. Ocena obróbki komórkowej amiR136-13A

Ze względu na doniesienia literaturowe sugerujące odmienne przetwarzanie amiRNA w zależności od typu komórek i tkanki (151, 152), w kolejnym etapie przeprowadzono także ocenę obróbki komórkowej amiR136-13A w prążkowie myszy YAC128 po podaniu wysokiej i niskiej dawki wektora w eksperymencie długoterminowym. Analizowano uwalniane warianty dojrzałej formy cząsteczki oraz poziom jej ekspresji, analogicznie jak w rozdziale 6.

### 7.7.1. Analiza uwalnianych wariantów 13A

Podobnie jak w modelu komórkowym, również w prążkowie myszy odnotowano znaczącą przewagę uwalniania nici wiodącej si13A (rys. 37). Jej udział procentowy był nawet wyższy niż w komórkach HEK293T i wyniósł 94,4%. Wynik ten potwierdza niewielkie ryzyko inkorporacji nici pasażerskiej do Ago, a w związku z tym znikome prawdopodobieństwo wystąpienia efektów niespecyficznych związanych z jej działaniem.

W tym modelu zaobserwowano także znacznie bardziej ukierunkowaną obróbkę, a w rezultacie większą homogenność końca 5', a najczęściej uwalnianym wariantem sekwencyjnym (33% z całej puli) okazał się być wariant 19-nukleotydowy (GCUGCUGCAGCUGAUGCUG), posiadający niesparowania do ciągu CAG w pozycji 9 i 14. Ponadto, sumaryczny procentowy udział wszystkich wariantów nici wiodącej o tym samym końcu 5' i niesparowaniach w pozycji 9 i 14 wynosił 76%. Z kolei w przypadku sekwencji o niesparowaniach w pozycji 8 i 13, sumaryczny udział wszystkich wariantów jej nici wiodącej wyniósł 19%. Homogenność końca 5' wskazuje na to, iż w warunkach *in vivo* przetwarzanie amiR136-13A przez maszynę komórkową zachodzi w sposób bardziej precyzyjny, co może korzystnie wpływać na przewidywalność działania cząsteczki. Ponadto, wyniki te potwierdzają wspomniane wcześniej doniesienia literaturowe, wskazujące na odmienną obróbkę prekursorów miRNA w zależności od typu komórki i tkanki.



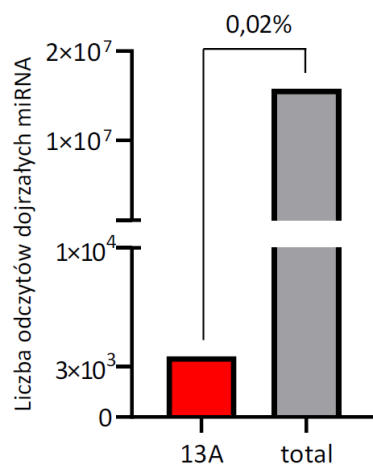
**Rysunek 37.** Warianty uwalnianych nici wiodących oraz pasażerskich 13A w prążkowiu myszy YAC128 w eksperymencie długoterminowym. Wynik stanowi średnią dla myszy traktowanych niską i wysoką dawką wektora AAV.

### 7.7.2. Określenie poziomu ekspresji 13A w porównaniu do endogennych miRNA

W modelu mysim poziom dojrzałej formy 13A w stosunku do 50 endogennych miRNA o najwyższej ekspresji był jeszcze mniejszy niż w modelu komórkowym i wynosił zaledwie 0,02% (rys. 38). Tak niski udział egzogennej cząsteczki w puli miRNA świadczy o tym, że nie zaburza ona naturalnego profilu miRNA w prążkowiu oraz nie powoduje przeciążenia szlaku RNAi w warunkach *in vivo* nawet podczas długotrwałej (28-tygodniowej) ekspozycji.

Wyniki uzyskane z modelu mysiego jak i komórkowego (rozdział 6) potwierdzają bezpieczeństwo stosowania amiR136-13A i sugerują, że jej obecność nie zakłóca prawidłowej regulacji ekspresji miRNA.





**Rysunek 38.** Zsumowana liczba odczytów dla 50 miRNA o najwyższej ekspresji w prążkowie myszy YAC128 po zastosowaniu amiR136-13A w porównaniu do odczytów dla dojrzalej formy 13A. Uwzględniono sumaryczną ilość odczytów dla wszystkich wariantów nici wiodącej.

## V Dyskusja

Pomimo wielu lat intensywnych badań nad chorobami z ekspansją powtórzeń CAG, skuteczna terapia przyczynowa, mogąca zahamować albo odwrócić postęp tych schorzeń nadal pozostaje poza zasięgiem medycyny. Terapie genowe oparte na mechanizmach RNAi dają jednak realne szanse na opracowanie nowych, precyzyjnych strategii terapeutycznych. Jednocześnie ich zastosowanie wiąże się z koniecznością spełnienia rygorystycznych kryteriów efektywności i bezpieczeństwa, stanowiących obecnie główne wyzwania w tej dziedzinie.

Warto podkreślić, że wiele dotychczasowych badań skupia się przede wszystkim na aspekcie efektywności, natomiast kompleksowa analiza bezpieczeństwa — zwłaszcza w kontekście efektów niespecyficznych — często pozostaje niedostatecznie przeprowadzona. Brak pełnej oceny potencjalnych efektów ubocznych może stanowić poważną barierę w translacji terapii RNAi do zastosowań klinicznych. Niniejsza praca stanowi próbę odpowiedzi na te wyzwania poprzez optymalizację konstruktu amiRNA do selektywnego obniżania poziomu zmutowanej HTT w HD oraz szeroką ocenę jego właściwości w licznych modelach eksperymentalnych, ze szczególnym uwzględnieniem aspektów bezpieczeństwa.

### 1. Efektywność i allelo-selektywność amiR136-13A

Ze względu na istotne funkcje HTT, zarówno w rozwoju zarodkowym jak i życiu pozapłodowym, strategia allelo-selektywnego wyciszania ekspresji genu jest obecnie uznawana za najbardziej pożądane i bezpieczne podejście terapeutyczne. Nieselektywna, długoterminowa redukcja poziomu HTT, wiąże się z ryzykiem poważnych, nieprzewidywalnych efektów ubocznych, zwłaszcza, że pełen zakres funkcji HTT nadal nie został w pełni określony (22, 23). Obecnie, allelo-selektywne podejścia są opracowywane jedynie przez Wave Life Sciences oraz Vico Therapeutics, przy czym obie opierają się o wykorzystanie ASO. Jak wspomniano wcześniej, WVE-003 celuje w SNP3 obecny u 40% pacjentów, co znacząco ogranicza liczbę potencjalnych beneficjentów terapii. VO659, pomimo ukierunkowania na wydłużone powtórzenia CAG, jako ASO wymagałoby częstego inwazyjnego podawania do OUN, co mogłoby obniżyć komfort życia pacjentów i zwiększałoby ryzyko powikłań. Ponadto, jego w pełni komplementarna do ciągów CAG sekwencja stwarza wysokie ryzyko wystąpienia efektu off-target, ze względu na obecność takich motywów w wielu genach.

W niniejszej pracy opisano nowe warianty amiRNA ukierunkowane na ciągi CAG, będące zmodyfikowaną cząsteczką amiR136-A2, które osiągają allelo-selektywność dzięki umiejętnemu wprowadzeniu niesparowań w sekwencji nici wiodącej. Modyfikacje te obniżają stabilność wiązania kompleksu RISC z docelowym transkryptem. W praktyce oznacza to, że podczas translacji rybosom z łatwością usuwa przeszkodę w postaci słabo związanego kompleksu z transkryptu normalnego o krótkiej sekwencji CAG. Z kolei w przypadku allelu zmutowanego, kumulacja kompleksów RISC stanowi efektywną barierę blokującą translację (153).

Wszystkie zaprojektowane zgodnie z tą strategią cząsteczki działały preferencyjnie wobec zmutowanego allelu zarówno w uproszczonym formacie shRNA, jak i docelowym – amiRNA. W niektórych modelach poziom wyciszenia przewyższał efekt obserwowany dla amiR136-A2. Zgodnie z literaturą, 50% obniżenie poziomu zmutowanego białka uważane jest za wartość progową wystarczającą do uzyskania efektu terapeutycznego (119). Badane w niniejszej pracy cząsteczki nie tylko osiągnęły ten poziom, lecz w zdecydowanej większości przypadków charakteryzowały się znacznie wyższą efektywnością. Szczególnie korzystny profil wykazała wyselekcjonowana cząsteczka amiR136-13A, która w modelach komórkowych HD (HEK293T, fibroblasty, NSC), jak i zwierzęcym (myszy YAC128), osiągała istotną efektywność redukcji poziomu mHTT do około 40-75%, zależnie od modelu, przy jednoczesnym braku istotnego wpływu na poziom prawidłowej HTT. Co istotne, w modelu *in vivo*, efekt wyciszenia ekspresji utrzymywał się przez co najmniej 28 tygodni po pojedynczym podaniu wektora AAV5 zawierającego amiR136-13A, co wskazuje na długoterminową trwałość efektu terapeutycznego bez potrzeby powtarzania administracji.

Porównując amiR136-13A do amiR136-A2, zaobserwowano wyższą efektywność obniżania poziomu mHTT w modelu fibroblastów HD i DRPLA, a także, co szczególnie istotne, w badaniach *in vivo*. W przypadku amiR136-A2, w 20-tygodniowym eksperymencie, zastosowanie dawki  $2 \times 10^{11}$  vg (niskiej) i  $4 \times 10^{11}$  vg (wysokiej) skutkowało wyciszeniem *mHTT* na poziomie ~50% (78). Tymczasem cząsteczka amiR136-13A osiągała porównywalny poziom redukcji nieprawidłowego białka w 28-tygodniowym eksperymencie, przy użyciu dawki wektora niższej o połowę. Uzyskanie tego samego efektu terapeutycznego przy niższej dawce wektora nie tylko wskazuje na wyższą efektywność tej cząsteczki, ale również istotnie ogranicza ryzyko wystąpienia efektów niespecyficznych związanych z wysokimi dawkami AAV5, takimi jak aktywacja odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów T, pobudzenie TLR, czy indukcja odpowiedzi humoralnej przeciwko kapsydowi wirusa (154–

156). Dodatkowo, amiR136-13A charakteryzowała się podobną efektywnością we wszystkich analizowanych strukturach mózgu – prążkowie, korze oraz hipokampie, podczas gdy cząsteczka wyjściowa nie uzyskała istotnego wyciszenia w korze mózgu. Może to być związane zarówno z lepszą dystrybucją lub stabilnością nowego wariantu amiRNA w różnych populacjach komórek nerwowych, jak i odmiennym profilem obróbki komórkowej tej cząsteczki, co pozwala na efektywniejsze oddziaływanie z docelowym mRNA w trudniej dostępnych obszarach mózgu. Hipotetycznie, wyższa efektywność amiR136-13A względem amiR136-A2 może wynikać z optymalnego rozmieszczenia niesparowań w nici wiodącej, które pogłębiają różnicę w powinowactwie do zmutowanego transkryptu.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi allelo-selektywnego wyciszania genu *HTT* z wykorzystaniem różnych podejść, takich jak narzędzia RNAi czy ASO. Model inhibicji translacji poprzez chemicznie modyfikowane ASO celujące w ciągi CAG został zaproponowany już w 2010 roku przez grupę D. Coreya (157). Modyfikacje polegające na wstawieniu m.in. zablokowanego nukleotydu (ang. *locked nucleic acid*, LNA) miały na celu zwiększyć preferencyjność cząsteczek do allelu zmutowanego. Opracowane ASO charakteryzowały się zróżnicowaną efektywnością i allelo-selektywnością w zależności od pozycji wprowadzonej modyfikacji. W opublikowanym 2 lata później artykule, ten sam zespół przetestował siRNA celujące w ciągi CAG, w pełni komplementarne, jak i zawierające pojedyncze oraz podwójne niesparowania w różnych pozycjach nici wiodącej (158). Autorzy wykazali, że dwuniciowe RNA z niesparowaniami w sekwencji komplementarnej do powtórzeń CAG mogą selektywnie obniżać poziom zmutowanego białka HTT w komórkach od pacjentów HD oraz w prekursorach neuronalnych myszy. Podobne efekty odnotowano w niniejszej pracy, gdzie zaprojektowane shRNA oraz amiRNA z niesparowaniami również wykazywały selektywność i efektywność zależną od pozycji wprowadzonej substytucji. Co istotne, mechanizm działania ASO różni się od RNAi, jednak w obu przypadkach kluczowy jest wybór celu molekularnego – region wydłużonych powtórzeń CAG. Oba podejścia potwierdzają, że właściwa optymalizacja sekwencji umożliwia uzyskanie wysokiej efektywności oraz allelo-selektywności, co stanowi ważny postęp w kontekście opracowywania skutecznych strategii terapeutycznych dla HD.

W przypadku podejść wektorowych, wachlarz wariantów z substytucjami nukleotydowymi w sekwencji cząsteczek, skutkujący niesparowaniami do ciągów CAG, został przetestowany w jednej z niedawno opublikowanych prac (159). Badacze zastosowali zarówno shRNA, jak i amiRNA o kadłubie miR-33, modyfikując sekwencje siRNA w celu uzyskania

allelo-selektywności. Ich analizy, przeprowadzone w testach lucyferazowych oraz na fibroblastach pochodzących od pacjentów HD, wykazały, że niektóre warianty rzeczywiście charakteryzowały się selektywnym wyciszaniem allelu zmutowanego. Alternatywne podejście, nie celujące w ciągi CAG, lecz w różne SNP, zostało przetestowane przez grupę P. Konstantinovej (160). Autorzy zaprojektowali serię amiRNA zawierających pojedyncze substytucje nukleotydowe w różnych pozycjach nici wiodącej, analizując ich wpływ na allelo-selektywność. Wyniki wykazały zróżnicowaną efektywność i selektywność, zależną od lokalizacji niesparowania, przy czym najbardziej obiecujące warianty zawierały modyfikacje w pozycjach 7 i 16. Autorzy obu tych prac podkreślili, że osiągnięcie wysokiej selektywności zależy od precyzyjnego rozmieszczenia niesparowań w nici wiodącej oraz, co istotne, od procesu komórkowej obróbki tych cząsteczek, co jest zgodne z uzyskanymi wynikami w niniejszej pracy doktorskiej.

Warto podkreślić, że uzyskana w niniejszej pracy allelo-selektywność nie jest regułą dla wszystkich podejść RNAi. Większość wcześniej opisywanych strategii wykorzystujących shRNA lub amiRNA celujące w *HTT* nie wykazuje dostatecznej selektywności, a stosowanie shRNA wiąże się z wysokim ryzykiem efektów ubocznych, m.in. z powodu przeciążenia maszynarii biogenezy miRNA (117, 161). To dodatkowo podkreśla przewagę zaprezentowanej strategii amiRNA, łączącej selektywność, efektywność i bezpieczeństwo działania.

