

Autoreferat

**„Nietypowe siRNA celujące w region powtórzeń CAG
w strategii terapeutycznej dla chorób poliglutaminowych”**

Dr Agnieszka Fiszer

Zakład Biomedycyny Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Poznań, 2019

1. DANE OSOBOWE

1.1 IMIĘ I NAZWISKO: Agnieszka Fiszer

Miejsce pracy: Zakład Biomedycyny Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
email: agnieszka.fiszer@ibch.poznan.pl
tel.: 61 852 85 03, wew. 135

1.2 POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE:

2004	Dyplom magistra inżyniera w zakresie biotechnologii Praca magisterska pt. „Konstrukcja i badanie aktywności rybozymów typu <i>hammerhead</i> skierowanych na mRNA mysiego białka BACE w komórkach Neuro-2A”; praca wykonana w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi; opiekun: prof. dr hab. Barbara Nawrot	Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, kierunek: Biotechnologia, specjalność: Biotechnologia molekularna i biochemia techniczna
2012	Stopień doktora nauk chemicznych w zakresie biochemii Tytuł rozprawy doktorskiej: „Badania procesu interferencji RNA sekwencji powtórzonych CAG i CUG w kontekście terapii choroby Huntingtona i niektórych ataksji rdzeniowo-mózdkowych”; promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Krzyżosiak	Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Od stycznia 2018 p.o. Kierownika Zakładu Biomedycyny Molekularnej, Instytut Chemii Bioorganicznej (IChB) PAN w Poznaniu

2012-2017 adiunkt w Zakładzie Biomedycyny Molekularnej, IChB PAN
(2015 – półroczny urlop macierzyński)

2004-2008 asystent w Zakładzie Biomedycyny Molekularnej, IChB PAN
(poprzednia nazwa: Pracownia Genetyki Nowotworów; w trakcie Studiów
Doktoranckich)

3. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

Liczba wszystkich publikacji: **13**

Liczba publikacji wchodzących w skład habilitacji: **5**

Patent: **1 (międzynarodowy)**

Udział w projektach badawczych:

- a) Kierownik projektów: **3**
- b) Wykonawca: **4**, w tym projekt międzynarodowy (RIGHT) i projekt POIG

Udział w konferencjach krajowych i międzynarodowych: **15**

Sumaryczny IF artykułów, zgodnie z rokiem opublikowania (JCR): **79.998**

Liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection (bez autocytowań): **375**

Indeks Hirscha wg bazy Web of Science: **9**

4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Nietypowe siRNA celujące w region powtórzeń CAG w strategii terapeutycznej
dla chorób poliglutaminowych**

4.2 Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Wymienione poniżej prace są podstawą wniosku habilitacyjnego i stanowią zamknięty, monotematyczny cykl. Prace te zostały opublikowane w latach 2014-2017 w renomowanych czasopismach z listy JCR, specjalizujących się w tematyce biologii molekularnej.

1. „Oligonucleotide-based strategies to combat polyglutamine diseases”
Fiszer A, Krzyzosiak WJ.
Nucleic Acids Res. **2014**;42(11):6787-810
IF₂₀₁₄ **9.112**; IF_{5-letni} **10.235**; punkty MNiSW: **40**
Liczba cytowań (bez auto-cytowań): **26**
2. „The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells”
Stroynowska-Czerwinska A, **Fiszer A**, Krzyzosiak WJ.
Cell Mol Life Sci. **2014**;71(12):2253-70
IF₂₀₁₄ **5.808**; IF_{5-letni} **6.134**; punkty MNiSW: **40**
Liczba cytowań (bez auto-cytowań): **39**
3. „Mutant CAG Repeats Effectively Targeted by RNA Interference in SCA7 Cells”
Fiszer A*, Wroblewska JP, Nowak BM, Krzyzosiak WJ.
Genes (Basel) **2016**; 7 (12), pii: E132
*** co-corresponding author**
IF₂₀₁₆ **3.600**; IF_{5-letni} **3.286**; punkty MNiSW: **25**
4. “Silencing of genes responsible for polyQ diseases using chemically modified single-stranded siRNAs”
Fiszer A*, Ellison-Klimontowicz ME, Krzyzosiak WJ.
Acta Biochim Pol. **2016**;63(4):759-764
*** co-corresponding author**
IF₂₀₁₆ **1.159**; IF_{5-letni} **1.541**; punkty MNiSW: **15**
Liczba cytowań (bez auto-cytowań): **1**
5. “Reduction of Huntington’s disease RNA foci by CAG repeat-targeting reagents”
Urbanek MO, **Fiszer A**, Krzyzosiak WJ.
Frontiers in Cellular Neuroscience **2017**; 11:82
IF₂₀₁₇ **4.300**; IF_{5-letni} **4.915**; punkty MNiSW: **35**
Liczba cytowań (bez auto-cytowań): **2**

Łączny IF (zgodnie z rokiem opublikowania) przedstawionego powyżej jednotematycznego cyklu publikacji wynosi **23.979** a łączna liczba cytowań (bez autocytowań) **68**. Oświadczenia

współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie poszczególnych publikacji umieszczono w załączniku do wniosku habilitacyjnego (brak oświadczeń prof. Krzyżosiaka w związku z jego śmiercią w grudniu 2017 roku).

