



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

dr hab. Krzysztof Rakus, prof. UJ

Kraków, 17.04.2025

Zakład Immunologii Ewolucyjnej
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pana mgr Tomasza Śpiewli o temacie: „Badania nowych modyfikacji oraz optymalizacja procesu wytwarzania mRNA do zastosowań terapeutycznych” wykonanej pod opieką dr hab. Joanny Kowalskiej (Uniwersytet Warszawski, Wydział Fizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Zakład Biofizyki) oraz prof. dr hab. Jacka Jemielitego (Uniwersytet Warszawski, Centrum Nowych Technologii oraz Explorna Therapeutics sp. z o.o.)

Jednym z głównych ograniczeń wpływających na efektywność stosowania syntetycznych mRNA w terapiach i szczepionkach jest niska stabilność cząsteczek mRNA w warunkach fizjologicznych. Wynika to z faktu, że w komórkach eukariotycznych mRNA ulega stosunkowo szybkiej degradacji a proces ten inicjowany jest głównie na końcach 5' i 3' cząsteczki mRNA. Stąd też istnieje konieczność prowadzenia ciągłych badań nad udoskonaleniem metod modyfikacji syntetycznego mRNA, które zwiększą jego aktywność biologiczną, wpłyną na stabilność i znacząco opóźnią jego degradację w komórce. W związku z powyższym uważam, że podjęty temat badawczy jest bez wątpienia niezwykle istotny dla rozszerzenia wiedzy na temat biologii RNA, ale przede wszystkim ma również zastosowanie aplikacyjne a prowadzone przez Pana mgr Tomasza Śpiewlę badania z pewnością przyczynią się do rozwoju i usprawnienia technologii terapeutycznego wykorzystania syntetycznych cząsteczek mRNA w medycynie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Tomasza Śpiewli została zrealizowana w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy”. Rozprawa doktorska jest kompletna, posiada układ monografii i podzielona jest na sześć głównych części obejmujących cel pracy, część literaturową, badania własne zawierające opis wyników, podsumowanie badań własnych, część eksperymentalną zawierającą opis stosowanych metod i technik badawczych oraz bibliografię. Dodatkowo w rozprawie zawarto spis treści, wykaz najważniejszych skrótów, dorobek naukowy Pana Magistra oraz streszczenie. Całość liczy 218 numerowanych stron. W rozprawie doktorskiej nie ma wydzielonej klasycznej Dyskusji ale elementy te zawarte są w części Badania własne. Piśmiennictwo liczy 373 numerowanych pozycji obejmujących w większości prace opublikowane w ostatnich latach, co świadczy o aktualności i wysokiej wartości podjętego tematu badawczego. Język manuskryptu oceniam jako bardzo dobry, wypowiedź prowadzona jest w sposób jasny, bez niepotrzebnych powtórzeń i zauważalnych błędów. Autor posiada rozległą wiedzę w temacie swoich badań a jednocześnie wykazał się bardzo dobrym stylem pisanie co sprawia, że lektura tej rozprawy doktorskiej była wielką przyjemnością. Pod względem formalnym recenzowany manuskrypt spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

W początkowej części rozprawy doktorskiej Pan mgr Tomasz Śpiewla przedstawił krótkie uzasadnienie podjęcia realizowanych badań oraz nakreślił trzy główne cele badawcze. Cele te obejmowały: (i) zbadanie interakcji pomiędzy kapowanymi cząsteczkami RNA a ludzkim białkiem IFIT1 należącym do rodziny białek indukowanych interferonami typu I, (ii) opracowanie taniej i szybkiej metody detekcji dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA) w preparatach mRNA, oraz (iii) opracowanie modyfikacji końca 3' mRNA nadających zwiększony potencjał translacyjny mRNA. Cele pracy opisane są w sposób syntetyczny i jasny.