Dodatkowym ważnym aspektem oceny efektywności amiR136-13A była analiza zdolności do obniżania poziomu krótkiej toksycznej formy huntingtyny – HTT1a. W literaturze podkreśla się, że to właśnie HTT1a, poprzez szybkie tworzenie agregatów białkowych, może w istotnym stopniu przyczyniać się do patogenezy HD i postępu neurodegeneracji (34). Należy jednak zaznaczyć, że nie wszystkie dotychczasowe badania uwzględniają ten aspekt w ocenie skuteczności terapeutycznej. W niniejszej pracy wykazano, że amiR136-13A skutecznie redukuje poziom HTT1a w modelu HEK293 Flp-In T-REx z indukowaną ekspresją tej formy białka. Uzyskany poziom wyciszenia (~75%) jest porównywalny do wyciszenia pełnej długości *HTT*, co jest kluczowe z punktu widzenia prewencji agregacji toksycznej formy oraz potencjalnego spowolnienia procesu neurodegeneracyjnego. Należy podkreślić, że nie wszystkie strategie wyciszania ekspresji *HTT* są skuteczne względem formy HTT1a. Potencjalne terapeutyki celujące w dalsze eksony genu *HTT* nie są efektywne w przypadku skróconych transkryptów, które powstają w wyniku wyboru alternatywnego miejsca poliadenylacji w intronie pierwszym. Przykładem jest nieselektywna amiRNA rozwijana przez Spark Therapeutics, które celuje w ekson 48 *HTT*, a także allelo-selektywny ASO WVE-003,

którego celem jest SNP3 zlokalizowany w eksonie 57 (162). W obu przypadkach krótszy transkrypt *HTT1a*, pozbawiony dalszych eksonów, nie będzie celem terapii. W związku z tym, skuteczność amiR136-13A wobec obu toksycznych form białka podkreśla potencjał tej cząsteczki jako narzędzia terapeutycznego dla HD oraz wskazuje na przewagę tej strategii nad innymi podejściami terapeutycznymi.

Dodatkowo, jednym ze zjawisk występujących w HD jest ekspansja somatyczna powtórzeń CAG. U pacjentów HD obserwuje się postępujące zwiększanie liczby tych powtórzeń w czasie, sięgające nawet kilkuset CAG, szczególnie w MSN prążkowie oraz w korze mózgu (163, 164). Uzasadnia to stosowanie strategii terapeutycznej celującej w ciąg CAG której celem jest preferencyjne wyciszenie allelu zmutowanego. Podstawą allelo-selektywności tej strategii jest właśnie różnica w długości ciągu normalnego i zmutowanego, która pogłębia się wraz z czasem prowadząc do degeneracji komórek nerwowych.

Podsumowując, wyniki uzyskane w niniejszej pracy jednoznacznie wskazują, że amiR136-13A stanowi skuteczną i bezpieczną alternatywę dla dotychczas rozwijanych allelo-selektywnych strategii. Jej zdolność do długotrwałego wyciszenia ekspresji mHTT po jednorazowej aplikacji oraz skuteczność wobec toksycznej formy HTT1a stanowią istotną przewagę nad dotychczasowymi strategiami terapeutycznymi. Brak zależności od polimorfizmów SNP czynią z tego podejścia atrakcyjną opcję terapeutyczną dla HD i potencjalnie również innych chorób poliQ.

## **2. Ocena bezpieczeństwa amiRNA**

W przypadku terapii genowych opartych na RNAi, szczegółowa ocena potencjalnych efektów niespecyficznych stanowi kluczowy element przedklinicznej walidacji kandydatów terapeutycznych. Mimo wysokiej skuteczności w redukcji ekspresji docelowych genów, cząsteczki RNAi mogą również oddziaływać z transkryptami o częściowej komplementarności, prowadząc do efektów off-target. Dodatkowo, ich obecność w komórkach może powodować niespecyficzną aktywację odpowiedzi immunologicznej (165). Dlatego też, w niniejszej pracy dokonano wieloaspektowej analizy bezpieczeństwa amiR136-13A, obejmującej analizę bioinformatyczną, analizę transkryptomyczną oraz ocenę ekspresji potencjalnych genów off-target, ale także markerów neurodegeneracji i odpowiedzi zapalnej w OUN.

W pracy doktorskiej, jako docelowy format wybrano amiRNA, które ze względu na swoje podobieństwo do endogennych pri-miRNA włączane są do szlaku biogenezy miRNA na bardzo wczesnym etapie, co minimalizuje ryzyko przeciążenia elementów szlaku RNAi i potencjalnej toksyczności. W odróżnieniu od cząsteczek shRNA, amiRNA są powszechnie uznawane za format bezpieczniejszy dla zastosowań terapeutycznych (47). W niniejszych badaniach wykazano, że cząsteczka amiR136-13A była dobrze tolerowana *in vivo* w modelu myszy YAC128, nawet do 28 tygodni od iniekcji wektorem AAV5. Nie zaobserwowano żadnych niepokojących zmian w zachowaniu zwierząt ani utraty masy ciała, co dodatkowo potwierdza dobrą tolerancję zarówno samej cząsteczki amiRNA, jak i zastosowanego wektora.

Analiza transkryptomyczna wykonana w modelu ludzkich NSC HD wykazała, że cząsteczka amiR136-13A nie powoduje szerokich zmian w ekspresji genów. Obserwowana deregulacja miała ograniczony charakter, co potwierdza korzystny profil bezpieczeństwa cząsteczki. Na szczególną uwagę zasługuje umiarkowane obniżenie ekspresji genu będącego potencjalnym off-targetem z dwoma niesparowaniami do sekwencji nici wiodącej 13A (*SRP14*). Pomimo, że zmiana była niewielka, nie powinna być pominięta w dalszych analizach. Konieczne byłoby przeprowadzenie walidacji na poziomie mRNA (RT-qPCR), a także białka (Western blotting), w celu ostatecznego potwierdzenia potencjalnego efektu off-target. Zaobserwowany brak istotnych różnic w poziomie ekspresji *HTT* potwierdza zakładany mechanizm działania amiR136-13A, czyli inhibicję translacji bez degradacji transkryptu. W niniejszych badaniach wykazano również, że transdukcja lentiwirusowa może powodować deregulację niektórych genów. Niemniej jednak należy podkreślić, że w eksperymentach *in vivo* wykorzystano alternatywny wektor AAV5, który w odróżnieniu od lentiwirusów nie integruje do genomu i cechuje się korzystniejszym profilem bezpieczeństwa oraz mniejszym potencjałem immunogennym, co znacząco zwiększa translacyjny potencjał analizowanego podejścia terapeutycznego. Niezwykle istotnym z punktu widzenia możliwości terapeutycznych amiR136-13A była również analiza zjawiska tzw. odwrócenia fenotypu (ang. *phenotype reversal*). Przeprowadzona analiza różnicowej ekspresji wykazała, że wiele genów deregulowanych w komórkach HD względem izogenicznych komórek zdrowych wykazywało tendencję do normalizacji poziomu ekspresji po zastosowaniu amiR136-13A. Może to sugerować, że selektywna redukcja zmutowanej HTT przyczynia się do częściowego przywrócenia bardziej fizjologicznego profilu transkryptomicznego w komórkach HD. Warto podkreślić, że tak korzystne zmiany transkryptomiczne zaobserwowano już przy ~40% obniżeniu poziomu mHTT. Fakt ten sugeruje, że efekty przywracające homeostazę

molekularną mogą być jeszcze bardziej nasilone w przypadku skuteczniejszego wyciszenia ekspresji nieprawidłowego wariantu genu *HTT*.

W przypadku analizy efektów off-target *in vivo*, zaprojektowana cząsteczka amiR136-13A, podobnie jak większość pozostałych zaprojektowanych wariantów, nie posiada żadnych w pełni komplementarnych sekwencji poza celem w transkryptomie ludzkim oraz mysim, co wykazała analiza BLAST. Już na etapie projektowania stanowiło to przewagę bezpieczeństwa nad cząsteczką wyjściową amiR136-A2 i sugerowało wysoką specyficzność. Analiza ekspresji potencjalnych genów off-target, posiadających pojedyncze niesparowanie względem nici wiodącej 13A, w prądkowiu myszy 28 tygodni po iniekcji wykazała brak statystycznie zmian w poziomie ekspresji analizowanych 9 genów. We wcześniejszych badaniach nad bezpieczeństwem amiR136-A2, przeanalizowano ekspresję 6 genów o pełnej komplementarności do nici wiodącej tej cząsteczki w modelu YAC128 20 tygodni od iniekcji. Również w tym przypadku nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian ekspresji, choć nie można wykluczyć potencjalnych efektów w innych modelach biologicznych. Co istotne, we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych na fibroblastach HD i SCA3 (141) odnotowano statystycznie istotne obniżenie ekspresji genu *PEG3* (*paternally-expressed gene 3*) po zastosowaniu amiR136-A2, co dodatkowo podkreśla konieczność kompleksowej i wielomodelowej analizy efektów niespecyficznych dla potencjalnych kandydatów terapeutycznych opartych na RNAi.

Analiza poziomu mRNA *Gfap* oraz *Iba1* w prądkowiu myszy 28 tygodni po iniekcji nie wykazała istotnych statystycznie zmian, co sugeruje, że w badanym modelu cząsteczka amiR136-13A oraz nośnik w postaci wektora AAV5 nie indukują aktywacji mikrogleju oraz astrogleju. Wyniki te są spójne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi cząsteczki amiR136-A2, dla której również nie zaobserwowano wzrostu poziomu ekspresji tych genów (78). Potwierdzono to zarówno w analizach RT-qPCR, jak i barwieniach immunohistochemicznych. Sugeruje to dobrą tolerancję obu tych cząsteczek oraz ich wspólnego nośnika – wektora AAV5 – oraz brak wywoływania reakcji zapalnej w OUN. Brak odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na podanie wektora AAV2/1 niosącego amiRNA celującego w *HTT* odnotowano także w badaniach prowadzonych przez Lisę Stanek i wsp. (166). W modelu YAC128 autorzy zastosowali iniekcję do prądkowia, a poziomy markerów analizowano po 1 oraz 5 miesiącach od podania, przy czym czas analizy po 5 miesiącach był porównywalny do okresu obserwacji w przypadku badań nad cząsteczką amiR136-A2. Co ciekawe, autorzy określili także poziom ekspresji markera *Darpp-32*



(*dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein*), markera MSN, którego obniżona ekspresja charakterystyczna jest dla modelu YAC128 i pacjentów HD. Zauważono, że podanie amiRNA skutkowało częściowym przywróceniem poziomu *Darpp-32*, co sugeruje potencjalną ochronę funkcji neuronalnych. Wyniki te wskazują, że analiza ekspresji *Darpp-32* może stanowić dodatkowy, wartościowy wskaźnik skuteczności terapeutycznej i powinna być uwzględniona w przyszłych badaniach. Zbliżone obserwacje zostały poczynione przez zespół P. Konstantinovej. W tych badaniach zastosowano nieselektywną cząsteczkę amiRNA o kadłubie miR-451 w wektorze AAV5 u szczurów z ostrym fenotypem HD (167). Opisywana przez nich cząsteczka (AMT-130), która obecnie jest testowana w badaniach klinicznych, charakteryzowała się wysoką efektywnością działania i skutkowała także poprawą funkcjonowania neuronów, czego dowodził wzrost poziomu *Darpp-32*. Co istotne, podanie AMT-130 nie prowadziło do aktywacji mikrogleju ani astrogleju, ocenianej w analizie immunohistochemicznej. Dane uzyskane w niniejszej pracy, w połączeniu z doniesieniami innych, niezależnych grup badawczych, wskazują, że zastosowanie wektorów AAV niosących cząsteczki amiRNA celujące w transkrypt *HTT* nie indukuje istotnej odpowiedzi immunologicznej w OUN. Wyniki te sugerują dobrą tolerancję zarówno samego wektora AAV, jak i zastosowanych cząsteczek amiRNA, choć dla pełnej oceny bezpieczeństwa konieczne są dalsze, pogłębione badania.

W niniejszej pracy przeanalizowano także poziom NfL w eksperymencie długoterminowym. Podwyższone poziomy tego białka obserwuje się zarówno w modelach zwierzęcych, jak i u pacjentów HD, a ich stężenie w krwi oraz CSF wzrasta wraz z postępem choroby (168–170). W przeprowadzonych badaniach nie odnotowano istotnie statystycznego spadku poziomu NfL w surowicy po podaniu amiR136-13A, ani korelacji pomiędzy poziomem mHTT a stężeniem NfL. Na korzyść natomiast przemawia brak różnic w poziomie NfL pomiędzy osobnikami nietraktowanymi, a tymi traktowanymi wektorem kontrolnym oraz z cząsteczką amiRNA, co wskazuje, że ani wektor AAV5 ani amiR136-13A nie powodują uszkodzeń neuronów. Szczegółową analizę tego zagadnienia przeprowadziła grupa Michaela Haydena, która w 2024 roku opublikowała wyniki badań prowadzonych na tym samym modelu – myszach YAC128 (171). Autorzy analizowali poziom NfL w surowicy oraz CSF po zastosowaniu ASO celującego w *mHTT*, wykorzystując tę samą technikę detekcji, a mianowicie Simoa Assay. Analogicznie do wyników uzyskanych w niniejszej pracy, zaobserwowali oni znaczny wzrost poziomu NfL u myszy YAC128 w stosunku do osobników zdrowych. Co istotne, pomimo istotnego wyciszenia *mHTT* w mózgu, autorzy nie odnotowali

obniżenia stężenia NfL w surowicy. Zaobserwowano natomiast istotny, zależny od dawki ASO spadek poziomu NfL w CSF, co sugeruje, że stężenia tego białka w surowicy i CSF nie zawsze wykazują bezpośrednią korelację. W niniejszych badaniach należałoby również rozważyć analizę poziomu NfL w CSF, aby uzyskać pełniejszy obraz wpływu proponowanego podejścia terapeutycznego na proces neurodegeneracji. Dodatkowo, w pracy G. Bates i wsp. (170) wykazano, że poziomy NfL w CSF są znacznie wyższe niż we krwi zarówno u myszy YAC128, jak i w innych mysich modelach HD (zQ175, R6/2). Sugeruje to, że CSF jest bardziej czułym materiałem biologicznym do wykrywania neurodegeneracji w tych modelach. Autorzy tej pracy wskazali również inne potencjalne markery biologiczne, takie jak białko neuroprotekcyjne Tau (*tubulin associated unit*) i wskaźnik stanu zapalnego BRP-39 (*breast regression protein 39*), jako użyteczne narzędzia do monitorowania progresji HD, co może stanowić ciekawy kierunek dla przyszłych badań.

Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdzają wysokie bezpieczeństwo zastosowania cząsteczki amiR136-13A oraz wektora AAV5 w myszach YAC128 i NSC HD. W modelu *in vivo* nie odnotowano efektów off-target, aktywacji odpowiedzi zapalnej ani wzrostu poziomu markera neurodegeneracji. Brak zmian w ekspresji *Gfap* i *Iba1*, zmian w poziomie NfL oraz stabilna masa ciała i zachowanie zwierząt potwierdzają dobrą tolerancję AAV5-amiR136-13A. W modelu ludzkich NSC HD cząsteczka amiR136-13A nie powodowała znaczących globalnych deregulacji w ekspresji genów. Wyniki te, wspierane przez niezależne doniesienia literaturowe, wskazują na korzystny profil bezpieczeństwa terapii opartych na amiRNA celujących w transkrypt *HTT*.

### **3. Obróbka komórkowa amiR136-13A w różnych modelach badawczych**

amiRNA, jako konstrukty oparte na endogennym kadłubie pri-miRNA, podlegają w komórce takim samym mechanizmom obróbki jak naturalne miRNA. Proces ten obejmuje początkowe cięcie przez kompleks Drosha/DGCR8 w jądrze, a następnie dalsze przetwarzanie przez enzym Dicer w cytoplazmie, prowadzące do uwolnienia dwuniciowego RNA, z którego tylko jedna nić – zwykle wiodąca – jest inkorporowana do Ago tworząc kompleks RISC. Prawidłowa obróbka odgrywa kluczową rolę nie tylko w efektywności cząsteczki, ale także w jej bezpieczeństwie (47, 56, 172).