4.3 Omówienie celu naukowego w/w prac oraz otrzymanych wyników

Wstęp

Przedmiotem zainteresowania moich badań jest grupa dziedzicznych chorób neurologicznych zwanych chorobami poliglutaminowymi (poliQ). Są to choroby wywoływane ekspansją ciągu powtórzeń tripletu CAG, znajdującego się w regionie kodującym białko pojedynczych genów. Do tych chorób zaliczamy: chorobę Huntingtona (HD, ang. *Huntington's disease*), (DRPLA, ang. *dentatorubral-pallidoluysian atrophy*), (SBMA, ang. *spinal bulbar muscular atrophy*) i kilka ataksji rdzeniowo-mózdkowych (SCA, ang. *spinocerebellar ataxia*) typu 1, 2, 3, 6, 7 oraz 17 [1,2]. Istnieje potrzeba opracowania skutecznej terapii dla tych chorób poliQ, ponieważ są jak dotąd nieuleczalne. Zaburzenia motoryczne oraz poznawcze, związane z postępującą neurodegeneracją w mózgu, pojawiają się w czwartej lub piątej dekadzie życia i prowadzą do śmierci w przeciągu 10-15 lat.

Potencjalnie najbardziej skutecznym podejściem terapeutycznym dla pacjentów z chorobami poliQ jest eliminacja ekspresji zmutowanego genu [3]. Obecnie minęło 20-25 lat od identyfikacji genów odpowiedzialnych za te choroby. Jednocześnie od blisko 20 lat są rozwijane narzędzia oligonukleotydowe w oparciu o zjawisko interferencji RNA (RNAi, ang. *RNA interference*), które są skutecznym narzędziem wyciszania ekspresji genów. Aktywatorami RNAi są siRNA (ang. *short interfering RNAs*), krótkie, około 21 nt dupleksy RNA [4]. Po związaniu z sekwencją komplementarną w mRNA działają one w ramach kompleksu wyciszającego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), aktywując białko Ago2 do przecinania celowanego transkryptu, który dalej podlega degradacji.

W zeszłym roku firmy Ionis Pharmaceuticals oraz Roche zakończyły kluczowy etap badań klinicznych prowadzonych dla choroby Huntingtona z użyciem antysensowych oligonukleotydów (ASO, ang. *antisense oligonucleotides*). Przełomową obserwacją było wykazanie obniżenia poziomu huntingtyny w płynie rdzeniowo-mózgowym pacjentów.

Badacze pracujący nad tą strategią podkreślają jednak, że ze względu na konieczność długoterminowego podawania cząsteczek o działaniu wyciszającym ekspresję genu, kluczowe może być selektywne wyciszanie tylko zmutowanego allelu [5]. Testowane w tym podejściu ASO obniżają także poziom normalnej huntingtyny, co może powodować w dłuższej perspektywie efekty niepożądane, w związku z jej kluczową funkcją w układzie nerwowym [6].

Specyfiką podejścia opracowanego w Zakładzie Biomedycyny Molekularnej IChB PAN jest bezpośrednie celowanie z użyciem oligonukleotydów w miejsce mutacji obecne w transkryptach genów odpowiedzialnych za choroby poliQ. W celu osiągnięcia specyficznego wyciszania zmutowanego allelu konieczne było zaprojektowanie nietypowych cząsteczek siRNA, w pewnych aspektach podobnych do mikroRNA (miRNA). W podejściu z wykorzystaniem syntetycznych siRNA w ramach pracy doktorskiej zaprojektowałam i testowałam duplekisy złożone z powtórzeń CAG/CUG. Zawierały one specyficzne substytucje, powodujące występowanie niekanonicznych par zasad w oddziaływaniu nici antysensowej z ciągiem powtórzeń CAG. Prowadziło to do preferencyjnej dla allelu zmutowanego aktywacji mechanizmu wyciszania, z racji związania wielu kompleksów RISC do wydłużonego ciągu powtórzeń. Okazało się, że równoległe niezależne badania z wykorzystaniem syntetycznych cząsteczek podobnego typu prowadził zespół David Corey'a z UT Southwestern Medical Center, USA [7]. O potencjale aplikacyjnym podejścia świadczy uzyskany przez nich patent w tym zakresie. Jeszcze w ramach pracy doktorskiej rozwijałam to podejście poprzez zaprojektowanie cząsteczek, które były złożone tylko z nici antysensowej, tzw. samo-dupleksujące siRNA (sd-siRNA, ang. *self-duplexing siRNA*). Jednocześnie w Zakładzie rozwijane były podejścia służące długotrwałej ekspresji tych cząsteczek z wektorów typu wirusowego. To osiągnięcie zostało finalnie opatentowane przez nasz zespół w 2018 roku (US9970004B2).

