

Warszawa, dn. 7 kwietnia 2025 r.

Prof. dr hab. Piotr Bednarczyk
Katedra Fizyki i Biofizyki
Instytut Biologii, SGGW
ul. Nowoursynowska 159, bud. 34, pok. 74
02-776 Warszawa

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr Tomasza Śpiewli
pt. „Badania nowych modyfikacji oraz optymalizacja procesu
wytwarzania mRNA do zastosowań terapeutycznych”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Joanny Kowalskiej
i prof. dr. hab. Jacka Jemielitego.

Ponad 30 letni rozwój technologii mRNA jest w szczególności wykorzystywany w szczepionkach oraz terapiach genowych. Głównym wyzwaniem pozostaje niska stabilność mRNA, które jest szybko degradowane w komórkach. Naturalne mRNA posiada ochronne struktury na końcach, takie jak czapeczka na końcu 5' i ogon poli(A) na końcu 3', które chronią przed degradacją i wspomagają translację. Te struktury są kluczowe dla stabilności mRNA oraz jego funkcji w komórkach. W ostatnich latach opracowano szereg nowych metod modyfikacji mRNA, które znacząco poprawiły jego aktywność biologiczną, co stało się podstawą do opracowania wielu terapii przeciwnowotworowych oraz dalszych badań w tym obszarze. Przedstawiona rozprawa doktorska znakomicie wpisuje się w ten ciągle żywy nurt badań.

Pierwsza część rozprawy dotyczy opracowania biofizycznej metody badania interakcji RNA z białkiem IFIT1, które wykrywa i neutralizuje egzogenne RNA w komórkach. Celem było zrozumienie, jak ludzki układ immunologiczny rozpoznaje syntetyczne mRNA, co może pomóc w projektowaniu

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Biologii
Katedra Fizyki i Biofizyki

ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa
+48 22 59 386 20

piotr_bednarczyk@
sggw.edu.pl
kfb@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl
www.kf.sggw.pl

terapeutycznych mRNA. Zastosowano technikę termoforezy mikroskalowej, umożliwiającą precyzyjne badanie interakcji molekularnych. Badano oddziaływania mRNA z różnymi modyfikacjami strukturalnymi w obrębie końca 5' mRNA, zwracając uwagę na wpływ modyfikacji chemicznych na powinowactwo do białka IFIT1. Otrzymane wyniki wykazały, że zmodyfikowane RNA może mieć niższe powinowactwo do białka IFIT1, co może prowadzić do obniżenia immunogenności mRNA, a tym samym poprawić jego zastosowanie w terapiach.

Druga część rozprawy dotyczy opracowania metody wykrywania dwuniciowego RNA (dsRNA) w preparatach mRNA. Częsteczki dsRNA mają silne właściwości immunogenne, które mogą wywoływać reakcje zapalne i obniżać skuteczność terapii mRNA. Autor opracował metodę detekcji dsRNA opartą na immunoteście typu dot-blot, wykorzystując specyficzne przeciwciała, co pozwoliło na precyzyjne określenie ich zawartości na różnych etapach przygotowania mRNA. Metoda została przetestowana na preparatach mRNA i wdrożona w firmie Explorna Therapeutics do standardowej kontroli jakości.

W trzeciej części, doktorant skupia się na opracowaniu modyfikacji strukturalnych w regionie ogona poli(A) mRNA, mających na celu zwiększenie jego stabilności oraz potencjału translacyjnego. Wprowadzono różne układy heteronukleotydów, tworząc zmodyfikowane ogony poli(A) o budowie modułowej, które następnie amplifikowano w wektorach plazmidowych. Przeprowadzono badania biologiczne na kilku genach reporterowych, takich jak lucyferaza i erytropoetyna, które wykazały, że modyfikacje ogona poli(A) mogą znacząco zwiększyć produkcję białek. Jedną z modyfikacji, zawierającą cytozynowe heteronukleotydy, wykazała szczególnie wysoką efektywność, co czyni ją obiecującą dla zastosowań terapeutycznych.