Wiadome jest, że nawet niewielkie zmiany nukleotydowe w określonych pozycjach sekwencji mogą istotnie wpływać na komórkową obróbkę amiRNA. Modyfikacje te wpływają na profil uwalnianych wariantów nici wiodącej i pasażerskiej, ale także mogą indukować przełączanie ramion, prowadzące do inkorporacji nici pasażerskiej do Ago (90). W niniejszej pracy wykazano, że wprowadzenie dodatkowej substytucji w pozycji 13 nici wiodącej A2 zmienia profil jej obróbki. Konfrontując wyniki uzyskane dla amiR136-13A z opisanym wcześniej profilem obróbki amiR136-A2 (78), zaobserwowano pewne zmiany. W modelu HEK293T, amiR136-13A wykazywała nieco wyższy udział nici wiodącej oraz zmieniony zestaw dominujących wariantów w porównaniu do amiR136-A2. Różnice te sugerują, że dodatkowa substytucja w pozycji 13 może wpływać na rozpoznanie lub cięcie sekwencji przez elementy maszyneryi obróbki miRNA, prowadząc do zmiany wariantów uwalnianych z tego samego kadłuba. Nie jest znana obróbka amiR136-A2 w prążkowie myszy, co ogranicza możliwość bezpośredniego porównania obu cząsteczek w tym samym środowisku fizjologicznym, natomiast porównując profil obróbki amiR136-13A między modelem HEK293T a YAC128, zaobserwowano pewne różnice. W modelu mysim, zdecydowanej poprawie uległa homogenność końca 5' (świadcząca o jednorodności sekwencji regionu źródłowego) oraz wzrósł procentowy udział uwalnianej nici wiodącej, co sugeruje korzystniejszą obróbkę przez maszynierię RNAi w komórkach mózgu. Stosunkowo wysoki udział nici wiodącej o niesparowaniach w pozycji 9 i 14 (zamiast 8 i 13, jak zakładano w projektowaniu), a co za tym idzie, o odmiennej sekwencji regionu źródłowego, mógłby tłumaczyć wyższą efektywność amiR136-13A w mózgu, w tym szczególnie w korze, gdzie wariant 136-A2 wykazywał ograniczoną aktywność. Aby jednak w pełni wyjaśnić tę zależność, należałoby przeprowadzić analizę obróbki także w innych obszarach OUN, takich jak kora czy hipokamp. Warto też podkreślić, że nie jest obecnie wiadome, które spośród uwalnianych wariantów są preferencyjnie inkorporowane do Ago. Analiza immunoprecypitacji Ago-2, która umożliwia bezpośrednio wyodrębnienie funkcjonalnych kompleksów RISC oraz identyfikację związanego miRNA, byłaby wartościowym narzędziem do określenia aktywnych wariantów, rzeczywiście uczestniczących w wyciszaniu ekspresji *HTT*.

Pomimo różnic w uwalnianych wariantach nici wiodącej między amiR136-13A oraz amiR136-A2, dodatkowa analiza BLAST wykazała, że nie stanowią one ryzyka pod względem wystąpienia potencjalnych efektów off-target. Wszystkie najczęściej uwalniane warianty zarówno w HEK293T jak i modelu mysim mają mniejszą liczbę potencjalnych sekwencji poza celem (w tym brak sekwencji w pełni komplementarnych) w ludzkim

transkryptomie w porównaniu do amiR136-A2 (tab. 27). Sugeruje to, że nawet mimo różnic w obróbce i pomimo heterogenności końca 5' (w modelu HEK293T), amiR136-13A jest cząsteczką bezpieczniejszą od wyjściowego wariantu. Dodatkowo niski poziom ekspresji dojrzalej formy 13A w stosunku do ekspresji endogennych miRNA potwierdza jej bezpieczeństwo przy zachowaniu wysokiej efektywności.

**Tabela 27.** Liczba potencjalnych sekwencji off-target w genomie człowieka dla najczęściej uwalnianych wariantów nici wiodących 13A.

| Sekwencja                                            | GCUGCUGCAGCUGA<br>UGCUGCUG | CUGCUGCAGCUGA<br>UGCUGCUG | AGCUGCUGCAGCUGA<br>UGCUGCU |
|------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Nukleotydowe pozycje niesparowań do ciągu CAG        | 9, 14                      | 8, 13                     | 10, 15                     |
| Liczba w pełni komplementarnych sekwencji off-target | 0                          | 0                         | 0                          |
| Liczba sekwencji off-target z 1 niesparowaniem       | 30                         | 25                        | 28                         |
| Liczba sekwencji off-target z 2 niesparowaniami      | 214                        | 34                        | 101                        |

Wyniki niniejszych badań znajdują potwierdzenie w pracach publikowanych przez inne grupy badawcze. Proces obróbki komórkowej reagentów RNAi omówiony został w jednej ze wspomnianych wcześniej prac (159), w której autorzy zastosowali cząsteczki shRNA oraz amiRNA celujące w powtórzenia CAG z wprowadzonymi niesparowaniami w obu niciach w pozycjach 9-11. Dodatkowo, w niektórych cząsteczkach zmodyfikowali także sekwencję nośnikowego pri-miR-33. Modyfikacje te skutkowały znaczącym zróżnicowaniem obróbki cząsteczek w modelu HEK293T. W niektórych przypadkach odnotowano, że nić wiodąca była uwalniana zaledwie w 2-4%, mimo to, cząsteczki te osiągały istotne obniżenie poziomu mHTT, sięgające około 50%. W związku z tym, autorzy wysnuli wniosek, że nawet niewielkie ilości nici wiodącej mogą być wystarczające do efektywnego wyciszania ekspresji *HTT*. Należy w tym miejscu jednak zaznaczyć, że tak duży (ponad 90%) udział nici pasażerskiej zwiększa ryzyko wystąpienia efektów niespecyficznych wynikających z jej aktywności.

Znaczenie dokładnej analizy obróbki narzędzi RNAi w komórkach docelowych podkreślają również wyniki pracy Shih-Ching Lo i wsp. (173). Autorzy porównali dwa warianty cząsteczek amiRNA celujących w SOD1 (*superoxide dismutase 1*), różniące się wyłącznie zastosowanym kadłubem (miR-155 i miR-30). Cząsteczki zbudowane w oparciu o kadłub miR-155 cechowały się znacznie wyższym poziomem uwalnianej nici wiodącej, jednak prowadziły do wystąpienia działań niepożądanych i toksyczności u myszy. Z kolei zastosowanie kadłuba miR-30 skutkowało niższą ekspresją dojrzałej formy amiRNA, ale jednocześnie pozwalało uniknąć toksyczności. Co istotne, w tej pracy zaobserwowano wysoką zgodność obróbki cząsteczek w neuronach pochodzących z komórek iPSC oraz w mózgu myszy – dominującym wariantem uwalnianej nici wiodącej była identyczna sekwencja, a docinanie wykazywało podobny profil. Stoi to w kontrze do wyników uzyskanych w niniejszej pracy, gdzie profil obróbki amiR136-13A różnił się pomiędzy modelem HEK293T a tkanką mózgową myszy YAC128. Różnice te mogą wynikać ze specyfiki linii HEK293T, które jako komórki ludzkiego embrionalnego pochodzenia nerki nie odzwierciedlają profilu ekspresji typowego dla komórek neuronalnych, w tym także związanego z komponentami szlaku RNAi. Tym samym, linia ta może być mniej odpowiednia do oceny obróbki RNAi w kontekście chorób neurodegeneracyjnych. Wniosek płynący z porównania obu badań wskazuje, że wiarygodna analiza obróbki amiRNA powinna być przeprowadzana bezpośrednio w tkance docelowej – w tym przypadku w mózgu – co pozwala na uchwycenie istotnych różnic w przetwarzaniu, mogących wpływać na efektywność, selektywność oraz bezpieczeństwo zastosowanej terapii RNAi.

Podsumowując, obróbka amiRNA jest silnie zależna od typu komórki co wpływa zarówno na udział nici wiodącej, jak i różnorodność wariantów sekwencyjnych. Cząsteczka amiR136-13A wykazała bardziej jednorodny i korzystny profil obróbki w mózgu niż w modelu HEK293T, a generowane warianty, pomimo zróżnicowania sekwencyjnego, charakteryzowały się niższym ryzykiem off-target w porównaniu do amiR136-A2. Obserwacje te podkreślają konieczność oceny przetwarzania RNAi bezpośrednio w tkance docelowej oraz znaczenie optymalizacji konstruktu, dla zapewnienia bezpieczeństwa i efektywności potencjalnego podejścia terapeutycznego.

#### 4. Ograniczenia i perspektywy dalszych badań

Pomimo uzyskania szeregu istotnych wyników dotyczących efektywności, selektywności oraz bezpieczeństwa cząsteczki amiR136-13A, należy podkreślić, że niniejsze badania mają pewne ograniczenia, które należy uwzględnić przy projektowaniu przyszłych eksperymentów.

Istotną wadą badanych reagentów jest brak uniwersalności działania. Najbardziej pożądanym rozwiązaniem terapeutycznym byłaby pojedyncza cząsteczka zdolna do skutecznego i selektywnego obniżania poziomu nieprawidłowych białek poliQ. W praktyce jednak, amiR136-13A, podobnie jak inne badane w niniejszej pracy amiRNA, wykazywały zróżnicowaną efektywność oraz allelo-selektywność w zależności od modelu komórkowego choroby poliQ – fibroblastów pochodzących od pacjentów HD, SCA3 oraz DRPLA – pomimo wspólnego celu, jakim są ekspansje CAG. Zjawisko to może być częściowo wyjaśnione różnicami w lokalizacji ciągów CAG w poszczególnych genach: *HTT*, *ATXN3* oraz *ATN1*. W przypadku genu *HTT* powtórzenia CAG zlokalizowane są na początku 5' otwartej ramki odczytu (ang. *open reading frame*, ORF), w *ATXN3* – w części 3' ORF (ekson 10), natomiast w *ATN1* – w środkowej części ORF (ekson 5) (174, 175). Istotny wpływ lokalizacji powtórzeń CAG na efektywność wyciszania wykazała grupa A. Fiszer (176). Wykorzystując system reporterowy autorzy wykazali, iż siRNA charakteryzują się różną aktywnością w zależności od lokalizacji sekwencji docelowej. Co więcej, zaobserwowali wyraźnie wyższą allelo-selektywność w przypadku konstrukcji zawierających sekwencje flankujące *HTT*, co sugeruje, że nie tylko lokalizacja powtórzeń, ale również ich sekwencje otaczające mogą wpływać na specyficzność działania cząsteczki RNAi. Podsumowując, skuteczność oraz allelo-selektywność narzędzi RNAi zależą w istotnym stopniu od charakterystyki konkretnego genu i jego otoczenia sekwencyjnego, co wymusza indywidualną optymalizację projektowanych cząsteczek.

Ważnym ograniczeniem niniejszych badań jest także brak pełnej analizy ekspresji amiRNA i obróbki w poszczególnych częściach mózgu. Choć wykazano korzystny profil obróbki w prążkowie, nie przeprowadzono analogicznej analizy w innych strukturach, takich jak kora czy hipokamp, mimo że również zostały objęte oceną efektywności. Biorąc pod uwagę, że poziomy białek takich jak Drosha, Dicer czy Ago mogą się istotnie różnić pomiędzy poszczególnymi obszarami mózgu, może to wpływać na efektywność działania cząsteczki oraz ryzyko wystąpienia efektów niespecyficznych. Ponadto, ocena przetwarzania amiRNA

powinna zostać uzupełniona o analizę w modelu ludzkich komórek nerwowych – NSC albo neuronach, ponieważ profil obróbki różni się także międzygatunkowo. Dodatkowo, w niniejszej pracy badano jedynie poziom ekspresji dojrzałej formy cząsteczki 13A, pomijając natomiast określenie poziomu ekspresji form prekursorowych, powstałych po cięciu Drosha. W eksperymencie *in vivo* zaobserwowano porównywalną redukcję poziomu HTT w przypadku obu dawek wektora, co może co może sugerować, że komórkowa maszynaria przetwarza jedynie określoną ilość prekursora cząsteczki, po której dalszy wzrost dostępności nie przekłada się na zwiększoną aktywność biologiczną. Metoda typu Northern blot mogłaby umożliwić określenie, czy dochodzi do akumulacji pośrednich form, co mogłoby świadczyć o zaburzeniu równowagi szlaku biogenezy miRNA i potencjalnie skutkować toksycznością.

Niezwykle istotne z punktu widzenia patogenezy HD były analizy efektywności amiR136-13A w redukcji poziomu krótkiej, toksycznej formy huntingtyny – HTT1a, wykazującej wysoki potencjał do tworzenia agregatów białkowych. W celu pełniejszej oceny skuteczności terapeutycznej, istotne byłoby rozszerzenie tych badań o analizę poziomu agregatów w modelu *in vivo*. Obecnie prowadzone są badania z wykorzystaniem linii HEK293 Flp-In T-REx z indukowalną ekspresją HTT1a i analizy histochemicznej z użyciem przeciwciała anti-FLAG, umożliwiającej wizualizację zmian w ilości lub rozmiarze agregatów HTT1a po zastosowaniu cząsteczki amiR136-13A. Uzyskanie takich wyników mogłoby stanowić istotne potwierdzenie wysokiego potencjału terapeutycznego badanego amiRNA oraz jego wpływu na kluczowe mechanizmy patofizjologiczne związane z chorobą.

Dodatkowo, biorąc pod uwagę wspomniane we wstępie doniesienia dotyczące obecności zjawiska RAN translacji u pacjentów HD oraz w modelach eksperymentalnych, należałoby ocenić wpływ amiR136-13A na powstawanie białek powstałych w wyniku tego mechanizmu. Z uwagi na ich potencjalną toksyczność, określenie, czy terapia oparta na amiRNA wpływa na poziom białek RAN translacyjnych, mogłoby dostarczyć dodatkowych informacji na temat skuteczności tej cząsteczki.

Ponadto, sama metoda dostarczania, AAV5, choć wyjątkowo skuteczna i wykorzystywana w badaniach klinicznych od kilku lat, posiada pewne wady. Wprawdzie w niniejszych badaniach nie odnotowano wystąpienia efektów niespecyficznych, które można by przypisać bezpośrednio działaniu wektora, literatura donosi o możliwości wywołania odpowiedzi immunologicznej, zwłaszcza przy wysokich dawkach lub powtórnym podaniu (154, 177). Dodatkowo, stereotaktyczna iniekcja do prążkowie, choć precyzyjna, jest

zabiegiem inwazyjnym. Rozwiązaniem mogłoby być zastosowanie serotypów AAV o zdolności przenikania bariery krew-mózg, takich jak wspomniany wcześniej AAV-PHP.eB. Należy jednak pamiętać, że tego rodzaju serotyp jest skuteczny przede wszystkim u myszy z określonym wariantem receptora *Ly6a*, którego ekspresja jest ograniczona albo nieobecna u ludzi i niektórych szczepów gryzoni (178, 179). W związku z tym, w przypadku przełożenia tego podejścia na modele ludzkie, konieczna byłaby dalsza optymalizacja kapsydów, uwzględniająca ich tropizm gatunkowo-specyficzny. Systemowe podanie zwiększa też ryzyko ekspresji transgenu w tkankach obwodowych i związanych z tym efektów ubocznych. Konieczna byłaby zatem dokładna analiza biodystrybucji i ekspresji w całym organizmie. Alternatywą do podejść wektorowych, są strategie oparte na nanonośnikach, takich jak egzosomy (180). Takie podejście w badaniach klinicznych wykorzystuje wspomniana wcześniej firma ExoRNA Bioscience. Choć nośniki te mogą ograniczyć immunogenność oraz konieczność wykonania inwazyjnego zabiegu, cechują się niższą efektywnością i stabilnością, co może wymagać częstszych podań i generować wyższe koszty produkcji.

Należy również podkreślić, że przed ewentualnym wdrożeniem do badań klinicznych, konieczne jest przeprowadzenie kompleksowej oceny bezpieczeństwa i farmakokinetyki amiR136-13A w modelach naczelnych innych niż człowiek (ang. *non-human primates*), które ze względu na większe podobieństwo do człowieka w zakresie anatomii, fizjologii oraz ekspresji genów, stanowią kluczowy etap walidacji potencjalnych terapeutyków opartych na technologii RNAi.