Osiągnięcie naukowe prezentowane w ramach rozprawy habilitacyjnej obejmuje cykl 5 publikacji, które powstały podczas mojej pracy jako adiunkt w Zakładzie Biomedycyny Molekularnej IChB PAN, pod kierunkiem prof. dr hab. Włodzimierza Krzyżosiaka. Opisane w niniejszym osiągnięciu badania są kontynuacją tematyki mojej pracy doktorskiej i dotyczą analizy efektywności testowanych cząsteczek w dodatkowych modelach, ich modyfikacji chemicznych oraz analizy mechanizmu ich działania. Dla realizacji tych badań zdobyłam

finansowanie w ramach projektów Iuventus Plus (MNiSW) oraz SONATA (NCN). Wykorzystywałam głównie model komórek ludzkich fibroblastów, którego zalety to: endogenna ekspresja zmutowanego genu, łatwość transfekcji i dostępność wielu linii. Te badania na modelach komórkowych stanowiły podstawę do obecnie rozpoczynanego testowania opracowanej strategii *in vivo*, na modelach mysich chorób poliQ w IChB PAN.

Cel badań

Pierwszy cel badań prowadzonych w ramach osiągnięcia dotyczy opracowania terapeutycznego podejścia dla chorób poliQ. Główną zaletą tej strategii jest preferencyjne obniżanie ekspresji zmutowanego allelu genu. Wstępnie została ona opracowana dla HD, natomiast potencjalnie ma również zastosowanie dla innych chorób poliQ, co weryfikowano w ramach niniejszego osiągnięcia. Dodatkowo wprowadzano modyfikacje chemiczne do cząsteczek, co jest istotne do ich dalszych zastosowań *in vivo*.

Drugi kluczowy cel badań jest związany z analizą nietypowego wyciszania ekspresji celowanych genów. Aktywność zaprojektowanych cząsteczek była odnoszona w pewnych aspektach do działania miRNA celujących w regiony otwartej ramki odczytu (ORF, ang. *open reading frame*) i szczególnie tych działających w sposób kooperatywny. Analizowane cząsteczki pokazują niezwykłą „elastyczność” oraz „wrażliwość” maszynerii RNAi, której dokładniejsze poznanie jest istotne w odniesieniu do endogennych procesów regulacji ekspresji genów.

Wyniki

W celu opracowania publikacji „***Oligonucleotide-based strategies to combat polyglutamine diseases***” zebrałam i przeanalizowałam wyniki badań dotyczące różnego typu podejść terapeutycznych, które potencjalnie mogłyby prowadzić do eliminacji przyczyny choroby, tj. wyciszenia ekspresji zmutowanego genu. Kluczowe w tej analizie było zestawienie i porównanie opracowanego przez nas allelo-selektywnego podejścia celowania w region powtórzeń zmutowanych transkryptów, z innymi będącymi już na etapie testowania w modelach mysich i szczurzych chorób poliQ.

Przeanalizowałam także kwestię allelo-selektywności opracowywanego podejścia. W większości chorób poliQ u chorych występuje jeden allel zmutowany, a drugi koduje prawidłowe i w pełni funkcjonalne białko. Strategie z użyciem oligonukleotydów, siRNA i ASO, są opracowywane z reguły na zasadzie projektowania cząsteczek do przyłączania się do sekwencji specyficznej danego genu, czyli w rezultacie do obu jego alleli. Potencjalny lek mógłby być wtedy stosowany dla wszystkich pacjentów z daną chorobą. Istnieją przesłanki sugerujące bezpieczeństwo nie-allelo-selektywnego wyciszania jeśli poziom wyciszenia wynosi nie więcej niż 50%, co udowodniano także podczas trwającego pół roku wyciszania endogennej huntingtyny w małpach *Rhesus* [8]. Jednakże nie ma możliwości monitorowania poziomu wyciszenia genu u pacjentów w mózgu, jedynie w próbce płynu rdzeniowo-mózgowego. Ponadto potencjalna terapia najlepiej aby rozpoczynała się w fazie przedobjawowej, stąd wyciszenie normalnego allelu byłoby długotrwałe. W powiązaniu z istotną funkcją genów odpowiedzialnych za choroby poliglutaminowe, stwierdziłam, że dalsze rozwijanie podejścia allelo-selektywnego jest jak najbardziej zasadne.