Opracowane biofizycznej metody oceny powinowactwa RNA z modyfikowanymi kapami do białka IFIT1 oraz detekcji dwuniciowego RNA (dsRNA) w preparatach mRNA pozwalają na dokładniejszą analizę tych cząsteczek i kontrolę jakości produkcji mRNA, co ma kluczowe znaczenie dla terapii mRNA. Dodatkowo, wyselekcjonowane modyfikacje ogona poli(A) poprawiają zarówno stabilność, jak i potencjał translacyjny mRNA, co zwiększa ich użyteczność w zastosowaniach terapeutycznych. Wydaje się, że te innowacje otwierają nowe możliwości dla dalszych badań i rozwoju technologii mRNA w medycynie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi monografię opracowaną zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych w zakresie nauk przyrodniczych. Zawiera 218 stron i jest podzielona na: Spis treści, Wykaz skrótów, Dorobek naukowy, Streszczenie, Cel pracy, Część literaturową, Badania własne, Podsumowanie badań własnych, Część eksperymentalną i Bibliografię. Tematyka badawcza, bez wątpienia, podejmuje aktualne trendy badawcze. Większość wszystkich cytowań stanowią publikacje z ostatnich 10 lat.

Prace badawcze wykonane zostały w Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii UW, w zakładzie Biofizyki IFD, Wydziału Fizyki UW oraz w firmie Explorna Therapeutics.

Praca została zrealizowana w ramach IV edycji programu „Doktorat wdrożeniowy” finansowanego przez MNiSW (umowa nr DWD/4/46/2020).

Dorobek doktoranta jest imponujący. Zawiera 9 opublikowanych prac (w tym 1 jako pierwszy autor) i 4 w trakcie oceny bądź w przygotowaniu (w tym 1 jako pierwszy autor). Wszystkie prace są wieloautorskie, które ukazały się w znaczących czasopismach o wysokim współczynniku wpływu. Doktorant jest również pierwszym autorem zgłoszenia międzynarodowego PCT wynalazku pt.: „RNA molecules with modified 3' terminal sequences and application thereof”. Numer zgłoszenia: PCT/PL2024/050093. Znak: PZ/9951/RW/PCT, podmiot zgłaszający Sieć Badawcza Łukasiewicz PORT Polski Ośrodek Rozwoju Technologii. Swoje badania prezentował na wielu konferencjach przede wszystkim zagranicznych, w tym na prestiżowych spotkaniach organizowanych w ramach Gordon Research Seminar.

Tytuł rozprawy doktorskiej jest sformułowany poprawnie i w pełni odzwierciedla cel badań przeprowadzonych przez doktorantkę.

Cel rozprawy doktorskiej zawarty został na stronie 17 i dotyczy:

- (i) opracowania metody oceny potencjalnej immunogenności cząsteczek RNA zakończonych różnymi analogami kapu na podstawie ich oddziaływania z białkiem IFIT1,
- (ii) opracowania metody umożliwiającej detekcję dwuniciowych cząsteczek RNA w preparatach mRNA oraz
- (iii) opracowania modyfikacji sekwencji poli(A) nadających zwiększony potencjał translacyjny mRNA.

W części literaturowej doktorant w dziewięciu podrozdziałach przedstawia podstawy kwasów nukleinowych, opisuje białka oddziałujące z sekwencją 3'-końcową mRNA, podejmuje się opisu wrodzonego układu odpornościowego, przedstawia perspektywy terapeutycznego wykorzystania cząsteczek mRNA, opisuje metody otrzymywania syntetycznych cząsteczek mRNA, przedstawia możliwe modyfikacje mRNA wpływające na efekt biologiczny cząsteczki, charakteryzuje metody wprowadzania ogona poli(A) do mRNA i na zakończenie skupia uwagę czytelnika na termoforezie mikroskalowej w badaniach interakcji kwasów nukleinowych z białkami. Warto podkreślić, że ten rozdział jest bogaty w ilustracje, schematy, graficzne przedstawienie szlaków co daje możliwość obrazowego śledzenia wprowadzanego materiału. Część rysunków została przygotowana przez doktoranta, a inne są modyfikacją już istniejących w innych opracowaniach.

Ta część rozprawy doktorskiej została napisana poprawnie zarówno pod względem merytorycznym jak i językowym. Jego forma i treść świadczą o dobrym przygotowaniu teoretycznym doktoranta do realizacji postawionych celów rozprawy doktorskiej.