## **5. Znaczenie uzyskanych wyników dla rozwoju terapii chorób poliQ**

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy stanowią istotny wkład w rozwój terapii wykorzystujących narzędzia RNAi ukierunkowanych na redukcję poziomu zmutowanych białek poliQ, a w szczególności HTT. Przedstawione wyniki dowodzą, że odpowiednio zaprojektowany konstrukt amiRNA może nie tylko osiągać wysoką efektywność wyciszania, ale również minimalizować ryzyko działań niepożądanych, w tym efektów off-target.

W pracy tej istotnym punktem odniesienia była cząsteczka amiR136-A2, stanowiąca punkt wyjścia dla dalszych modyfikacji konstrukcyjnych. Nowa cząsteczka, amiR136-13A, charakteryzuje się wyraźnie korzystniejszym profilem zarówno pod względem efektywności wyciszania mHTT, jak i bezpieczeństwa (tab. 28). Modyfikacja sekwencji skutkowała m.in.



redukcją liczby w pełni komplementarnych potencjalnych sekwencji off-target do zera, poprawą efektywności w mózgu myszy YAC128, a także jej korzystniejszą obróbką komórkową. Co istotne, efekty te uzyskano przy użyciu dwukrotnie niższej dawki wektora AAV5, co dodatkowo ogranicza ryzyko związane z podaniem wysokich dawek terapeutycznych (181). Zestawienie to jednoznacznie wskazuje na wyższy potencjał terapeutyczny wariantu amiR136-13A i uzasadnia jego wybór jako najlepszego kandydata do dalszego rozwoju.

**Tabela 28.** Porównanie amiR136-A2 oraz amiR136-13A.

| Cecha                                                                             | amiR136-A2                           | amiR136-13A                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Przewidywana sekwencja nici wiodącej                                              | CUGCUGCAGCUGCUGCUGC                  | CUGCUGCAGCUGAUGCUGC                   |
| Liczba w pełni komplementarnych sekwencji off-target w ludzkim transkryptomie     | 10                                   | 0                                     |
| Efektywność wyciszania mHTT w modelu fibroblastów HD                              | 50%                                  | 64%                                   |
| Dawka wektora AAV5 potrzebna do osiągnięcia 50% redukcji poziomu mHTT w prądkowiu | 4x10 <sup>11</sup> vg                | 2x10 <sup>11</sup> vg                 |
| Redukcja poziomu mHTT w korze mózgowej                                            | 20%                                  | 50%                                   |
| Udział nici wiodącej w HEK293T                                                    | 81,1%                                | 85,5%                                 |
| Udział w ekspresji endogennych miRNA                                              | 0,15% w HEK293T                      | 0,71% w HEK293T,<br>0,02% w YAC128    |
| Główne warianty nici wiodącej w HEK293T                                           | CUGCUGCAGCUGCUGCUGG<br>22 nt (42%)   | CUGCUGCAGCUGAUGCUGCUG<br>21 nt (21%)  |
|                                                                                   | GCUGCUGCAGCUGCUGCUGCU<br>21 nt (17%) | GCUGCUGCAGCUGAUGCUGCUG<br>22 nt (18%) |
| Aktywacja odpowiedzi zapalnej w modelu YAC128                                     | nie stwierdzono                      | nie stwierdzono                       |
| Obniżenie poziomu ekspresji potencjalnych genów off-target w modelu YAC128        | nie stwierdzono                      | nie stwierdzono                       |
| Ogólna tolerancja cząsteczki w modelu YAC128                                      | dobra                                | dobra                                 |

Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdzają, że strategia oparta na allelo-selektywnym amiRNA o wysokiej efektywności może stanowić nie tylko bezpieczną alternatywę dla istniejących strategii, lecz również platformę wyjściową do tworzenia

uniwersalnych rozwiązań terapeutycznych dla szerokiego spektrum chorób neurodegeneracyjnych związanych z ekspansją powtórzeń CAG.

## VI Wnioski

Celem niniejszej pracy było przezwyciężenie ograniczeń cząsteczki amiR136-A2, a w szczególności zwiększenie jej bezpieczeństwa przy jednoczesnym zachowaniu efektywności i allelo-selektywności, poprzez wprowadzenie dodatkowych substytucji nukleotydowych w sekwencji nici wiodącej.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Wprowadzenie dodatkowych substytucji nukleotydowych (niesparowań) w pozycjach 9, 11 oraz 13 sekwencji nici wiodącej A2 poskutkowało zredukowaniem liczby potencjalnych sekwencji poza celem w ludzkim transkrytomie, przy jednoczesnym zachowaniu albo zwiększeniu efektywności działania cząsteczek.
2. Efektywność amiRNA była zależna od modelu komórkowego i choroby poliQ, co wskazuje na konieczność indywidualnej selekcji terapeutycznego wariantu amiRNA w zależności od konkretnej jednostki chorobowej.
3. Spośród wszystkich badanych wariantów, cząsteczka amiR136-13A (substytucja C>A w pozycji 13) okazała się najkorzystniejszym kandydatem – wykazywała najwyższą efektywność wyciszania ekspresji *mHTT* i najniższy potencjał off-target.
4. Zastosowanie amiR136-13A w badaniach *in vivo* pozwoliło na zredukowanie dawki wektora o połowę w porównaniu do amiR136-A2, z zachowaniem podobnej efektywności w prążkowie i hipokampie oraz większej efektywności w korze mózgu.
5. Profil obróbki komórkowej amiR136-13A okazał się korzystny: dominująco uwalniana była nić wiodąca, odnotowano wysoką homogenność końca 5' *in vivo*, nie obserwowano nadmiernego udziału nici pasażerskiej ani zakłócenia szlaku endogennych miRNA.
6. Zastosowanie amiR136-13A nie wywołało istotnych efektów ubocznych ani objawów toksyczności w badanym modelu komórkowym i *in vivo*, co potwierdza jej wysokie bezpieczeństwo.
7. amiR136-13A redukuje poziom zmutowanej huntingtyny o pełnej długości, ale także efektywnie obniża poziom krótkiego, toksycznego białka HTT1a.
8. amiR136-13A jest obiecującym kandydatem do dalszych badań nad jego potencjalnym zastosowaniem w terapii HD.

## VII Bibliografia

1. McLoughlin,H.S., Moore,L.R. and Paulson,H.L. (2020) Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiol. Dis.*, **134**, 104635.
2. Huntington,G. (2003) On chorea. George Huntington, M.D. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, **15**, 109–112.
3. Saudou,F. and Humbert,S. (2016) The Biology of Huntingtin. *Neuron*, **89**, 910–926.
4. Quarrell,O.W., Nance,M.A., Nopoulos,P., Paulsen,J.S., Smith,J.A. and Squitieri,F. (2013) Managing Juvenile Huntington’s Disease. *Neurodegener. Dis. Manag.*, **3**, 267–276.
5. Ranen,N.G., Stine,O.C., Abbott,M.H., Sherr,M., Codori,A.-M., Franz,M.L., Chao,N.I., Chung,A.S., Pleasant,N., Callahan,C., *et al.* (1995) Anticipation and Instability of IT-15 (CAG)N Repeats in Parent-Offspring Pairs with Huntington Disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **57**, 593–602.
6. Bates,G.P., Dorsey,R., Gusella,J.F., Hayden,M.R., Kay,C., Leavitt,B.R., Nance,M., Ross,C.A., Scahill,R.I., Wetzel,R., *et al.* (2015) Huntington disease. *Nat. Rev. Dis. Primer*, **1**, 15005.
7. A. Rikani,A., Choudhry,Z., Choudhry,A.M., Rizvi,N., Ikram,H. and Mobassarh,N.J. (2014) The mechanism of degeneration of striatal neuronal subtypes in Huntington disease. *Ann. Neurosci.*, **21**.
8. Rüb,U., Seidel,K., Heinsen,H., Vonsattel,J.P., Den Dunnen,W.F. and Korf,H.W. (2016) Huntington’s disease ( HD ): the neuropathology of a multisystem neurodegenerative disorder of the human brain. *Brain Pathol.*, **26**, 726–740.
9. Ross,C.A. and Tabrizi,S.J. (2011) Huntington’s disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.*, **10**, 83–98.
10. Medina,A., Mahjoub,Y., Shaver,L. and Pringsheim,T. (2022) Prevalence and Incidence of Huntington’s Disease: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Mov. Disord.*, **37**, 2327–2335.
11. Caron,N.S., Wright,G.E. and Hayden,M.R. (1993) Huntington Disease. In Adam,M.P., Feldman,J., Mirzaa,G.M., Pagon,R.A., Wallace,S.E., Amemiya,A. (eds), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
12. Bates,G., Tabrizi,S. and Jones,L. (2014) Huntington’s Disease Oxford University Press.
13. Kinnunen,K.M., Schwarz,A.J., Turner,E.C., Pustina,D., Gantman,E.C., Gordon,M.F., Joules,R., Mullin,A.P., Scahill,R.I., Georgiou-Karistianis,N., *et al.* (2021) Volumetric MRI-Based Biomarkers in Huntington’s Disease: An Evidentiary Review. *Front. Neurol.*, **12**.
14. Pascu,A.M., Ifteni,P., Teodorescu,A., Burtea,V. and Correll,C.U. (2015) Delayed identification and diagnosis of Huntington’s disease due to psychiatric symptoms. *Int. J. Ment. Health Syst.*, **9**, 33.
15. MacDonald,M.E., Ambrose,C.M., Duyao,M.P., Myers,R.H., Lin,C., Srinidhi,L., Barnes,G., Taylor,S.A., James,M., Groot,N., *et al.* (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington’s disease chromosomes. *Cell*, **72**, 971–983.
16. Marques Sousa,C. and Humbert,S. (2013) Huntingtin: Here, There, Everywhere! *J. Huntingt. Dis.*, **2**, 395–403.

17. Howells,D.W., Porritt,M.J., Wong,J.Y.F., Batchelor,P.E., Kalnins,R., Hughes,A.J. and Donnan,G.A. (2000) Reduced BDNF mRNA Expression in the Parkinson's Disease Substantia Nigra. *Exp. Neurol.*, **166**, 127–135.
18. Caviston,J.P., Ross,J.L., Antony,S.M., Tokito,M. and Holzbaur,E.L.F. (2007) Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 10045–10050.
19. Valor,L.M. (2015) Transcription, Epigenetics and Ameliorative Strategies in Huntington's Disease: a Genome-Wide Perspective. *Mol. Neurobiol.*, **51**, 406–423.
20. Ochaba,J., Lukacsovich,T., Csikos,G., Zheng,S., Margulis,J., Salazar,L., Mao,K., Lau,A.L., Yeung,S.Y., Humbert,S., *et al.* (2014) Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111**, 16889–16894.
21. Duyao,M.P., Auerbach,A.B., Ryan,A., Persichetti,F., Barnes,G.T., McNeil,S.M., Ge,P., Vonsattel,J.-P., Gusella,J.F., Joyner,A.L., *et al.* (1995) Inactivation of the Mouse Huntington's Disease Gene Homolog *Hdh*. *Science*, **269**, 407–410.
22. Dietrich,P., Johnson,I.M., Alli,S. and Dragatsis,I. (2017) Elimination of huntingtin in the adult mouse leads to progressive behavioral deficits, bilateral thalamic calcification, and altered brain iron homeostasis. *PLOS Genet.*, **13**, e1006846.
23. Wang,G., Liu,X., Gaertig,M.A., Li,S. and Li,X.-J. (2016) Ablation of huntingtin in adult neurons is nondeleterious but its depletion in young mice causes acute pancreatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **113**, 3359–3364.
24. Cui,L., Jeong,H., Borovecki,F., Parkhurst,C.N., Tanese,N. and Krainc,D. (2006) Transcriptional Repression of PGC-1 $\alpha$  by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *Cell*, **127**, 59–69.
25. Massaad,C.A. and Klann,E. (2011) Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid. Redox Signal.*, **14**, 2013–2054.
26. Kumar,A. and Ratan,R.R. (2016) Oxidative Stress and Huntington's Disease: The Good, The Bad, and The Ugly. *J. Huntingt. Dis.*, **5**, 217–237.
27. Bono-Yagüe,J., Gómez-Escribano,A.P., Millán,J.M. and Vázquez-Manrique,R.P. (2020) Reactive Species in Huntington Disease: Are They Really the Radicals You Want to Catch? *Antioxidants*, **9**, 577.
28. Schaffar,G., Breuer,P., Boteva,R., Behrends,C., Tzvetkov,N., Strippel,N., Sakahira,H., Siegers,K., Hayer-Hartl,M. and Hartl,F.U. (2004) Cellular Toxicity of Polyglutamine Expansion Proteins: Mechanism of Transcription Factor Deactivation. *Mol. Cell*, **15**, 95–105.
29. Steffan,J.S., Bodai,L., Pallos,J., Poelman,M., McCampbell,A., Apostol,B.L., Kazantsev,A., Schmidt,E., Zhu,Y.Z., Greenwald,M., *et al.* (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*, **413**, 739–743.
30. Ly,S., Didiot,M.-C., Ferguson,C.M., Coles,A.H., Miller,R., Chase,K., Echeverria,D., Wang,F., Sadri-Vakili,G., Aronin,N., *et al.* (2022) Mutant huntingtin messenger RNA forms neuronal nuclear clusters in rodent and human brains. *Brain Commun.*, 10.1093/braincomms/fcac248.
31. Jain,A. and Vale,R.D. (2017) RNA phase transitions in repeat expansion disorders. *Nature*, **546**, 243–247.

32. Sathasivam,K., Neueder,A., Gipson,T.A., Landles,C., Benjamin,A.C., Bondulich,M.K., Smith,D.L., Faull,R.L.M., Roos,R.A.C., Howland,D., *et al.* (2013) Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**, 2366–2370.
33. Neueder,A., Dumas,A.A., Benjamin,A.C. and Bates,G.P. (2018) Regulatory mechanisms of incomplete huntingtin mRNA splicing. *Nat. Commun.*, **9**, 3955.
34. Fienko,S., Landles,C., Sathasivam,K., McAteer,S.J., Milton,R.E., Osborne,G.F., Smith,E.J., Jones,S.T., Bondulich,M.K., Danby,E.C.E., *et al.* (2022) Alternative processing of human *HTT* mRNA with implications for Huntington’s disease therapeutics. *Brain*, **145**, 4409–4424.
35. Non-ATG–initiated translation directed by microsatellite expansions 10.1073/pnas.1013343108.
36. Bañez-Coronel,M., Ayhan,F., Tarabochia,A.D., Zu,T., Perez,B.A., Tusi,S.K., Pletnikova,O., Borchelt,D.R., Ross,C.A., Margolis,R.L., *et al.* (2015) RAN Translation in Huntington Disease. *Neuron*, **88**, 667–677.
37. Green,K.M., Linsalata,A.E. and Todd,P.K. (2016) RAN translation—What makes it run? *Brain Res.*, **1647**, 30–42.
38. Yero,T. and Rey,J.A. Tetrabenazine (Xenazine), An FDA-Approved Treatment Option For Huntington’s Disease–Related Chorea.
39. Diana,P. Tetrabenazine in the treatment of Huntington’s disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*
40. Huntington Study Group, Frank,S., Testa,C.M., Stamler,D., Kayson,E., Davis,C., Edmondson,M.C., Kinell,S., Leavitt,B., Oakes,D., *et al.* (2016) Effect of Deutetabenazine on Chorea Among Patients With Huntington Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, **316**, 40.
41. Rodrigues,F.B., Duarte,G.S., Costa,J., Ferreira,J.J. and Wild,E.J. (2017) Tetrabenazine Versus Deutetabenazine for Huntington’s Disease: Twins or Distant Cousins? *Mov. Disord. Clin. Pract.*, **4**, 582–585.
42. Richard,A. and Frank,S. (2019) Deutetabenazine in the Treatment of Huntington’s Disease. *Neurodegener. Dis. Manag.*, **9**, 31–37.
43. Feleus,S., Van Schaijk,M., Roos,R. and De Bot,S. (2022) The Many Faces of Huntington’s Chorea Treatment: The Impact of Sudden Withdrawal of Tiaipride after 40 Years of Use and a Systematic Review. *J. Pers. Med.*, **12**, 589.
44. Saft,C., Burgunder,J.-M., Dose,M., Jung,H.H., Katzenschlager,R., Priller,J., Nguyen,H.P., Reetz,K., Reilmann,R., Seppi,K., *et al.* (2023) Symptomatic treatment options for Huntington’s disease (guidelines of the German Neurological Society). *Neurol. Res. Pract.*, **5**, 61.
45. Wightman,B., Ha,I. and Ruvkun,G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, **75**, 855–862.
46. Lee,R.C., Feinbaum,R.L. and Ambros,V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843–854.
47. Kotowska-Zimmer,A., Pewinska,M. and Olejniczak,M. (2021) Artificial miRNAs as therapeutic tools: Challenges and opportunities. *WIREs RNA*, **12**, e1640.
48. Setten,R.L., Rossi,J.J. and Han,S. (2019) The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **18**, 421–446.