Proponowane podejście porównałam także z innego typu strategią allelo-selektywną z użyciem oligonukleotydów, a mianowicie z celowaniem w regiony transkryptu zawierające różne warianty SNP dla allelu normalnego i zmutowanego. Wadą tego podejścia, w porównaniu do celowania w region powtórzeń, jest przede wszystkim mniejsza uniwersalność, ze względu na występowanie różnych wariantów SNP u poszczególnych pacjentów. Dodatkowo, oligonukleotydy są projektowane na ściśle określony region transkryptu, w związku z czym konieczna jest optymalizacja, w wyniku której i tak nie zawsze udaje się uzyskać dużą preferencję w wyciszaniu allelu zmutowanego.

W niniejszej pracy przeanalizowaliśmy zalety, obecne ograniczenia i perspektywy różnych strategii opartych na oligonukleotydach stosowanych w leczeniu chorób poliQ. Istotne kwestie, które rozważano to m.in. kluczowe zagadnienia dla klinicznego testowania oligonukleotydów związane z dostarczaniem cząsteczek do mózgu, ich chemicznymi modyfikacjami oraz efektami niepożądanymi (ang. *off-target*).

Ogólnie publikacja jest bardzo obszernym opracowaniem, zawierającym cztery ryciny, pięć tabel oraz ponad 300 odnośników literaturowych. Na podstawie tego opracowania wyznaczone zostały dalsze kierunki badań eksperymentalnych w kontekście terapeutycznym.

W publikacji „*The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells*” wnikliwie przeanalizowaliśmy obecny stan wiedzy na temat różnych mechanizmów, aktywowanych przez cząsteczki miRNA, w poszukiwaniu tych, które mogą zachodzić w wyniku działania testowanych przez nas oligonukleotydów.

Endogenne miRNA regulują ekspresję większości genów w komórkach. Podobnie jak siRNA, efektorowe cząsteczki to krótkie duplekisy RNA i aktywują kompleks RISC. Istotna różnica jest jednak niepełna komplementarność ich oddziaływania z celowanym mRNA. Typowy mechanizm działania polega na przyłączaniu się do sekwencji zlokalizowanej w 3'UTR i zahamowaniu translacji danego transkryptu oraz aktywacji jego degradacji inicjowanej deadenylacją [9]. Opracowane w ostatnich latach metody globalnej identyfikacji miejsc wiązania miRNA do transkryptów wykazały, że miRNA także licznie wiążą się do regionów ORF transkryptów [10]. Ponadto istotna dla efektywności wyciszania ekspresji genu przez miRNA jest kooperatywność działania w przypadku kilku cząsteczek wiążących się blisko siebie na określonym mRNA. Właśnie aspekty związane wiązaniem się miRNA do regionów ORF oraz w sposób kooperatywny były ściśle analizowane w nawiązaniu do testowanych cząsteczek siRNA w podejściu terapeutycznym. Zwrócono także uwagę na aspekt działania miRNA w jądrze komórkowym, co także potencjalnie może mieć miejsce w przypadku analizowanych cząsteczek. Różnorodność aktywowanych mechanizmów, związana z wieloma potencjalnie zaangażowanymi białkami kompleksu miRISC, zasugerowała, że także egzogenne siRNA celujące w regiony powtórzeń CAG, mogą działać na różnych szlakach.

Kontynuacja badań eksperymentalnych z użyciem opracowanego podejścia celowania w region powtórzeń CAG jest opisana w publikacji „*Mutant CAG repeats effectively targeted by RNA interference in SCA7 cells*”. Do jej wykonania kluczowa była wykonana przeze mnie optymalizacja analizy *western blot* dla białka ataksyny-7. W linii fibroblastów SCA7 wykazaliśmy, że podanie oligonukleotydu A2 skutkuje nie tylko efektywnym obniżeniem poziomu zmutowanego białka ataksyny-7, ale także poziom ekspresji normalnego allelu jest podnoszony, co może być dodatkowo korzystnym terapeutycznie efektem.

Bardziej szczegółowo, przeprowadzone analizy obejmowały, po pierwsze, porównanie aktywności sd-siRNA A2 z standardowymi siRNA naczelnymi na specyficzną sekwencję transkryptu *ATXN7* (siATXN7). Uzyskałam większe obniżenie poziomu zmutowanej

ataksyny-7 z użyciem A2, w porównaniu do siATXN7. Ponadto obserwowałam 1,5-2-krotnie podwyższenie ekspresji normalnego allelu *ATXN7*, zarówno analizując poziom mRNA, jak i białka. Aktywność oligonukleotydu A2 została także sprawdzona w szerszym zakresie stężeń. W eksperymentach *in vivo* oligonukleotyd może docierać w zróżnicowanej ilości do pewnych regionów mózgu i poszczególnych komórek. Stąd kluczowe jest aby jego aktywność miała pożądany profil w szerokim zakresie stężeń, co potwierdzono w przeprowadzonych eksperymentach dla sd-siRNA A2.