Kolejny rozdział jest poświęcony otrzymanym wynikom i zawiera opis wyboru układu pomiarowego i otrzymywanie reagentów do badań, syntezy kapowanych cząsteczek RNA, przygotowania fluorescencyjnie znakowanego białka IFIT1, opis badania oddziaływania kapowanych cząstek RNA z IFIT1 metodą termoforezy mikroskalowej, opis wykrywania dwuniciowych RNA w preparatach mRNA z wykorzystaniem testu dot-blot oraz modyfikowanych sekwencji ogona poli(A), jako element rozwoju technologii mRNA do zastosowań terapeutycznych. Pan mgr Tomasz Śpiewła przedstawił oraz udokumentował otrzymane wyniki w formie opisowej oraz graficznej. Rozdział ten zawiera rysunki, które przedstawiają wykresy, tabele, schematy postępowania czy zdjęcia. Dodatkowo, rozdział ten został podzielony na części korelujące z celami, a na zakończenie każdego znajduje się podsumowanie. Tak zorganizowany rozdział ułatwia usystematyzowanie oraz zrozumienie otrzymanych wyników.

Wyniki zostały przedstawione jako średnie z błędem, uzyskane z co najmniej trzech niezależnych doświadczeń. Jednak czasami brakuje jednoznacznego określenia istotności statystycznej jak na przykład na rysunku 83 czy 84.

Wyniki zostały przedstawione wraz z omówieniem/dyskusją. Dyskusja została przeprowadzona w oparciu o dane już opublikowane. Taka forma świadczy o wszechstronnej znajomości tematu oraz dobrym przygotowaniu merytorycznym doktoranta. Doktorant konsekwentnie stosuje w tekście określone formatowanie cytowań co ułatwia poruszanie się po liście bibliografii.

Część badań własnych kończy się wnioskami, które korelują uzyskane wyniki z postawionym celem badawczym oraz wskazują na oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Część eksperymentalna zawiera szczegółowy opis wykorzystanych związków chemicznych i materiałów, wykonanych syntez, modyfikacji oraz technik doświadczalnych. Starannie zaplanowane doświadczenia zostały przeprowadzone z wykorzystaniem wielu technik biofizycznych, biochemicznych czy biologii molekularnej. Przedstawiony opis metodologii i technik wskazuje na bogaty warsztat badawczy doktoranta. Wszystko to, świadczy o znakomitym przygotowaniu merytorycznym jak i technicznym doktoranta do realizacji postawionych celów rozprawy.

Pod kątem merytorycznym, przedstawiona rozprawa doktorska zasługuje na wysoką ocenę, jednak chciałbym zwrócić uwagę na pewne ogólne pytania wynikające głównie z nie zaspokojonej ciekawości:

1. Czy obecnie, z tak dużym bagażem wiedzy zdobytej w toku prowadzenia badań, skusił by się Pan do wykorzystania/zaplanowania badań z wykorzystaniem innych technik, metod do potwierdzenia postawionych celów badawczych?
2. Czy wiadomo coś na temat zmian potencjalnej immunogenności czy stabilności cząsteczek RNA zakończonych różnymi analogami kapu w obecności zanieczyszczeń środowiskowych np. nanoplastiku?
3. Jakie potencjalne wady dostrzega Pan w zastosowaniu opracowanej metody z wykorzystaniem techniki termoforezy mikroskalowej?

Powyższe pytania nie wpływają na wysoką ocenę wartości merytorycznej rozprawy.

Całość rozprawy doktorskiej oceniam bardzo pozytywnie. Pragnę podkreślić, że Pan mgr Tomasz Śpiewła znakomicie wywiązał się z postawionych zadań z wykorzystaniem szerokiego spektrum technik i metod biofizycznych, biochemicznych czy biologii molekularnej oraz wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Praca wypełnia lukę badawczą a podjęta tematyka jest aktualna i ma potencjał publikacyjny czy aplikacyjny.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej.

Stwierdzam z całym przekonaniem, że rozprawa doktorska Pana mgr Tomasza Śpiewli pt. „Badania nowych modyfikacji oraz optymalizacja procesu wytwarzania mRNA do zastosowań terapeutycznych” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Zatem zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne, Uniwersytetu Warszawskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pana Tomasza Śpiewli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, znaczącą wartość naukową otrzymanych wyników, wyjątkową staranność w opracowaniu oraz przedstawieniu tak dużego materiału badawczego wnoszę o wyróżnienie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.



Prof. dr hab. Piotr Bednarczyk