49. O'Brien,J., Hayder,H., Zayed,Y. and Peng,C. (2018) Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.*, **9**, 402.
50. Bartel,D.P. (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, **116**, 281–297.
51. Bartel,D.P. (2018) Metazoan MicroRNAs. *Cell*, **173**, 20–51.
52. Chipman,L.B. and Pasquinelli,A.E. (2019) miRNA Targeting: Growing beyond the Seed. *Trends Genet.*, **35**, 215–222.
53. Juźwik,C.A., S. Drake,S., Zhang,Y., Paradis-Isler,N., Sylvester,A., Amar-Zifkin,A., Douglas,C., Morquette,B., Moore,C.S. and Fournier,A.E. (2019) microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. *Prog. Neurobiol.*, **182**, 101664.
54. Khan,S., Ayub,H., Khan,T. and Wahid,F. (2019) MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer. *Biochimie*, **167**, 12–24.
55. Tanzer,A. and Stadler,P.F. (2004) Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster. *J. Mol. Biol.*, **339**, 327–335.
56. Bofill-De Ros,X. and Vang Ørom,U.A. (2024) Recent progress in miRNA biogenesis and decay. *RNA Biol.*, **21**, 36–43.
57. Conrad,T., Marsico,A., Gehre,M. and Ørom,U.A. (2014) Microprocessor Activity Controls Differential miRNA Biogenesis In Vivo. *Cell Rep.*, **9**, 542–554.
58. Shang,R., Baek,S.C., Kim,K., Kim,B., Kim,V.N. and Lai,E.C. (2020) Genomic Clustering Facilitates Nuclear Processing of Suboptimal Pri-miRNA Loci. *Mol. Cell*, **78**, 303-316.e4.
59. Lund,E., Güttinger,S., Calado,A., Dahlberg,J.E. and Kutay,U. (2004) Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*, **303**, 95–98.
60. Yi,R., Qin,Y., Macara,I.G. and Cullen,B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.*, **17**, 3011–3016.
61. Wang,J., Lee,J.E., Riemony,K., Yu,Y., Marquez,S.M., Lai,E.C. and Yi,R. (2020) XPO5 promotes primary miRNA processing independently of RanGTP. *Nat. Commun.*, **11**, 1845.
62. Fareh,M., Yeom,K.-H., Haagsma,A.C., Chauhan,S., Heo,I. and Joo,C. (2016) TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments. *Nat. Commun.*, **7**, 13694.
63. Lee,Y., Hur,I., Kim,Y.-K., Suh,M.R. and Kim,V.N. The role of PACT in the RNA silencing pathway.
64. Meijer,H.A., Smith,E.M. and Bushell,M. (2014) Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem. Soc. Trans.*, **42**, 1135–1140.
65. Braun,J.E., Truffault,V., Boland,A., Huntzinger,E., Chang,C.-T., Haas,G., Weichenrieder,O., Coles,M. and Izaurralde,E. (2012) A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1324–1331.
66. Cheloufi,S., Dos Santos,C.O., Chong,M.M.W. and Hannon,G.J. (2010) A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, **465**, 584–589.
67. Stavast,C.J. and Erkeland,S.J. (2019) The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells*, **8**, 1465.

68. Ma,M., Li,J., Zhang,Z., Sun,J., Liu,Z., Zeng,Z., Ouyang,S. and Kang,W. (2022) The Role and Mechanism of microRNA-1224 in Human Cancer. *Front. Oncol.*, **12**, 858892.
69. Xie,M., Li,M., Vilborg,A., Lee,N., Shu,M.-D., Yartseva,V., Šestan,N. and Steitz,J.A. (2013) Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell*, **155**, 1568–1580.
70. Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K. and Tuschl,T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494–498.
71. Pushparaj,P.N., Aarthi,J.J., Manikandan,J. and Kumar,S.D. (2008) siRNA, miRNA, and shRNA: *in vivo* Applications. *J. Dent. Res.*, **87**, 992–1003.
72. Zhang,J., Chen,B., Gan,C., Sun,H., Zhang,J. and Feng,L. (2023) A Comprehensive Review of Small Interfering RNAs (siRNAs): Mechanism, Therapeutic Targets, and Delivery Strategies for Cancer Therapy. *Int. J. Nanomedicine*, **18**, 7605–7635.
73. Lam,J.K.W., Chow,M.Y.T., Zhang,Y. and Leung,S.W.S. (2015) siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, **4**, e252.
74. Marques,J.T. and Williams,B.R.G. (2005) Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1399–1405.
75. Hu,B., Zhong,L., Weng,Y., Peng,L., Huang,Y., Zhao,Y. and Liang,X.-J. (2020) Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **5**, 101.
76. Paddison,P.J., Caudy,A.A., Bernstein,E., Hannon,G.J. and Conklin,D.S. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.*, **16**, 948–958.
77. Martin,J.N., Wolken,N., Brown,T., Dauer,W.T., Ehrlich,M.E. and Gonzalez-Alegre,P. (2011) Lethal toxicity caused by expression of shRNA in the mouse striatum: implications for therapeutic design. *Gene Ther.*, **18**, 666–673.
78. Kotowska-Zimmer,A., Przybyl,L., Pewinska,M., Suszynska-Zajczyk,J., Wronka,D., Figiel,M. and Olejniczak,M. (2022) A CAG repeat-targeting artificial miRNA lowers the mutant huntingtin level in the YAC128 model of Huntington's disease. *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, **28**, 702–715.
79. McBride,J.L., Boudreau,R.L., Harper,S.Q., Staber,P.D., Monteys,A.M., Martins,I., Gilmore,B.L., Burstein,H., Peluso,R.W., Polisky,B., *et al.* (2008) Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **105**, 5868–5873.
80. Snøve,O. and Rossi,J.J. (2006) Toxicity in mice expressing short hairpin RNAs gives new insight into RNAi. *Genome Biol.*, **7**, 231.
81. Grimm,D. (2011) The dose can make the poison: lessons learned from adverse *in vivo* toxicities caused by RNAi overexpression. *Silence*, **2**, 8.
82. Niewiadomska-Cimicka,A., Fievet,L., Surdyka,M., Jesion,E., Keime,C., Singer,E., Eisenmann,A., Kalinowska-Poska,Z., Nguyen,H.H.P., Fiszer,A., *et al.* (2024) AAV-Mediated CAG-Targeting Selectively Reduces Polyglutamine-Expanded Protein and Attenuates Disease Phenotypes in a Spinocerebellar Ataxia Mouse Model. *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 4354.
83. Van Gestel,M.A., Van Erp,S., Sanders,L.E., Brans,M.A.D., Lujendijk,M.C.M., Merkestein,M., Pasterkamp,R.J. and Adan,R.A.H. (2014) shRNA-induced saturation of the microRNA pathway in the rat brain. *Gene Ther.*, **21**, 205–211.



84. Corydon, I.J., Fabian-Jessing, B.K., Jakobsen, T.S., Jørgensen, A.C., Jensen, E.G., Askou, A.L., Aagaard, L. and Corydon, T.J. (2023) 25 years of maturation: A systematic review of RNAi in the clinic. *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, **33**, 469–482.
85. Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N. and Weigel, D. (2006) Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18**, 1121–1133.
86. Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M.-O., Trono, D. and Aebischer, P. (2006) A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat. Methods*, **3**, 109–116.
87. McBride, J.L., Pitzer, M.R., Boudreau, R.L., Dufour, B., Hobbs, T., Ojeda, S.R. and Davidson, B.L. (2011) Preclinical Safety of RNAi-Mediated HTT Suppression in the Rhesus Macaque as a Potential Therapy for Huntington's Disease. *Mol. Ther.*, **19**, 2152–2162.
88. Boudreau, R.L., Martins, I. and Davidson, B.L. (2009) Artificial MicroRNAs as siRNA Shuttles: Improved Safety as Compared to shRNAs In vitro and In vivo. *Mol. Ther.*, **17**, 169–175.
89. Boudreau, R.L., Monteys, A.M. and Davidson, B.L. (2008) Minimizing variables among hairpin-based RNAi vectors reveals the potency of shRNAs. *RNA*, **14**, 1834–1844.
90. Medley, J.C., Panzade, G. and Zinovyeva, A.Y. (2021) microRNA strand selection: Unwinding the rules. *WIREs RNA*, **12**, e1627.
91. Rice, G.M., Shivashankar, V., Ma, E.J., Baryza, J.L. and Nutiu, R. (2020) Functional Atlas of Primary miRNA Maturation by the Microprocessor. *Mol. Cell*, **80**, 892-902.e4.
92. Siegfried, N.A., Busan, S., Rice, G.M., Nelson, J.A.E. and Weeks, K.M. (2014) RNA motif discovery by SHAPE and mutational profiling (SHAPE-MaP). *Nat. Methods*, **11**, 959–965.
93. Zhou, K., Han, J., Wang, Y., Zhang, Y. and Zhu, C. (2022) Routes of administration for adeno-associated viruses carrying gene therapies for brain diseases. *Front. Mol. Neurosci.*, **15**, 988914.
94. Lundstrom, K. (2020) Viral Vectors Applied for RNAi-Based Antiviral Therapy. *Viruses*, **12**, 924.
95. Belhadj, Z., Qie, Y., Carney, R.P., Li, Y. and Nie, G. (2023) Current advances in non-viral gene delivery systems: Liposomes versus extracellular vesicles. *BMEMat*, **1**, e12018.
96. Tatiparti, K., Sau, S., Kashaw, S. and Iyer, A. (2017) siRNA Delivery Strategies: A Comprehensive Review of Recent Developments. *Nanomaterials*, **7**, 77.
97. Savenkova, D.A., Makarova, A.-L.A., Shalik, I.K. and Yudkin, D.V. (2022) miRNA Pathway Alteration in Response to Non-Coding RNA Delivery in Viral Vector-Based Gene Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 14954.
98. Berkner, K.L. (1988) Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *BioTechniques*, **6**, 616–629.
99. Chen, Q., Yu, T., Gong, J. and Shan, H. (2025) Advanced Nanomedicine Delivery Systems for Cardiovascular Diseases: Viral and Non-Viral Strategies in Targeted Therapy. *Molecules*, **30**, 962.
100. Schagen, F.H.E., Ossevoort, M., Toes, R.E.M. and Hoeben, R.C. (2004) Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **50**, 51–70.
101. Poletti, V. and Mavilio, F. (2021) Designing Lentiviral Vectors for Gene Therapy of Genetic Diseases. *Viruses*, **13**, 1526.

102. Milone, M.C. and O'Doherty, U. (2018) Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, **32**, 1529–1541.
103. Wang, J.-H., Gessler, D.J., Zhan, W., Gallagher, T.L. and Gao, G. (2024) Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **9**, 78.
104. Wang, D., Tai, P.W.L. and Gao, G. (2019) Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **18**, 358–378.
105. Sayed, N., Allawadhi, P., Khurana, A., Singh, V., Navik, U., Pasumarthi, S.K., Khurana, I., Banothu, A.K., Weiskirchen, R. and Bharani, K.K. (2022) Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sci.*, **294**, 120375.
106. Travessa, A.M., Rodrigues, F.B., Mestre, T.A. and Ferreira, J.J. (2017) Fifteen Years of Clinical Trials in Huntington's Disease: A Very Low Clinical Drug Development Success Rate. *J. Huntingt. Dis.*, **6**, 157–163.
107. Gao, L., Bhattacharyya, A., Beers, B., Kaushik, D., Bredlau, A.-L., Kristensen, A., Abd-Elaziz, K., Grant, R., Golden, L. and Kong, R. (2024) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of PTC518, an oral huntingtin lowering splicing modifier: A first-in-human study. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **90**, 3242–3251.
108. Dhuri, K., Bechtold, C., Quijano, E., Pham, H., Gupta, A., Vikram, A. and Bahal, R. (2020) Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *J. Clin. Med.*, **9**, 2004.
109. Datson, N.A., González-Barriga, A., Kourkouta, E., Weij, R., Van De Giessen, J., Mulders, S., Kontkanen, O., Heikkinen, T., Lehtimäki, K. and Van Deutekom, J.C.T. (2017) The expanded CAG repeat in the huntingtin gene as target for therapeutic RNA modulation throughout the HD mouse brain. *PLOS ONE*, **12**, e0171127.
110. Tabrizi, S.J., Leavitt, B.R., Landwehrmeyer, G.B., Wild, E.J., Saft, C., Barker, R.A., Blair, N.F., Craufurd, D., Priller, J., Rickards, H., *et al.* (2019) Targeting Huntingtin Expression in Patients with Huntington's Disease. *N. Engl. J. Med.*, **380**, 2307–2316.
111. Van De Roovaart, H.J., Nguyen, N. and Veenstra, T.D. (2023) Huntington's Disease Drug Development: A Phase 3 Pipeline Analysis. *Pharmaceuticals*, **16**, 1513.
112. Tominersen in Adults with Manifest Huntington's Disease (2023) *N Engl J Med*.
113. Iwamoto, N., Liu, Y., Frank-Kamenetsky, M., Maguire, A., Tseng, W.C., Taborn, K., Kothari, N., Akhtar, A., Bowman, K., Shelke, J.D., *et al.* (2024) Preclinical evaluation of stereopure antisense oligonucleotides for allele-selective lowering of mutant HTT. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **35**, 102246.
114. Farag, M., Tabrizi, S.J. and Wild, E.J. (2024) Huntington's Disease Clinical Trials Update: September 2024. *J. Huntingt. Dis.*, **13**, 409–418.
115. Pei, Z., Lin, L., Chen, X., Wu, T., Lin, L., Xu, P. and Meng, X. (2024) J001 Preliminary results from the first-in-human study of ER2001, an innovative treatment for Huntington's disease using in vivo self-assembled sirna. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **95**, A157–A158.
116. Zhang, L., Wu, T., Shan, Y., Li, G., Ni, X., Chen, X., Hu, X., Lin, L., Li, Y., Guan, Y., *et al.* (2021) Therapeutic reversal of Huntington's disease by *in vivo* self-assembled siRNAs. *Brain*, **144**, 3421–3435.
117. Pfister, E.L., DiNardo, N., Mondo, E., Borel, F., Conroy, F., Fraser, C., Gernoux, G., Han, X., Hu, D., Johnson, E., *et al.* (2018) Artificial miRNAs Reduce Human Mutant Huntingtin Throughout the Striatum in a Transgenic Sheep Model of Huntington's Disease. *Hum. Gene Ther.*, **29**, 663–673.