Dodatkowo w niniejszej pracy analizowano ścieżkę molekularną zaburzoną w SCA7 związaną z obniżonym poziomem ekspresji genu *UCHL1* (kodującego enzym de-ubikwitynujący). Wykazaliśmy, że po podaniu oligonukleotydu A2 do komórek SCA7 także jest przywracany wyższy poziom mRNA tego genu.

Niniejsza publikacja jest pierwszym doniesieniem, w którym pokazano allelo-selektywne obniżenie poziomu endogennego białka zmutowanej ataksyny-7. W wyniku tej pracy nawiązano współpracę z Dr Yvon'em Trottier z *Department of Translational Medicine and Neurogenetics, Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGMCB), CNRS* w Illkirch. Dr Trottier otrzymał model myszy SCA7, w wariacie *knock-in* z obecnym allelem normalnym oraz zmutowanym, co czyni go bardzo pożądanym do testowania opracowanego podejścia terapeutycznego. Kontynuacja tych badań została przewidziana w projekcie konsorcjum europejskiego E-Rare TreatPolyQ, gdzie IChB PAN jest jednym z sześciu międzynarodowych partnerów. Mój dalszy udział w tych badaniach jest także związany z pobytem w IGMCB, zaplanowanym na wiosnę tego roku w ramach otrzymanego Stypendium Rządu Francuskiego.

W kolejnej publikacji eksperymentalnej: ***"Silencing of genes responsible for polyQ diseases using chemically modified single-stranded siRNAs"*** testowaliśmy zestaw chemicznie modyfikowanych siRNA celujących w region powtórzeń CAG w kilku modelach fibroblastów: HD, SCA3 i DRPLA. Zaprojektowałam oligonukleotydy zawierające głównie modyfikacje 2'-fluoro oraz na końcu 3' z modyfikacjami 2'-O-metylo (A2F). Aktywność tych cząsteczek była porównana z dotychczas opisanymi siRNA podobnego typu [11], zawierającymi bardzo specyficzny wzór modyfikacji 2'-fluoro, 2'-O-metylo, 2'-metoksyetylo oraz wiązań tiofosforanowych (A2M). Obserwowano większą preferencję w wyciszaniu

allelu zmutowanego ataksyny-3 i atrofiny-1 z użyciem zaproponowanego siRNA A2F, w porównaniu do A2M.

Ciekawą obserwacją była także zróżnicowana aktywność testowanych cząsteczek w analizowanych modelach HD, SCA3 i DRPLA. allele genu odpowiedzialnego za chorobę w analizowanych modelach, odpowiednio: huntintyny, ataksyny-3 i atrofiny-1, zawierały bardzo zbliżonej długości ciągi powtórzeń, tj. około 16 Q na allelu normalnym i około 68 Q na allelu zmutowanym. Niemniej jednak aktywność oligonukleotydu A2F była zróżnicowana, biorąc pod uwagę obserwowaną efektywność i selektywność wyciszenia.

Oligonukleotydy były także testowane w modelu mysich linii komórkowych prekursorów neuronów prążkowania (STHdh, w 2 wariantach: 7/111, 111/111 powtórzeń CAG w genie *Htt*). Uzyskano efektywne i selektywne wyciszenie ekspresji zmutowanego genu z użyciem oligonukleotydu A2 i testowanymi modyfikowanymi wersjami siRNA.

W publikacji ***“Reduction of Huntington’s disease RNA foci by CAG repeat-targeting reagents”*** analizowaliśmy i porównywaliśmy aktywność różnego typu oligonukleotydów celujących w region powtórzeń CAG w komórkach fibroblastów HD. Zaplanowałam do tych badań zestaw chemicznie zsyntetyzowanych oligonukleotydów, które różniły się w odniesieniu do (I) ich sekwencji docelowej (specyficzna sekwencja huntingtyny lub powtórzenia CAG), (II) przewidywanego mechanizmu działania (oparte na RNAi, indukujące RNazę H lub tzw. "bloker") i (III) wzoru modyfikacji chemicznych. Oprócz będących przedmiotem mojego głównego zainteresowania sd-siRNA (A2, G2 oraz chemicznie modyfikowanych wersji A2) testowano typowy siRNA złożony z powtórzeń CAG/CUG oraz oligonukleotyd antysensowy zawierający modyfikacje LNA (ang. *locked nucleic acid*), tzw. „bloker”, złożony z 10 nt powtórzeń CTG. Badaliśmy lokalizację i aktywność oligonukleotydów w jądrze komórkowym i cytoplazmie. Intrygującym odkryciem tego badania była aktywność cząsteczek działających w oparciu o RNAi w jądrze komórkowym. W prowadzonych później badaniach ustalono, że specyficzną metodą służącą detekcji transkryptów związanych z chorobami poliQ jest smFISH (ang. *single molecule fluorescence in situ hybridization*) i w analizowanych typach komórek, w tym fibroblastach, występuje niewielka liczba tych endogennych transkryptów (20-30 na komórkę). Obecnie prowadzone są badania służące obserwacji mikroskopowej transkryptów celowanych przez testowane

siRNA, w kontekście zmiany ich poziomu i/lub lokalizacji w komórkach ludzkich prekursorów neuronalnych HD.

