

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polskiej Akademii Nauk



ROZPRAWA DOKTORSKA

Mgr Katarzyna Maria Romańczuk

**Translacyjna ocena bezpieczeństwa edytorów zasad cytozynowych w
modelu komórkowym nowotworu związanego
z recesywną dystroficzną postacią pęcherzowego oddzielania się
naskórka**

*Translational safety assessment of cytosine base editors in a cell model
of cancer associated with recessive dystrophic epidermolysis bullosa*

Promotorzy:

Dr hab. Łukasz Łaczmański, prof. IITD PAN

Dr hab. Joanna Jacków-Malinowska

Praca doktorska wykonana w Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki

Wrocław, 2026

1 STRESZCZENIE

Edytory zasad są niezwykle skutecznym i łatwym do zastosowania narzędziem inżynierii genetycznej, zdolnym wprowadzać substytucje pojedynczych nukleotydów bez genotosyczości towarzyszącej wcześniejszym narzędziom jak CRISPR/Cas9. Dzięki niezwykle wszechstronności edytorów zasad możliwe było opracowanie pierwszej terapii genowej dedykowanej do pojedynczego pacjenta, najbardziej skomplikowanej terapii komórkowej CAR-T nakierowanej na białaczkę z komórek T, a także wielu innych aktualnie trwających badań klinicznych na choroby wrodzone i nowotwory. Mimo tak zaawansowanego wprowadzenia edytorów zasad do kliniki, brakuje wciąż kompleksowych badań nad poznaniem profilu skuteczności i bezpieczeństwa zastosowanych terapii, szczególnie przy wprowadzaniu edytorów zasad w postaci mRNA.

Celem niniejszej pracy było opracowanie kompleksowej ścieżki oceny skuteczności, precyzji i bezpieczeństwa edytorów zasad cytozynowych na bazie danych eksperymentalnych zgromadzonych w ramach przedstawionych badań. Skupiając się szczególnie na strukturze elementów regulatorowych mRNA, przeprowadzona została analiza porównawcza pod kątem opisanych parametrów dla trzech różnych konstruktów mRNA edytora zasad cytozynowych. Wybrany konstrukt o najkorzystniejszym profilu działania został następnie wykorzystany do wprowadzenia mutacji powodujących niezwykle wyniszczającą dziedziczną chorobę skóry – recesywną dystroficzną postać pęcherzowego oddzielania się naskórka (RDEB) – do linii raka płaskonabłonkowego skóry, w ramach proof-of-concept poprzedzającego dalsze badania funkcjonalne i przesiewową ocenę skuteczności dedykowanych terapii dla tego niezwykle agresywnego nowotworu.

Analiza skuteczności i precyzji w miejscu *on-target* wykazała wysoką i porównywalną skuteczność dla wszystkich trzech konstruktów (40-50%), której towarzyszyły dodatkowo niepożądane mutacje towarzyszące typu *bystander* poza standardowym oknem edycji, osiągające nawet 15% edytowanych odczytów. Wskazuje to na konieczność rozszerzenia okna analizy mutacji *bystander*, bazującej do tej pory wyłącznie na przewidywaniu i ocenie mutacji w obrębie okna edycji.

Ocena bezpieczeństwa edytorów zasad w formie mRNA polegała przede wszystkim na zbadaniu konsekwencji edycji na poziomie komórkowym w analizie transkryptomicznej, a także przewidywaniu i wykrywaniu mutacji *off-target* w genomie. W ocenie różnicowej ekspresji genów komórki traktowane edytorem zasad wykazywały znaczną aktywację szlaków odpowiedzi przeciwvirusowej, sygnalizowania interferonem alfa i beta oraz odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Jest to szczególnie istotne w kontekście zastosowania terapeutycznego mRNA u pacjentów z recesywną dystroficzną postacią pęcherzowego oddzielania się naskórka, których komórki skóry wyjściowo wykazują prozapalny i silnie zaburzony

fenotyp. Dodatkowo, analiza izoform transkryptów uwidoczniła setki (>400) genów o zmienionym splicingu dla każdej z grup badanych. Różnicowemu wykorzystaniu izoform rzadko towarzyszyły zmiany w ogólnej ekspresji danego genu, co podkreśla konieczność przeprowadzenia oddzielnej analizy form splicingowych.

Przewidywanie potencjalnych miejsc mutacji *off-target* przeprowadzone zostało za pomocą trzech komplementarnych metod, uzyskując ponad 6000 loci wytypowanych do dalszego sprawdzenia w edytowanych komórkach. Zastosowanie innowacyjnej metody Adaptive sampling w technologii sekwencjonowania nanoporowego umożliwiło równoczesne przesekwencjonowanie wszystkich wytypowanych miejsc w genomie bez dodatkowego nakładu pracy na etapie przygotowania bibliotek. Wykrytych zostało 25 potwierdzonych mutacji *off-target*. Prawie 70% z nich zostało wskazanych przez dwie metody przewidywania równocześnie (Nano-OTS i połączenie Cas-OFFinder+BEDeepoff). Większość miejsc mutacji *off-target* różniła się o 4-5 nukleotydów od sekwencji gRNA, jednak nie zaobserwowano korelacji między częstością wprowadzania mutacji a stopniem niedopasowania gRNA.

Wybrany konstrukt mRNA o najkorzystniejszym profilu działania posłużył równoczesnemu wprowadzeniu dwóch mutacji w genie *COL7A1*, aby uzyskać genotyp heterozygoty złożonej charakterystyczny dla pacjentów z RDEB. Z edytowanych populacji komórek wyprowadzonych zostało 227 monoklonalnych linii potomnych, spośród których pięć posiadało wybrany genotyp. W analizie porównawczej edytowanych i nieedytowanych linii potwierdzone zostało skuteczne obniżenie ekspresji białka kolagenu typu VII, jednak nie udało się zaobserwować zmian proliferacji czy przylegania edytowanych komórek nowotworowych.

Otrzymane dane eksperymentalne pozwoliły na opracowanie kompleksowej i wieloparametrowej ścieżki projektowania i oceny skuteczności oraz bezpieczeństwa edytorów zasad cytozynowych dostarczanych w formie mRNA, obejmującej analizę mutacji *on-target* i *bystander*, ocenę odpowiedzi komórkowej na poziomie transkryptomycznym wraz z charakterystyką alternatywnego splicingu, a także przewidywanie i eksperymentalną weryfikację mutacji *off-target* z zastosowaniem sekwencjonowania nanoporowego. Opracowany schemat postępowania może stanowić podstawę wystandaryzowanej przedklinicznej oceny bezpieczeństwa terapii genowych opartych na edytorach zasad.