118. Pietersz,K.L., Martier,R.M., Baatje,M.S., Liefhebber,J.M., Brouwers,C.C., Pouw,S.M., Fokkert,L., Lubelski,J., Petry,H., Martens,G.J.M., *et al.* (2021) Transduction patterns in the CNS following various routes of AAV-5-mediated gene delivery. *Gene Ther.*, **28**, 435–446.
119. Bhattacharyya,A., Trotta,C.R., Narasimhan,J., Wiedinger,K.J., Li,W., Effenberger,K.A., Woll,M.G., Jani,M.B., Risher,N., Yeh,S., *et al.* (2021) Small molecule splicing modifiers with systemic HTT-lowering activity. *Nat. Commun.*, **12**, 7299.
120. Bartoszewski,R. and Sikorski,A.F. (2019) Editorial focus: understanding off-target effects as the key to successful RNAi therapy. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **24**, 69.
121. Jackson,A.L., Bartz,S.R., Schelter,J., Kobayashi,S.V., Burchard,J., Mao,M., Li,B., Cavet,G. and Linsley,P.S. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 635–637.
122. Birmingham,A., Anderson,E., Sullivan,K., Reynolds,A., Boese,Q., Leake,D., Karpilow,J. and Khvorova,A. (2007) A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. *Nat. Protoc.*, **2**, 2068–2078.
123. Jackson,A.L. and Linsley,P.S. (2010) Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 57–67.
124. Rao,D.D., Vorhies,J.S., Senzer,N. and Nemunaitis,J. (2009) siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 746–759.
125. Caffrey,D.R., Zhao,J., Song,Z., Schaffer,M.E., Haney,S.A., Subramanian,R.R., Seymour,A.B. and Hughes,J.D. (2011) siRNA Off-Target Effects Can Be Reduced at Concentrations That Match Their Individual Potency. *PLoS ONE*, **6**, e21503.
126. Jackson,A.L., Burchard,J., Leake,D., Reynolds,A., Schelter,J., Guo,J., Johnson,J.M., Lim,L., Karpilow,J., Nichols,K., *et al.* (2006) Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “off-target” transcript silencing. *RNA*, **12**, 1197–1205.
127. Hannus,M., Beitzinger,M., Engelmann,J.C., Weickert,M.-T., Spang,R., Hannus,S. and Meister,G. (2014) siPools: highly complex but accurately defined siRNA pools eliminate off-target effects. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8049–8061.
128. Neumeier,J. and Meister,G. (2021) siRNA Specificity: RNAi Mechanisms and Strategies to Reduce Off-Target Effects. *Front. Plant Sci.*, **11**, 526455.
129. Yuan,Z., Wu,X., Liu,C., Xu,G. and Wu,Z. (2012) Asymmetric siRNA: New Strategy to Improve Specificity and Reduce Off-Target Gene Expression. *Hum. Gene Ther.*, **23**, 521–532.
130. Lisowiec-Wąchnicka,J., Bartyś,N. and Pasternak,A. (2019) A systematic study on the influence of thermodynamic asymmetry of 5'-ends of siRNA duplexes in relation to their silencing potency. *Sci. Rep.*, **9**, 2477.
131. Garriga-Canut,M., Agustín-Pavón,C., Herrmann,F., Sánchez,A., Dierssen,M., Fillat,C. and Isalan,M. (2012) Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, E3136–3145.
132. Mittelman,D., Moye,C., Morton,J., Sykoudis,K., Lin,Y., Carroll,D. and Wilson,J.H. (2009) Zinc-finger directed double-strand breaks within CAG repeat tracts promote repeat instability in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 9607–9612.

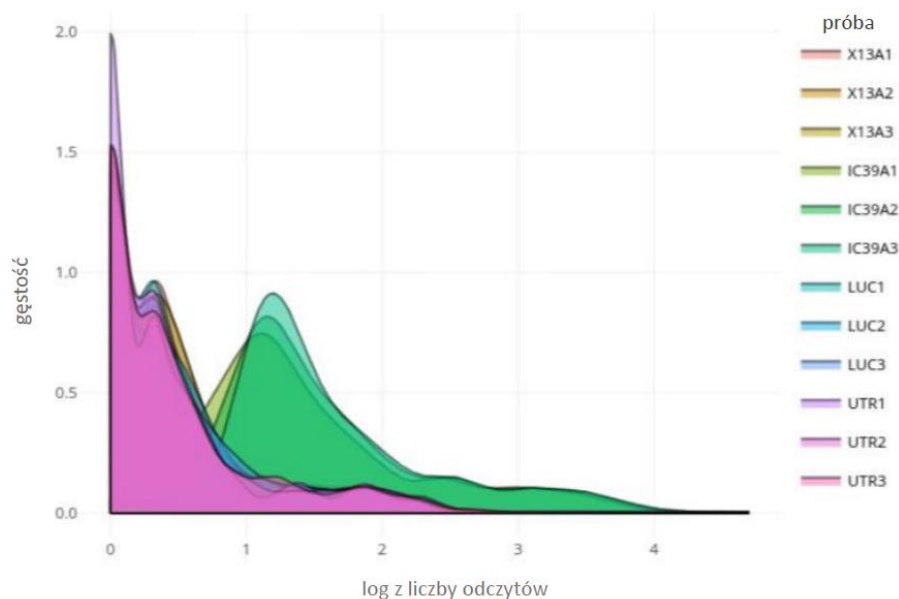
133. Batra,R., Nelles,D.A., Pirie,E., Blue,S.M., Marina,R.J., Wang,H., Chaim,I.A., Thomas,J.D., Zhang,N., Nguyen,V., *et al.* (2017) Elimination of Toxic Microsatellite Repeat Expansion RNA by RNA-Targeting Cas9. *Cell*, **170**, 899-912.e10.
134. Oura,S., Noda,T., Morimura,N., Hitoshi,S., Nishimasu,H., Nagai,Y., Nureki,O. and Ikawa,M. (2021) Precise CAG repeat contraction in a Huntington's Disease mouse model is enabled by gene editing with SpCas9-NG. *Commun. Biol.*, **4**, 1–13.
135. Dabrowska,M., Juzwa,W., Krzyzosiak,W.J. and Olejniczak,M. (2018) Precise Excision of the CAG Tract from the Huntingtin Gene by Cas9 Nickases. *Front. Neurosci.*, **12**, 75.
136. Morelli,K.H., Wu,Q., Gosztyla,M.L., Liu,H., Yao,M., Zhang,C., Chen,J., Marina,R.J., Lee,K., Jones,K.L., *et al.* (2023) An RNA-targeting CRISPR–Cas13d system alleviates disease-related phenotypes in Huntington's disease models. *Nat. Neurosci.*, **26**, 27–38.
137. Poggi,L., Emmenegger,L., Descorps-Declère,S., Dumas,B. and Richard,G.-F. (2021) Differential efficacies of Cas nucleases on microsatellites involved in human disorders and associated off-target mutations. *Nucleic Acids Res.*, **49**, 8120–8134.
138. Nakamori,M., Panigrahi,G.B., Lanni,S., Gall-Duncan,T., Hayakawa,H., Tanaka,H., Luo,J., Otabe,T., Li,J., Sakata,A., *et al.* (2020) Slipped-CAG DNA binding small molecule induces trinucleotide repeat contractions in vivo. *Nat. Genet.*, **52**, 146–159.
139. Matthes,F., Massari,S., Bochicchio,A., Schorpp,K., Schilling,J., Weber,S., Offermann,N., Desantis,J., Wanker,E., Carloni,P., *et al.* (2018) Reducing Mutant Huntingtin Protein Expression in Living Cells by a Newly Identified RNA CAG Binder. *ACS Chem. Neurosci.*, **9**, 1399–1408.
140. Ikenoshita,S., Matsuo,K., Yabuki,Y., Kawakubo,K., Asamitsu,S., Hori,K., Usuki,S., Hirose,Y., Bando,T., Araki,K., *et al.* A cyclic pyrrole-imidazole polyamide reduces pathogenic RNA in CAG/CTG triplet repeat neurological disease models. *J. Clin. Invest.*, **133**, e164792.
141. Kotowska-Zimmer,A., Ostrovska,Y. and Olejniczak,M. (2020) Universal RNAi Triggers for the Specific Inhibition of Mutant Huntingtin, Atrophin-1, Ataxin-3, and Ataxin-7 Expression. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **19**, 562–571.
142. Dabrowska,M., Ciolak,A., Kozłowska,E., Fiszer,A. and Olejniczak,M. (2020) Generation of New Isogenic Models of Huntington's Disease Using CRISPR-Cas9 Technology. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1854.
143. Slow,E.J. (2003) Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 1555–1567.
144. Pouladi,M.A., Stanek,L.M., Xie,Y., Franciosi,S., Southwell,A.L., Deng,Y., Butland,S., Zhang,W., Cheng,S.H., Shihabuddin,L.S., *et al.* (2012) Marked differences in neurochemistry and aggregates despite similar behavioural and neuropathological features of Huntington disease in the full-length BACHD and YAC128 mice. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 2219–2232.
145. Van Raamsdonk,J.M., Murphy,Z., Slow,E.J., Leavitt,B.R. and Hayden,M.R. (2005) Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 3823–3835.
146. Tachikawa,M., Nagai,Y., Nakamura,K., Kobayashi,K., Fujiwara,T., Han,H.-J., Nakabayashi,Y., Ichikawa,Y., Goto,J., Kanazawa,I., *et al.* (2002) Identification of CAG repeat-containing genes expressed in human brain as candidate genes for autosomal dominant spinocerebellar ataxias and other neurodegenerative diseases. *J. Hum. Genet.*, **47**, 275–278.

147. Kim,H., Kim,J., Kim,K., Chang,H., You,K. and Kim,V.N. (2019) Bias-minimized quantification of microRNA reveals widespread alternative processing and 3' end modification. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 2630–2640.
148. Van Raamsdonk,J.M., Gibson,W.T., Pearson,J., Murphy,Z., Lu,G., Leavitt,B.R. and Hayden,M.R. (2006) Body weight is modulated by levels of full-length Huntingtin. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 1513–1523.
149. You,H., Wu,T., Du,G., Huang,Y., Zeng,Y., Lin,L., Chen,D., Wu,C., Li,X., Burgunder,J., *et al.* (2021) Evaluation of Blood Glial Fibrillary Acidic Protein as a Potential Marker in Huntington's Disease. *Front. Neurol.*, **12**, 779890.
150. Tan,A.Y.S., Tippet,L.J., Turner,C.P., Swanson,M.E.V., Park,T.I.H., Curtis,M.A., Faull,R.L.M., Dragunow,M. and Singh-Bains,M.K. (2024) Microglial proliferation and astrocytic protein alterations in the human Huntington's disease cortex. *Neurobiol. Dis.*, **198**, 106554.
151. Chiang,H.R., Schoenfeld,L.W., Ruby,J.G., Auyeung,V.C., Spies,N., Baek,D., Johnston,W.K., Russ,C., Luo,S., Babiarz,J.E., *et al.* (2010) Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev.*, **24**, 992–1009.
152. Tan,G.C., Chan,E., Molnar,A., Sarkar,R., Alexieva,D., Isa,I.M., Robinson,S., Zhang,S., Ellis,P., Langford,C.F., *et al.* (2014) 5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 9424–9435.
153. Kilikevicius,A., Meister,G. and Corey,D.R. (2022) Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing. *Nucleic Acids Res.*, **50**, 617–634.
154. Ertl,H.C.J. (2022) Immunogenicity and toxicity of AAV gene therapy. *Front. Immunol.*, **13**, 975803.
155. Ronzitti,G., Gross,D.-A. and Mingozzi,F. (2020) Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Front. Immunol.*, **11**, 670.
156. Arjomandnejad,M., Dasgupta,I., Flotte,T.R. and Keeler,A.M. (2023) Immunogenicity of Recombinant Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors for Gene Transfer. *BioDrugs*, **37**, 311–329.
157. Gagnon,K.T., Pendergraft,H.M., Deleavey,G.F., Swayze,E.E., Potier,P., Randolph,J., Roesch,E.B., Chattopadhyaya,J., Damha,M.J., Bennett,C.F., *et al.* (2010) Allele-Selective Inhibition of Mutant *Huntingtin* Expression with Antisense Oligonucleotides Targeting the Expanded CAG Repeat. *Biochemistry*, **49**, 10166–10178.
158. Hu,J., Liu,J., Yu,D., Chu,Y. and Corey,D.R. (2012) Mechanism of allele-selective inhibition of huntingtin expression by duplex RNAs that target CAG repeats: function through the RNAi pathway. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11270–11280.
159. Parasrampur,M.A., White,A.A., Chilamkurthy,R., Pater,A.A., El-Azzouzi,F., Ovington,K.N., Jensik,P.J. and Gagnon,K.T. (2024) Sequencing-guided design of genetically encoded small RNAs targeting CAG repeats for selective inhibition of mutant huntingtin. *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, **35**, 102206.
160. Miniarikova,J., Zanella,I., Huseinovic,A., Van Der Zon,T., Hanemaaijer,E., Martier,R., Koornneef,A., Southwell,A.L., Hayden,M.R., Van Deventer,S.J., *et al.* (2016) Design, Characterization, and Lead Selection of Therapeutic miRNAs Targeting Huntingtin for Development of Gene Therapy for Huntington's Disease. *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, **5**, e297.

161. Surdyka,M., Kalinowska-Pońska,Ż., Niewiadomska-Cimicka,A., Jesion,E., Fiszer,A., Singer-Mikosch,E., Fievet,L., Przybyl,L., Caron,N.S., Hayden,M.R., *et al.* (2025) CAG-targeted brain-permeable therapy tested in biallelic humanized polyQ mouse models. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **36**, 102496.
162. Pfister,E.L., Kennington,L., Straubhaar,J., Wagh,S., Liu,W., DiFiglia,M., Landwehrmeyer,B., Vonsattel,J.-P., Zamore,P.D. and Aronin,N. (2009) Five siRNAs Targeting Three SNPs May Provide Therapy for Three-Quarters of Huntington's Disease Patients. *Curr. Biol.*, **19**, 774–778.
163. Swami,M., Hendricks,A.E., Gillis,T., Massood,T., Mysore,J., Myers,R.H. and Wheeler,V.C. (2009) Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 3039–3047.
164. Aldous,S.G. A CAG repeat threshold for therapeutics targeting somatic instability in Huntington's disease.
165. Meng,Z. and Lu,M. (2017) RNA Interference-Induced Innate Immunity, Off-Target Effect, or Immune Adjuvant? *Front. Immunol.*, **8**.
166. Stanek,L.M., Sardi,S.P., Mastis,B., Richards,A.R., Treleaven,C.M., Taksir,T., Misra,K., Cheng,S.H. and Shihabuddin,L.S. (2014) Silencing Mutant Huntingtin by Adeno-Associated Virus-Mediated RNA Interference Ameliorates Disease Manifestations in the YAC128 Mouse Model of Huntington's Disease. *Hum. Gene Ther.*, **25**, 461–474.
167. Miniarikova,J., Zimmer,V., Martier,R., Brouwers,C.C., Pythoud,C., Richetin,K., Rey,M., Lubelski,J., Evers,M.M., Van Deventer,S.J., *et al.* (2017) AAV5-miHTT gene therapy demonstrates suppression of mutant huntingtin aggregation and neuronal dysfunction in a rat model of Huntington's disease. *Gene Ther.*, **24**, 630–639.
168. Byrne,L.M., Rodrigues,F.B., Johnson,E.B., Wijeratne,P.A., De Vita,E., Alexander,D.C., Palermo,G., Czech,C., Schobel,S., Scahill,R.I., *et al.* (2018) Evaluation of mutant huntingtin and neurofilament proteins as potential markers in Huntington's disease. *Sci. Transl. Med.*, **10**, eaat7108.
169. Byrne,L.M., Rodrigues,F.B., Blennow,K., Durr,A., Leavitt,B.R., Roos,R.A.C., Scahill,R.I., Tabrizi,S.J., Zetterberg,H., Langbehn,D., *et al.* (2017) Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis. *Lancet Neurol.*, **16**, 601–609.
170. Bondulich,M.K., Phillips,J., Cañibano-Pico,M., Nita,I.M., Byrne,L.M., Wild,E.J. and Bates,G.P. (2023) Translatable plasma and CSF biomarkers for use in mouse models of Huntington's disease. *Brain Commun.*, **6**, fcae030.
171. Caron,N.S., Byrne,L.M., Lemarié,F.L., Bone,J.N., Aly,A.E.-E., Ko,S., Anderson,C., Casal,L.L., Hill,A.M., Hawellek,D.J., *et al.* (2024) Elevated plasma and CSF neurofilament light chain concentrations are stabilized in response to mutant huntingtin lowering in the brains of Huntington's disease mice. *Transl. Neurodegener.*, **13**, 50.
172. Slezak-Prochazka,I., Durmus,S., Kroesen,B.-J. and van den Berg,A. (2010) MicroRNAs, macrocontrol: Regulation of miRNA processing. *RNA*, **16**, 1087–1095.
173. Chen,S.K. Efficacy and safety of a SOD1-targeting artificial miRNA delivered by AAV9 in mice are impacted by miRNA scaffold selection. *Mol. Ther.*
174. Fan,S., Tang,K., Chen,J., Sun,M. and Chen,Q. (2024) Overexpanded CAG repeats in ATN1 cause an Early-Onset Case of Dentatorubral-Pallidoluysian atrophy with novel phenotypes and a literature Review of Chinese patients. *Gene*, **931**, 148881.