Obecnie przygotowuję publikację z projektu badawczego dotyczącego dodatkowych zagadnień związanych z mechanizmem działania analizowanych siRNA. Projekt jest realizowany głównie w ramach projektu NCN OPUS (którego byłam jednym z głównych wykonawców, a kieruję nim od roku w zastępstwie prof. Krzyżosiaka). W ramach tych działań obecnie koordynuję pracę kilku osób. W przeprowadzonych analizach wykorzystaliśmy dodatkowe modele badawcze z egzogenną ekspresją fragmentów genów związanych z chorobami poliQ. Modele otrzymane w komórkach HEK w systemie lucyferazowym zostały wykorzystywane do: (I) weryfikacji jak lokalizacja ciągu powtórzeń wpływa efektywność wyciszania, (II) precyzyjnej obserwacji kinetyki wyciszania, (III) analizy inhibicji translacji z użyciem metody profilowania rybosomów. Uzyskane wyniki odnośnie tych zagadnień wykazały m.in., że testowane siRNA celujące w ciąg powtórzeń CAG w bardzo krótkim czasie indukują hamowanie translacji na celowanym transkrypcie, bez powodowania jego degradacji.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć:

1. Wykazanie aktywności siRNA o dużym potencjale terapeutycznym, zaprojektowanych w strategii celowania w region powtórzeń CAG dla kilku chorób poliQ.
2. Wybór oligonukleotydu A2 jako wykazującego pożądaną aktywność, więc charakteryzującego się potencjałem uniwersalnego zastosowania dla kilku chorób z tej grupy.
3. Wykazanie zalet opracowanego podejścia w porównaniu do innych testowanych strategii z wykorzystaniem oligonukleotydów.
4. Wykazanie nietypowego mechanizmu aktywności badanych siRNA w wyniku kooperatywnego działania na wydłużonym ciągu powtórzeń, prowadzącego do inhibicji translacji.

Przyszłe plany badawcze

(częściowo realizowane w ramach projektu SONATA NCN, 2016-2020)

1. Zastosowanie podejść głębokiego sekwencjonowania RNA w celu pełniejszej charakterystyki działania allelo-selektywnych siRNA celujących w rejon powtórzeń CAG zmutowanego genu *HTT* w modelu komórek neuronalnych. Badania dostarczą informacji na temat potencjalnych korzyści z allelo-selektywnego podejścia, w porównaniu do wyciszania nie-allelo-selektywnego. Jednocześnie analizowane będą potencjalne efekty niepożądane.
2. Udział w testowaniu opracowanego podejścia terapeutycznego na modelach mysich chorób poliQ.
3. Analiza funkcji ciągów powtórzeń trójnukleotydowych obecnych w różnego typu transkryptach komórkowych.

5. Omówienie pozostałego dorobku

W skład pozostałego dorobku naukowego wchodzi 8 publikacji. Prace te powstały w latach 2007-2018 i zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR, specjalizujących się w tematyce biologii molekularnej. W czterech z tych prac jestem pierwszym autorem, a w jednej pracy współautorem korespondującym. Szczegółowa informacja na temat mojego wkładu w powstanie tych prac znajduje się w załączniku nr 3.

1. „Ribonuclease Dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets”
Krol J, **Fiszer A**, Mykowska A, Sobczak K, de Mezer M, Krzyzosiak WJ.
Molecular Cell, **2007**, Feb 23; 25 (4): 575-86
IF₂₀₀₇ **13,156**; IF_{5-letni} **14,703**; punkty MNiSW: **50**; liczba cytowań (bez autocytowań): **110**
2. „Mouse ataxin-3 functional knock-out model”
Switonski PM, **Fiszer A**, Kazmierska K, Kurpisz M, Krzyzosiak WJ, Figiel M.
Neuromolecular Medicine, **2011**, 13(1):54-65
IF₂₀₁₁ **5,0**; IF_{5-letni} **3,556**; punkty MNiSW: **35**; liczba cytowań (bez autocytowań): **13**
3. "Inhibition of mutant huntingtin expression by RNA duplex targeting expanded CAG repeats"
Fiszer A, Mykowska A, Krzyzosiak WJ.