W kolejnej części Autor przedstawił aktualny stan wiedzy na temat budowy i metabolizmu kwasów nukleinowych (główne RNA), rozpoznawania wirusowego RNA przez receptory wrodzonego układu odpornościowego i dalszych etapów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej na te cząsteczki, a także opisał metody otrzymywania syntetycznych cząsteczek mRNA, ich modyfikacji oraz możliwości wykorzystania w terapii i szczepionkach. Dodatkowo Autor zawarł krótkie wprowadzenie do stosowanej w badaniach techniki termoforezy mikroskalowej. Jedno z pytań, które nasunęło mi się w trakcie lektury początkowych fragmentów rozprawy doktorskiej, dotyczące wyboru techniki termoforezy mikroskalowej, zostało zaadresowane przez Pana Magistra w tym fragmencie części

literaturowej. Co istotne, Autor przedstawił nie tylko argumenty przemawiające za wyborem tej techniki ale odniósł się także do jej ograniczeń. Cała część literaturowa jest dosyć obszerna i zawiera się na 85 stronach. Chciałbym jednak podkreślić, że każda część tego rozdziału jest napisana w sposób bardzo staranny, zrozumiały i z zachowaniem rzetelności jaką wymaga przedstawienie przeglądu literatury. Bardzo mi się podoba, że na początku niektórych podrozdziałów Autor odnosi się do historii badań przedstawiając krótki rys historyczny kluczowych dla tematu doktoratu odkryć. Jednocześnie Autor przedstawił także liczne zastosowania aplikacyjne opisywanych badań, które znalazły już zastosowanie bądź są na etapie wdrożenia. Informacje zawarte w tej części rozprawy doktorskiej są przedstawione w sposób bardzo przejrzysty a ich uzupełnienie stanowią liczne ryciny (59 rycin), które zostały wykonane samodzielnie przez Autora bądź zostały zapożyczone z cytowanych publikacji. Co prawda w tekście zabrakło odniesienia do ryciny nr 5 a pisząc o interferonach i ich roli w odpowiedzi przeciwwirusowej nie zawsze jest sprecyzowane, że chodzi o interferony typu I, to w zasadzie nie mam żadnych uwag do tej części doktoratu. Uważam, że kolejne podrozdziały części literaturowej stanowią swoje logiczne następstwo a całość stanowi cenne kompendium wiedzy na temat technologii mRNA. Treść oraz sposób opracowania części literaturowej świadczą o bardzo dobrej znajomości przez Pana Magistra zagadnień odnoszących się do tematu rozprawy doktorskiej i w pełni wypełnia ogólne wymagania stawiane temu rozdziałowi.

Wyniki uzyskane przez Pana Magistra zostały starannie opisane w liczącej 78 stron części Badania własne. Chciałbym podkreślić, że ta część rozprawy doktorskiej zawiera nie tylko syntetyczny opis wyników oraz ich graficzne przedstawienie na 61 rycinach i siedmiu tabelach, ale Autor opisał cały proces badań i analiz, które wykonywał w trakcie realizacji celów badawczych. Widać, że poszczególne etapy badań były starannie zaplanowane i wynikały z dogłębnej analizy wyników otrzymanych na wcześniejszych etapach pracy oraz analizy danych literaturowych. Świadczy to o dużej dojrzałości naukowej Pana Magistra oraz jego zdolności do prawidłowej interpretacji otrzymanych wyników i poszukiwania najlepszych sposobów na weryfikację stawianych hipotez, których realizacja nie zawsze jest łatwa i wiąże się z wykorzystaniem szerokiego wachlarza technik badawczych. Badania własne zawierają bardzo dużo cennych wyników naukowych, z których ogromna część to dane nowe, wnoszące istotny wkład do wiedzy na temat wpływu modyfikacji końców 5' i 3' mRNA na jego aktywność biologiczną i stabilność. Co istotne, w odniesieniu do wdrożeniowego charakteru doktoratu, uważam, że wiele z tych wyników może znaleźć zastosowania aplikacyjne a niektóre opracowane przez Autora procedury już znalazły zastosowanie w technologii mRNA. Należy

zatem stwierdzić, że przedstawione przez Pana Magistra wyniki wskazują na realizację założonych wcześniej szczegółowych celów badawczych, mają nowatorski charakter i wpisują się w ideę doktoratu wdrożeniowego. W odniesieniu do celów badawczych, które Pan Magister nakreślił na początku swojej pracy doktorskiej, do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w rozprawie doktorskiej zaliczam:

1. Opracowanie biofizycznej metody oceny powinowactwa cząsteczek mRNA z różnymi modyfikowanymi analogami kapu do białka IFIT1, co umożliwiło dokładne scharakteryzowanie wpływu konkretnych modyfikacji chemicznych na oddziaływanie z badanym białkiem. Podkreślić należy, że opracowana metoda została wdrożona w firmie Explorna Therapeutics do charakterystyki syntetycznych analogów końca 5' mRNA.
2. Wyselekcjonowanie analogów kap, które wykazywały niższe powinowactwo do białka IFIT1 co może świadczyć o ich zmniejszonej immunogenności.
3. Opracowanie czułej, powtarzalnej i wysokoprzepustowej metody analizy dot-blot dsRNA, którą wdrożono w firmie Explorna Therapeutics do rutynowego badania obecności immunogennych zanieczyszczeń dsRNA w preparatach mRNA.
4. Opracowanie modyfikacji strukturalnych w regionie ogona poli(A) oraz wyselekcjonowanie modyfikacji wykazujących lepszą stabilność na poziomie DNA i warunkujących zwiększony potencjał translacyjny cząsteczek mRNA. Wyniki te stały się podstawą do złożenia zgłoszenia patentowego.

W końcowej części rozprawy doktorskiej zawarte jest podsumowanie badań oraz opis metod badawczych. Metody badawcze zostały opisane we właściwy sposób umożliwiając dokładne prześledzenie procedur badawczych. Brak jednak w opisie metod dokładniejszej informacji na temat analiz statystycznych. Chciałbym również zapytać dlaczego w przypadku wykresów obrazujących porównanie wartości K_D uzyskanych dla mRNA z różnymi modyfikacjami analogów kapu nie wykonano analiz statystycznych?

Od strony redakcyjnej manuskrypt jest bardzo dobrze przygotowany i czytelny a nieliczne błędy językowe czy edytorskie (np. pomyłka w ostatnich liniach tekstu na str. 141) nie mają, z mojego punktu widzenia, żadnego wpływu na jednoznacznie pozytywny odbiór rozprawy doktorskiej. Jednocześnie realizacja poszczególnych celów badań z wykorzystaniem bardzo wielu technik badawczych umożliwiła Panu mgr Tomaszowi Śpiewli zdobycie odpowiedniego warsztatu badawczego, który mam nadzieję będzie mógł być wykorzystany oraz rozwijany podczas dalszej kariery zawodowej.

Jako Recenzentowi pozostaje mi jednak zadać pytania nasuwające się po lekturze ocenianej rozprawy doktorskiej i mające głównie na celu poszerzenie dyskusji.

1. Czy rozważane były badania jak różne modyfikacje analogów kap wpływają na immunogenność syntetycznych cząsteczek mRNA z zastosowaniem modeli *in vitro* bądź *in vivo*? Jaki model badawczy mógłby być wykorzystany do tych badań?
2. Na ile wyselekcjonowane modyfikacje analogów kap będą ograniczały zahamowanie translacji bądź zmniejszały apoptozę komórek?
3. Ponieważ danio pręgowany (ang. zebrafish) jako organizm modelowy jest mi szczególnie bliski chciałbym zapytać o możliwość wykorzystania tego modelu w realizowanych przez Pana Magistra badaniach. Jak Pan Magister ocenia zalety i ograniczenia tego modelu w badaniach nad stabilnością i efektywnością translacyjną syntetycznych cząsteczek mRNA?

Obowiązkiem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. Oceniając rozprawę doktorską Pana mgr Tomasza Śpiewli nie można jednak pominąć jego całego dorobku naukowego, który obejmuje 10 oryginalnych artykułów, 8 wystąpień konferencyjnych i jedno zgłoszenie patentowe. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Pan Magister jest współautorem pracy opublikowanej niedawno w Nature oraz prac opublikowanych m.in. w Nucleic Acid Research, Advanced Science czy RNA. Dlatego też, zarówno rozprawę doktorską jak i pozostały dorobek naukowy Pana mgr Tomasza Śpiewli oceniam bardzo wysoko.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Tomasza Śpiewli, w mojej opinii spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) i zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Tomasza Śpiewli do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki fizyczne. Ze względu na wysoką wartość naukową, ale i znaczenie aplikacyjne przedstawionych w rozprawie doktorskiej wyników, z pełnym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o jej wyróżnienie.

Michał Ralski