175. Joachimiak,P., Ciesiołka,A., Kozłowska,E., Świtoński,P.M., Figura,G., Ciołek,A., Adamek,G., Surdyka,M., Kalinowska-Pońska,Ż., Figiel,M., *et al.* (2023) Allele-specific quantitation of ATXN3 and HTT transcripts in polyQ disease models. *BMC Biol.*, **21**, 17.
176. Ciesiolka,A., Stroynowska-Czerwinska,A., Joachimiak,P., Ciolak,A., Kozłowska,E., Michalak,M., Dabrowska,M., Olejniczak,M., Raczynska,K.D., Zielinska,D., *et al.* (2021) Artificial miRNAs targeting CAG repeat expansion in ORFs cause rapid deadenylation and translation inhibition of mutant transcripts. *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 1577–1596.
177. Mingozzi,F. and High,K.A. (2011) Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.*, **12**, 341–355.
178. Huang,Q., Chan,K.Y., Tobey,I.G., Chan,Y.A., Poterba,T., Boutros,C.L., Balazs,A.B., Daneman,R., Bloom,J.M., Seed,C., *et al.* (2019) Delivering genes across the blood-brain barrier: LY6A, a novel cellular receptor for AAV-PHP.B capsids. *PLOS ONE*, **14**, e0225206.
179. Hordeaux,J., Wang,Q., Katz,N., Buza,E.L., Bell,P. and Wilson,J.M. (2018) The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. *Mol. Ther.*, **26**, 664–668.
180. Rufino-Ramos,D., Albuquerque,P.R., Leandro,K., Carmona,V., Martins,I.M., Fernandes,R., Henriques,C., Lobo,D., Faro,R., Perfeito,R., *et al.* (2023) Extracellular vesicle-based delivery of silencing sequences for the treatment of Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Mol. Ther.*, **31**, 1275–1292.
181. Generation of Hairpin-Based RNAi Vectors for Biological and Therapeutic Application (2012) In *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 275–296.

## VIII Materiały suplementarne



**Rysunek S1.** Rozkład gęstości logarytmicznej liczby odczytów (ang. *logcount density plot*) dla poszczególnych prób.

Oś X pokazuje logarytmiczną liczbę odczytów, natomiast oś Y przedstawia gęstość rozkładu.

X13A – próby z NSC HD traktowanych amiR136-13A, IC39 – próby z NSC zdrowych, LUC – próby z NSC HD traktowanych amiR136-LUC (kontrola negatywna), UTR – próby z NSC HD nietraktowanych.

**Tabela S1.** Transkrypty o istotnej statystycznie różnicy w ekspresji w grupie amiR136-13A vs amiR136-LUC.

| Ensembl ID         | baseMean<br>amiR136-13A | baseMean<br>amiR136-LUC | baseMean   | log <sub>2</sub><br>Fold Change | lfcSE      | stat        | pvalue     | P <sub>adj</sub> | Symbol genu |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|------------|---------------------------------|------------|-------------|------------|------------------|-------------|
| ENSG00000259932.1  | 164,091746              | 277,942676              | 221,017211 | -0,75787944                     | 0,17541796 | -4,32042093 | 1,5573E-05 | 0,00760373       | -           |
| ENSG00000202515.1  | 293,883075              | 484,19833               | 389,040703 | -0,71952615                     | 0,16791583 | -4,28504064 | 1,8271E-05 | 0,00760373       | VTRNA1-3    |
| ENSG00000207008.1  | 289,271863              | 469,939362              | 379,605612 | -0,69692736                     | 0,15482478 | -4,50139421 | 6,7509E-06 | 0,00443353       | SNORA54     |
| ENSG00000120708.17 | 293,454477              | 456,977325              | 375,215901 | -0,64308241                     | 0,14058978 | -4,57417595 | 4,781E-06  | 0,00391116       | TGFB1       |
| ENSG00000198218.12 | 543,712889              | 836,048007              | 689,880448 | -0,6190472                      | 0,13014223 | -4,75669726 | 1,9679E-06 | 0,00241476       | QRICH1      |
| ENSG00000183598.4  | 3621,19261              | 5476,13826              | 4548,66544 | -0,59660081                     | 0,10710678 | -5,57014992 | 2,5452E-08 | 0,00025215       | H3C13       |
| ENSG00000004779.10 | 1954,47542              | 2905,74178              | 2430,1086  | -0,5716995                      | 0,12487109 | -4,57831742 | 4,6873E-06 | 0,00391116       | NDUFAB1     |
| ENSG00000028277.22 | 226,794024              | 336,628367              | 281,711195 | -0,56733917                     | 0,13348681 | -4,25015149 | 2,1363E-05 | 0,00794365       | POU2F2      |
| ENSG00000243449.8  | 240,330035              | 352,562572              | 296,446303 | -0,55332788                     | 0,13160576 | -4,20443513 | 2,6173E-05 | 0,00893997       | NICOL1      |
| ENSG00000179085.8  | 723,981161              | 1062,64144              | 893,311303 | -0,55260215                     | 0,12471895 | -4,43077922 | 9,3893E-06 | 0,00523711       | DPM3        |
| ENSG00000100285.10 | 202,239248              | 295,900238              | 249,069743 | -0,54934258                     | 0,1537666  | -3,57257422 | 0,00035349 | 0,04053894       | NEFH        |
| ENSG00000276966.3  | 40980,7194              | 59161,3333              | 50071,0263 | -0,52967597                     | 0,11352527 | -4,66570996 | 3,0755E-06 | 0,00290307       | H4C5        |
| ENSG00000283498.1  | 272,414784              | 392,72514               | 332,569962 | -0,52704666                     | 0,13761001 | -3,83000224 | 0,00012814 | 0,0253618        | MIR1244-2   |
| ENSG00000278463.2  | 10112,286               | 14557,8242              | 12335,0551 | -0,52558546                     | 0,09707963 | -5,41396225 | 6,1645E-08 | 0,00025215       | H2AC4       |
| ENSG00000196683.12 | 3160,19447              | 4546,24853              | 3853,2215  | -0,52421861                     | 0,12288704 | -4,26585756 | 1,9914E-05 | 0,00763624       | TOMM7       |
| ENSG00000204065.3  | 673,812095              | 969,435274              | 821,623684 | -0,52344999                     | 0,14281644 | -3,66519413 | 0,00024715 | 0,03425709       | TCEAL5      |



|                    |            |            |            |             |            |             |            |            |                 |
|--------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|-----------------|
| ENSG00000140319.11 | 6822,19195 | 9803,99428 | 8313,09311 | -0,5229786  | 0,09866827 | -5,30037246 | 1,1557E-07 | 0,00035453 | <i>SRP14</i>    |
| ENSG00000177700.6  | 1082,0149  | 1536,80442 | 1309,40966 | -0,50581111 | 0,1245603  | -4,06077299 | 4,8911E-05 | 0,01364047 | <i>POLR2L</i>   |
| ENSG00000160201.12 | 1105,58485 | 1566,68345 | 1336,13415 | -0,50212866 | 0,12939618 | -3,88055244 | 0,00010422 | 0,02282275 | <i>U2AF1</i>    |
| ENSG00000104979.9  | 1572,98895 | 2224,09115 | 1898,54005 | -0,4990135  | 0,11666227 | -4,27741967 | 1,8907E-05 | 0,00760373 | <i>C19orf53</i> |
| ENSG00000134809.9  | 702,871618 | 991,495027 | 847,183323 | -0,49536796 | 0,13151576 | -3,76660539 | 0,00016548 | 0,02896953 | <i>TIMM10</i>   |
| ENSG00000124172.10 | 6953,47267 | 9784,58875 | 8369,03071 | -0,49264443 | 0,11393282 | -4,32399035 | 1,5323E-05 | 0,00760373 | <i>ATP5F1E</i>  |
| ENSG00000155368.18 | 4042,98105 | 5672,40331 | 4857,69218 | -0,48834805 | 0,1085739  | -4,4978403  | 6,8647E-06 | 0,00443353 | <i>DBI</i>      |
| ENSG00000143977.14 | 3204,44347 | 4481,67752 | 3843,0605  | -0,48377415 | 0,11262399 | -4,29548059 | 1,7432E-05 | 0,00760373 | <i>SNRPG</i>    |
| ENSG00000130332.15 | 2320,07488 | 3244,26061 | 2782,16775 | -0,4833883  | 0,0989231  | -4,88650585 | 1,0264E-06 | 0,00209919 | <i>LSM7</i>     |
| ENSG00000103363.16 | 4316,55017 | 6024,16067 | 5170,35542 | -0,48060786 | 0,10805835 | -4,44766976 | 8,6807E-06 | 0,00507241 | <i>ELOB</i>     |
| ENSG00000197780.11 | 749,884043 | 1042,63804 | 896,261044 | -0,47470079 | 0,13277152 | -3,57532077 | 0,0003498  | 0,04049415 | <i>TAF13</i>    |
| ENSG00000181218.6  | 1275,18512 | 1772,67153 | 1523,92833 | -0,4746444  | 0,0978409  | -4,85118593 | 1,2273E-06 | 0,00215138 | <i>H2AC25</i>   |
| ENSG00000196787.5  | 19860,7584 | 27570,695  | 23715,7267 | -0,47315649 | 0,08650522 | -5,46968712 | 4,5083E-08 | 0,00025215 | <i>H2AC11</i>   |
| ENSG00000276368.2  | 12467,1536 | 17230,719  | 14848,9363 | -0,46675938 | 0,09753724 | -4,78544786 | 1,7061E-06 | 0,00241476 | <i>H2AC14</i>   |
| ENSG00000164713.10 | 1527,99243 | 2112,32072 | 1820,15658 | -0,46657661 | 0,09980114 | -4,6750629  | 2,9386E-06 | 0,00290307 | <i>BRI3</i>     |
| ENSG00000171530.15 | 7128,72242 | 9848,21495 | 8488,46868 | -0,46605798 | 0,10903508 | -4,27438577 | 1,9166E-05 | 0,00760373 | <i>TBCA</i>     |
| ENSG00000162385.11 | 1859,29432 | 2568,71939 | 2214,00686 | -0,46578716 | 0,12220505 | -3,81152122 | 0,00013811 | 0,02676562 | <i>MAGOH</i>    |
| ENSG00000170906.16 | 1695,69565 | 2336,22084 | 2015,95825 | -0,46157298 | 0,10303423 | -4,47980241 | 7,4712E-06 | 0,00458397 | <i>NDUFA3</i>   |
| ENSG00000189043.10 | 7982,44186 | 10935,1981 | 9458,81999 | -0,4539517  | 0,10948359 | -4,14629904 | 3,3789E-05 | 0,0103657  | <i>NDUFA4</i>   |
| ENSG00000150779.12 | 1498,54628 | 2048,34335 | 1773,44482 | -0,45070315 | 0,10545501 | -4,27389019 | 1,9209E-05 | 0,00760373 | <i>TIMM8B</i>   |
| ENSG00000279407.1  | 439,300718 | 600,365757 | 519,833237 | -0,45004149 | 0,12453307 | -3,61383129 | 0,00030171 | 0,03777783 | -               |
| ENSG00000182899.17 | 31642,6868 | 43202,9094 | 37422,7981 | -0,44921703 | 0,11125978 | -4,03755083 | 5,4012E-05 | 0,01440833 | <i>RPL35A</i>   |
| ENSG00000277157.2  | 27013,3064 | 36870,0145 | 31941,6604 | -0,4487317  | 0,09395013 | -4,77627523 | 1,7857E-06 | 0,00241476 | <i>H4C4</i>     |
| ENSG00000198618.5  | 1455,47957 | 1984,19162 | 1719,83559 | -0,44672441 | 0,12811081 | -3,48701558 | 0,00048844 | 0,04953457 | <i>PPIAP22</i>  |
| ENSG00000166562.10 | 1162,72755 | 1585,24465 | 1373,9861  | -0,44620545 | 0,12178629 | -3,66383972 | 0,00024846 | 0,03425709 | <i>SEC11C</i>   |
| ENSG00000163584.18 | 1739,83825 | 2369,99655 | 2054,9174  | -0,44566204 | 0,11416028 | -3,90382761 | 9,4683E-05 | 0,02151589 | <i>RPL22L1</i>  |
| ENSG00000186395.9  | 438,844019 | 594,038565 | 516,441292 | -0,43541134 | 0,12168743 | -3,57811257 | 0,00034608 | 0,04044573 | <i>KRT10</i>    |
| ENSG00000264364.3  | 8096,84729 | 10947,9877 | 9522,41749 | -0,43513436 | 0,10437111 | -4,16910742 | 3,0579E-05 | 0,00973217 | <i>DYNLL2</i>   |
| ENSG00000065518.8  | 3763,03637 | 5086,24534 | 4424,64085 | -0,43436745 | 0,11205438 | -3,87639872 | 0,00010601 | 0,02282275 | <i>NDUFB4</i>   |
| ENSG00000115128.7  | 3431,19042 | 4633,79416 | 4032,49229 | -0,4331921  | 0,10547314 | -4,10713208 | 4,006E-05  | 0,0115947  | <i>SF3B6</i>    |
| ENSG00000276410.5  | 6266,31885 | 8452,80026 | 7359,55956 | -0,43155882 | 0,10265512 | -4,20396799 | 2,6228E-05 | 0,00893997 | <i>H2BC3</i>    |
| ENSG00000277075.4  | 30559,6328 | 41158,9684 | 35859,3006 | -0,42953037 | 0,10867285 | -3,95250874 | 7,7336E-05 | 0,01936717 | <i>H2AC8</i>    |
| ENSG00000185222.10 | 2875,09977 | 3867,38699 | 3371,24338 | -0,42730673 | 0,12249829 | -3,48826706 | 0,00048616 | 0,04953457 | <i>TCEAL9</i>   |
| ENSG00000137210.14 | 1550,06501 | 2077,92374 | 1813,99437 | -0,42230827 | 0,12036761 | -3,50848766 | 0,00045066 | 0,0472656  | <i>TMEM14B</i>  |
| ENSG00000182004.13 | 6539,70666 | 8762,52846 | 7651,11756 | -0,42198514 | 0,11715639 | -3,60189615 | 0,0003159  | 0,03876465 | <i>SNRPE</i>    |
| ENSG00000122026.12 | 38990,6822 | 52235,3704 | 45613,0263 | -0,42186426 | 0,10820968 | -3,89858154 | 9,6758E-05 | 0,02158755 | <i>RPL21</i>    |
| ENSG00000126267.11 | 4669,67333 | 6254,33981 | 5462,00657 | -0,42129115 | 0,10647473 | -3,95672437 | 7,5985E-05 | 0,01936717 | <i>COX6B1</i>   |
| ENSG00000144034.16 | 1458,51978 | 1953,53616 | 1706,02797 | -0,42124862 | 0,11088649 | -3,79891744 | 0,00014533 | 0,02702028 | <i>TPRKB</i>    |
| ENSG00000090266.13 | 1102,69947 | 1470,81754 | 1286,75851 | -0,41503382 | 0,11385984 | -3,64512908 | 0,00026726 | 0,03603866 | <i>NDUFB2</i>   |
| ENSG00000145592.14 | 24160,9948 | 32171,6907 | 28166,3427 | -0,41306043 | 0,10904121 | -3,78811294 | 0,0001518  | 0,02739245 | <i>RPL37</i>    |
| ENSG00000277775.2  | 14951,9691 | 19907,5406 | 17429,7549 | -0,41290234 | 0,09063866 | -4,5554769  | 5,2267E-06 | 0,00400854 | <i>H3C7</i>     |
| ENSG00000170310.15 | 1170,4918  | 1559,62625 | 1365,05903 | -0,41283922 | 0,1182126  | -3,49234518 | 0,0004788  | 0,04937263 | <i>STX8</i>     |
| ENSG00000185088.14 | 2790,0261  | 3709,58947 | 3249,80779 | -0,41058373 | 0,11326612 | -3,62494746 | 0,00028902 | 0,03656255 | <i>RPS27L</i>   |
| ENSG00000125995.16 | 1470,84432 | 1955,20151 | 1713,02291 | -0,41030519 | 0,11002183 | -3,72930701 | 0,00019201 | 0,03059895 | <i>ROMO1</i>    |