Nucleic Acids Research, **2011**, 39(13):5578-85

IF₂₀₁₁ **8,026**; IF_{5-letni} **10,235**; punkty MNiSW: **40**; liczba cytowań (bez autocytowań):**35**

4. „An evaluation of oligonucleotide-based therapeutic strategies for polyQ diseases”
Fiszer A, Olejniczak M, Switonski PM, Wroblewska JP, Wisniewska-Kruk J, Mykowska A, Krzyzosiak WJ.

BMC Molecular Biology, **2012**, Mar 7;13:6

IF₂₀₁₂ **2,796**; IF_{5-letni} **2,25**; punkty MNiSW: **30**; liczba cytowań (bez autocytowań):**14**

5. „Triplet repeat RNA structure and its role as pathogenic agent and therapeutic target”

Krzyzosiak W.J., Sobczak K., Wojciechowska M., **Fiszer A.**, Mykowska A., Kozłowski P.
Nucleic Acids Research, **2012**; 40(1):11-26

IF₂₀₁₂ **8,278**; IF_{5-letni} **10,235**; punkty MNiSW: **40**; liczba cytowań (bez autocytowań):**59**

6. „RNA toxicity in polyglutamine disorders: concepts, models, and progress of research”

Fiszer A, Krzyzosiak WJ.

Journal of Molecular Medicine (Berl), **2013** 91(6):683-91

IF₂₀₁₃ **4,739**; IF_{5-letni} **5,128**; punkty MNiSW: **35**; liczba cytowań (bez autocytowań):**24**

7. „Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression”

Fiszer A, Olejniczak M, Galka-Marciniak P, Mykowska A, Krzyzosiak WJ.

Nucleic Acids Research, **2013** Dec;41(22):10426-37.

IF₂₀₁₃ **8,808**; IF_{5-letni} **10,235**; punkty MNiSW: **40**; liczba cytowań (bez autocytowań):**7**

8. “A Potential Role of Extended Simple Sequence Repeats in Competing Endogenous RNA Crosstalk”

Witkos TM, Krzyzosiak WJ, **Fiszer A**, Koscianska E.

RNA Biology **2018**, doi: 10.1080/15476286.2018.1536593

*** co-corresponding author**

IF₂₀₁₇ **5,216**; IF_{5-letni} **5,269**; punkty MNiSW: **35**

Ważnym doświadczeniem na początku mojego zaangażowania w badania naukowe było wykonywanie pracy magisterskiej w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi pod opieką prof. dr hab. Barbary Nawrot. Było to pierwsze zetknięcie z tematyką chorób neurodegeneracyjnych oraz cząsteczkami RNA służącymi obniżaniu poziomu ekspresji wybranego genu.

Zawarte w mojej pracy doktorskiej badania rozpoczynałam w ramach projektu MNiSW (2005-2009) oraz przede wszystkim będąc jednym z głównych wykonawców grantu

Europejskiego szóstego ramowego programu Unii Europejskiej RIGHT (*RNA Interference Technology as Human Therapeutic Tool*, 2005-2009), gdzie Zakład prof. Krzyżosiaka (wtedy Pracownia Genetyki Nowotworów), była jedynym członkiem z Polski wśród 23 czołowych w tej dziedzinie europejskich zespołów naukowych. Badania, w których uczestniczyłam zostały opublikowane w pracy **„Ribonuclease Dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets”**. Opisano w niej mechanizm powstawania krótkich RNA z ciągów zmutowanych powtórzeń, jak i pojawiły się pierwsze przesłanki na temat wiązania się tego typu cząsteczek do komplementarnych ciągów powtórzeń. W ramach nawiązanej współpracy z Dr. Denis'em Furlingiem przebywałam na krótko-terminowym stażu w Instytucie INSERM w Paryżu w celu wstępnego przetestowania opracowanych siRNA na modelu mioblastów dystrofii miotonicznej typu 1 (DM1).

W ramach projektu RIGHT uczestniczyłam także w zadaniu otrzymania nowego modelu mysiego *knock-in* SCA3, dedykowanego testowaniu allelo-selektywnych podejść terapeutycznych, przygotowując konstrukt do jego wygenerowania. W pierwszej próbie uzyskano niespodziewanie model typu *knock-out* ataksyny-3, w związku z zajęciem alternatywnego składania mRNA na wygenerowanym konstrukcie, który wykluczał znaczący jego fragment. Model ten, jako ciekawy ze względu na analizę funkcji ataksyny-3, opisaliśmy w pracy **„Mouse ataxin-3 functional knock-out model”**.

Badania związane z opracowywaniem potencjalnie terapeutycznych oligonukleotydów dla chorób poliQ prowadziłam następnie w ramach projektów kierowanych przez prof. Krzyżosiaka: „Nowe reagenty technologii interferencji RNA o dużym znaczeniu dla medycyny” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (2009-2014) oraz projektu NCN (2011-2014). Wynikiem realizacji tych badań były moje pierwszo-autorskie prace eksperymentalne: **“Inhibition of mutant huntingtin expression by RNA duplex targeting expanded CAG repeats”**, **„An evaluation of oligonucleotide-based therapeutic strategies for polyQ diseases”** oraz **„Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression”**, w których przetestowaliśmy różne oligonukleotydy i wykazaliśmy efektywne obniżanie poziomu wybranych zmutowanych genów związanych z chorobami poliQ.

Publikacja „***Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression***” została przyjęta w *Nucleic Acids Research* 1,5 roku po złożeniu przeze mnie pracy doktorskiej, w związku z dwoma rundami opracowywanych odpowiedzi na uwagi recenzentów. Publikacja nie została ujęta w dorobku osiągnięcia habilitacyjnego, ponieważ w większości zawiera wyniki umieszczone w rozprawie doktorskiej.

Uczestniczyłam także w przygotowaniu prac przeglądowych. W pierwszej „***Triplet repeat RNA structure and its role as pathogenic agent and therapeutic target***”, obszernie podsumowaliśmy wiedzę na temat wydłużonych ciągów powtórzeń trójnukleotydowych występujących w transkryptach, w kontekście ich znaczenia w patogenezie oraz jako regionu do projektowania cząsteczek terapeutycznych. Druga praca, „***RNA toxicity in polyglutamine disorders: concepts, models, and progress of research***”, dotyczy ściśle zagadnień związanych z patogenezą chorób poliQ i modeli, które pozwalają ją badać.

W ostatnim czasie sfinalizowany został projekt dotyczący występowania ciągów powtórzeń w różnego typu transkryptach publikacją „***A Potential Role of Extended Simple Sequence Repeats in Competing Endogenous RNA Crosstalk***”. W ramach tych badań wykonaliśmy analizy bioinformatyczne sekwencji zgromadzonych w bazach danych oraz wyników eksperymentalnych sekwencjonowania RNA wykonanych przez innych badaczy w celu zbadania występowania sekwencji powtórzonych w transkryptach i określenia ich potencjalnej regulacji przez miRNA. Wykazaliśmy możliwość istnienia sieci konkurujących RNA, funkcjonujących w oparciu o sekwencje powtórzone, jak i możliwość zaburzenia tej sieci, szczególnie w przypadku dystrofii miotonicznej typu 1 i 2 (DM1 i 2).

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

- [1] H.T. Orr, H.Y. Zoghbi, Trinucleotide repeat disorders, *Annu Rev Neurosci.* 30 (2007) 575–621.
- [2] G.P. Bates, R. Dorsey, J.F. Gusella, M.R. Hayden, C. Kay, B.R. Leavitt, M. Nance, C.A. Ross, R.I. Scahill, R. Wetzel, E.J. Wild, S.J. Tabrizi, Huntington disease, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1 (2015) 15005.
- [3] H.L. Paulson, V.G. Shakkottai, H.B. Clark, H.T. Orr, Polyglutamine spinocerebellar ataxias — from genes to potential treatments, *Nat. Rev. Neurosci.* 18 (2017) 613–626.

- [4] S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*. 411 (2001) 494–498.
- [5] E.J. Wild, S.J. Tabrizi, Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's disease, *Lancet Neurol*. 16 (2017) 837–847.
- [6] F. Saudou, S. Humbert, The Biology of Huntingtin, *Neuron*. (2016).
- [7] J. Hu, J. Liu, D.R. Corey, Allele-Selective Inhibition of Huntingtin Expression by Switching to an miRNA-like RNAi Mechanism, *Chem Biol*. 17 (2010) 1183–1188.
- [8] R. Grondin, M.D. Kaytor, Y. Ai, P.T. Nelson, D.R. Thakker, J. Heisel, M.R. Weatherspoon, J.L. Blum, E.N. Burright, Z. Zhang, W.F. Kaemmerer, Six-month partial suppression of Huntingtin is well tolerated in the adult rhesus striatum, *Brain*. 135 (2012) 1197–209.
- [9] S. Jonas, E. Izaurralde, Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing, *Nat. Rev. Genet*. 16 (2015) 421–433.
- [10] A. Helwak, G. Kudla, T. Dudnakova, D. Tollervey, Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding., *Cell*. 153 (2013) 654–65.
- [11] D. Yu, H. Pendergraff, J. Liu, H.B. Kordasiewicz, D.W.W. Cleveland, E.E.E. Swayze, W.F.F. Lima, S.T.T. Crooke, T.P.P. Prakash, D.R.R. Corey, Single-stranded RNAs use RNAi to potently and allele-selectively inhibit mutant huntingtin expression, *Cell*. 150 (2012) 895–908.

Poznań, 31.01.2019

Agnieszka Firsi