|                    |            |            |            |             |            |             |            |            |                 |
|--------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|-----------------|
| ENSG00000137818.12 | 35598,1891 | 47288,2614 | 41443,2253 | -0,40963558 | 0,1061315  | -3,85969842 | 0,00011353 | 0,0236117  | <i>RPLP1</i>    |
| ENSG00000105193.9  | 26442,3954 | 35112,1057 | 30777,2505 | -0,40905449 | 0,1075032  | -3,80504469 | 0,00014178 | 0,02676562 | <i>RPS16</i>    |
| ENSG00000184260.6  | 18792,7449 | 24925,1699 | 21858,9574 | -0,40733169 | 0,10331397 | -3,94265819 | 8,0583E-05 | 0,01977679 | <i>H2AC20</i>   |
| ENSG00000183011.14 | 1046,55137 | 1387,84166 | 1217,19651 | -0,40674878 | 0,09869842 | -4,12112743 | 3,7702E-05 | 0,01128402 | <i>NAA38</i>    |
| ENSG00000227063.5  | 2036,58705 | 2699,08839 | 2367,83772 | -0,40614002 | 0,10554871 | -3,84789177 | 0,00011914 | 0,0239664  | <i>RPL41P1</i>  |
| ENSG00000278828.2  | 12317,6868 | 16323,8666 | 14320,7767 | -0,40612904 | 0,08980485 | -4,52235111 | 6,1157E-06 | 0,00441442 | <i>H3C10</i>    |
| ENSG00000278637.3  | 3307,48674 | 4375,6497  | 3841,56822 | -0,40373497 | 0,09996159 | -4,03890106 | 5,3702E-05 | 0,01440833 | <i>H4C1</i>     |
| ENSG00000231500.7  | 53861,7823 | 71242,2164 | 62551,9994 | -0,40344234 | 0,11349361 | -3,55475813 | 0,00037833 | 0,04206228 | <i>RPS18</i>    |
| ENSG00000273983.2  | 14188,4736 | 18753,1767 | 16470,8251 | -0,40231076 | 0,08206547 | -4,9023148  | 9,4714E-07 | 0,00209919 | <i>H3C8</i>     |
| ENSG00000273802.3  | 18511,6548 | 24299,4174 | 21405,5361 | -0,39240652 | 0,09965262 | -3,93774427 | 8,2251E-05 | 0,01979028 | <i>H2BC8</i>    |
| ENSG00000198258.11 | 3317,03125 | 4353,50132 | 3835,26628 | -0,39200224 | 0,10480067 | -3,74045561 | 0,00018369 | 0,03041308 | <i>UBL5</i>     |
| ENSG00000189171.16 | 994,993876 | 1304,6901  | 1149,84199 | -0,38969526 | 0,10426723 | -3,73746644 | 0,00018588 | 0,03041308 | <i>S100A13</i>  |
| ENSG00000166441.13 | 42357,8946 | 55479,4544 | 48918,6745 | -0,38928791 | 0,10596956 | -3,6735824  | 0,00023917 | 0,03425709 | <i>RPL27A</i>   |
| ENSG00000274750.3  | 12175,5612 | 15862,8828 | 14019,222  | -0,38156282 | 0,08870385 | -4,30153629 | 1,6962E-05 | 0,00760373 | <i>H3C6</i>     |
| ENSG00000197728.11 | 4983,38534 | 6488,95759 | 5736,17146 | -0,38068959 | 0,10682908 | -3,56353903 | 0,00036589 | 0,04119096 | <i>RPS26</i>    |
| ENSG00000233927.5  | 11939,376  | 15530,7774 | 13735,0767 | -0,37929739 | 0,1042642  | -3,63784871 | 0,00027492 | 0,0362753  | <i>RPS28</i>    |
| ENSG00000131174.7  | 2858,72288 | 3717,96966 | 3288,34627 | -0,37901571 | 0,10323539 | -3,67137383 | 0,00024125 | 0,03425709 | <i>COX7B</i>    |
| ENSG00000160124.9  | 885,63826  | 1150,83024 | 1018,23425 | -0,37735531 | 0,09665523 | -3,90413755 | 9,4562E-05 | 0,02151589 | <i>MIX23</i>    |
| ENSG00000106803.10 | 2842,45222 | 3685,58175 | 3264,01699 | -0,37436675 | 0,09122292 | -4,10386702 | 4,063E-05  | 0,0115947  | <i>SEC61B</i>   |
| ENSG00000213741.11 | 15421,0126 | 19943,8259 | 17682,4192 | -0,37097604 | 0,10118162 | -3,66643709 | 0,00024595 | 0,03425709 | <i>RPS29</i>    |
| ENSG00000130255.13 | 15102,9743 | 19522,542  | 17312,7582 | -0,37021025 | 0,10336563 | -3,58156041 | 0,00034155 | 0,04044573 | <i>RPL36</i>    |
| ENSG00000278771.1  | 12156,1958 | 15707,5588 | 13931,8773 | -0,36979035 | 0,0991271  | -3,73046677 | 0,00019113 | 0,03059895 | <i>RN7SL3</i>   |
| ENSG00000164104.12 | 30651,7087 | 39582,3245 | 35117,0166 | -0,36885805 | 0,10158034 | -3,63119517 | 0,00028211 | 0,03646152 | <i>HMGB2</i>    |
| ENSG00000158164.7  | 7299,57606 | 9400,83807 | 8350,20706 | -0,36484797 | 0,09451757 | -3,86010737 | 0,00011334 | 0,0236117  | <i>TMSB15A</i>  |
| ENSG00000198796.7  | 508,149938 | 653,669423 | 580,90968  | -0,36322976 | 0,10070944 | -3,60671025 | 0,0003101  | 0,03843719 | <i>ALPK2</i>    |
| ENSG00000164587.13 | 45566,0938 | 58457,9567 | 52012,0253 | -0,35939989 | 0,09472612 | -3,79409502 | 0,00014818 | 0,02713959 | <i>RPS14</i>    |
| ENSG00000158373.9  | 25616,0515 | 32863,0383 | 29239,5449 | -0,35935571 | 0,09787064 | -3,67174174 | 0,0002409  | 0,03425709 | <i>H2BC5</i>    |
| ENSG00000163344.6  | 761,733057 | 976,373746 | 869,053402 | -0,35789952 | 0,09998906 | -3,57938681 | 0,0003444  | 0,04044573 | <i>PMVK</i>     |
| ENSG00000197153.5  | 8186,01094 | 10432,5205 | 9309,26571 | -0,34976564 | 0,09284053 | -3,76738093 | 0,00016497 | 0,02896953 | <i>H3C12</i>    |
| ENSG00000100142.16 | 1065,68028 | 1356,87425 | 1211,27727 | -0,34832704 | 0,09803018 | -3,55326326 | 0,00038048 | 0,04206228 | <i>POLR2F</i>   |
| ENSG00000164778.4  | 3490,71408 | 4440,64513 | 3965,67961 | -0,34718825 | 0,07907946 | -4,39037178 | 1,1316E-05 | 0,00603717 | <i>EN2</i>      |
| ENSG00000276168.1  | 944600,796 | 1198206,84 | 1071403,82 | -0,34310031 | 0,08914269 | -3,84888864 | 0,00011865 | 0,0239664  | <i>RN7SL1</i>   |
| ENSG00000178878.13 | 726,496251 | 915,867986 | 821,182119 | -0,33565742 | 0,09519955 | -3,52582978 | 0,00042216 | 0,04584339 | <i>APOLD1</i>   |
| ENSG00000175550.8  | 2133,96359 | 2688,46678 | 2411,21518 | -0,33306118 | 0,08751848 | -3,80560953 | 0,00014146 | 0,02676562 | <i>DRAP1</i>    |
| ENSG00000180573.10 | 16857,0101 | 21138,6372 | 18997,8236 | -0,32644097 | 0,0899069  | -3,63087776 | 0,00028246 | 0,03646152 | <i>H2AC6</i>    |
| ENSG00000106244.13 | 4593,99038 | 5761,25452 | 5177,62245 | -0,32643886 | 0,09230832 | -3,53639698 | 0,00040562 | 0,04444125 | <i>PDAP1</i>    |
| ENSG00000204387.15 | 3290,75163 | 4117,51118 | 3704,13141 | -0,32299377 | 0,08784541 | -3,67684288 | 0,00023614 | 0,03425709 | <i>SNHG32</i>   |
| ENSG00000247077.8  | 1423,92832 | 1780,51746 | 1602,22289 | -0,32211741 | 0,09207513 | -3,49841915 | 0,00046802 | 0,04867063 | <i>PGAM5</i>    |
| ENSG00000175756.14 | 1420,12827 | 1770,42493 | 1595,2766  | -0,3182552  | 0,08479946 | -3,75303325 | 0,00017471 | 0,02936764 | <i>AURKAIP1</i> |
| ENSG00000177600.10 | 12701,1151 | 15741,7691 | 14221,4421 | -0,3095165  | 0,08811617 | -3,5125961  | 0,00044375 | 0,04694202 | <i>RPLP2</i>    |
| ENSG00000147224.13 | 4944,60972 | 6124,06012 | 5534,33492 | -0,3085618  | 0,06522803 | -4,73050923 | 2,2396E-06 | 0,00249835 | <i>PRPS1</i>    |
| ENSG00000233639.10 | 4908,19343 | 5983,30824 | 5445,75084 | -0,28542153 | 0,07845198 | -3,63816857 | 0,00027458 | 0,0362753  | <i>PANTR1</i>   |
| ENSG00000189184.12 | 16917,3734 | 14389,3562 | 15653,3648 | 0,23354664  | 0,06436737 | 3,62833925  | 0,00028525 | 0,03646152 | <i>PCDH18</i>   |
| ENSG00000113369.9  | 13392,2505 | 11282,3691 | 12337,3098 | 0,24732415  | 0,06739769 | 3,66962367  | 0,00024291 | 0,03425709 | <i>ARRDC3</i>   |

|                    |            |            |            |            |            |            |            |            |                  |
|--------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------------|
| ENSG00000138448.13 | 4712,72858 | 3888,5946  | 4300,66159 | 0,27776464 | 0,07558725 | 3,67475507 | 0,00023808 | 0,03425709 | <i>ITGAV</i>     |
| ENSG00000083097.15 | 2361,93765 | 1945,89061 | 2153,91413 | 0,2797294  | 0,07436634 | 3,76150558 | 0,00016889 | 0,02896953 | <i>DOP1A</i>     |
| ENSG00000184465.17 | 3565,46307 | 2913,53084 | 3239,49696 | 0,29128094 | 0,07747031 | 3,75990408 | 0,00016998 | 0,02896953 | <i>WDR27</i>     |
| ENSG00000151320.11 | 1985,45194 | 1617,14385 | 1801,29789 | 0,29604107 | 0,08425015 | 3,51383454 | 0,00044169 | 0,04694202 | <i>AKAP6</i>     |
| ENSG00000140450.9  | 8607,72622 | 7001,65301 | 7804,68961 | 0,29796276 | 0,07618064 | 3,91126628 | 9,1813E-05 | 0,02151589 | <i>ARRDC4</i>    |
| ENSG00000100852.14 | 15207,4685 | 12358,0756 | 13782,7721 | 0,29948575 | 0,07156985 | 4,18452408 | 2,8576E-05 | 0,00947733 | <i>ARHGAP5</i>   |
| ENSG00000078114.19 | 1939,41513 | 1568,55141 | 1753,98327 | 0,30610145 | 0,07346726 | 4,16650131 | 3,0931E-05 | 0,00973217 | <i>NEBL</i>      |
| ENSG00000111799.22 | 2794,98236 | 2258,37016 | 2526,67626 | 0,30673042 | 0,08304119 | 3,69371436 | 0,000221   | 0,03425709 | <i>COL12A1</i>   |
| ENSG00000173482.17 | 1137,23585 | 908,609836 | 1022,92284 | 0,32356761 | 0,09020883 | 3,58687292 | 0,00033467 | 0,04044573 | <i>PTPRM</i>     |
| ENSG00000162692.12 | 2485,82267 | 1962,94177 | 2224,38222 | 0,34093594 | 0,08107482 | 4,20520153 | 2,6085E-05 | 0,00893997 | <i>VCAM1</i>     |
| ENSG00000203930.15 | 7512,85157 | 5927,82914 | 6720,34035 | 0,34166902 | 0,09810754 | 3,48259687 | 0,00049658 | 0,04994654 | <i>LINC00632</i> |
| ENSG00000177853.15 | 6346,21993 | 5007,87647 | 5677,0482  | 0,34211888 | 0,08575374 | 3,98955052 | 6,6199E-05 | 0,01728347 | <i>ZNF518A</i>   |
| ENSG00000197044.11 | 1707,45738 | 1340,10824 | 1523,78281 | 0,35089099 | 0,09549268 | 3,67453276 | 0,00023829 | 0,03425709 | <i>ZNF441</i>    |
| ENSG00000152208.13 | 647,070427 | 506,003228 | 576,536827 | 0,35468501 | 0,09701607 | 3,65594088 | 0,00025624 | 0,03493696 | <i>GRID2</i>     |
| ENSG00000144642.22 | 892,619363 | 698,408925 | 795,514144 | 0,35614251 | 0,10114159 | 3,52122709 | 0,00042955 | 0,04623741 | <i>RBMS3</i>     |
| ENSG00000185189.18 | 718,332118 | 551,3518   | 634,841959 | 0,37995177 | 0,10655644 | 3,5657325  | 0,00036284 | 0,04119096 | <i>NRBP2</i>     |
| ENSG00000134376.17 | 674,949425 | 503,198201 | 589,073813 | 0,4242746  | 0,11514637 | 3,68465455 | 0,00022901 | 0,03425709 | <i>CRB1</i>      |
| ENSG00000164796.18 | 263,419302 | 186,5539   | 224,986601 | 0,4991178  | 0,13920399 | 3,58551368 | 0,00033642 | 0,04044573 | <i>CSMD3</i>     |