



KATEDRA  
BIOFIZYKI

Lublin, 17 kwietnia 2025 r.

Prof. dr hab. Rafał Luchowski  
Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
w Lublinie

## **Ocena rozprawy doktorskiej mgra Tomasza Śpiewli pt. „Badania nowych modyfikacji oraz optymalizacja procesu wytwarzania mRNA do zastosowań terapeutycznych”**

Technologia mRNA, która zyskała światowe uznanie w czasie pandemii COVID-19, pozostaje przedmiotem intensywnych badań, zarówno w kontekście nowych terapii przeciwwirusowych, jak i możliwości zastosowania jej w leczeniu nowotworów. Rozprawa doktorska Tomasza Śpiewli stanowi istotny wkład w rozwój tej dziedziny, dostarczając innowacyjnych metod analizy strukturalnej i funkcjonalnej mRNA oraz oceny jego interakcji z białkami kluczowymi dla odpowiedzi immunologicznej. Przedstawione w pracy badania koncentrują się na optymalizacji jakości preparatów mRNA, co ma kluczowe znaczenie dla ich skuteczności terapeutycznej i bezpieczeństwa klinicznego. Znaczenie tej tematyki jest tym większe, że obecnie pojawiają się poważne obawy dotyczące przyszłości badań nad mRNA, wynikające z potencjalnych cięć w finansowaniu przez Narodowe Instytuty Zdrowia (NIH) w USA. W artykule opublikowanym 21 marca bieżącego roku przez *Nature* zwrócono uwagę na fakt, że już teraz część grantów została anulowana, a naukowcy obawiają się, że badania nad szczepionkami mRNA mogą napotykać na trudności związane z priorytetami finansowania i zmianami w podejściu do tej technologii. W kontekście tych ograniczeń prace takie jak rozprawa Tomasza Śpiewli nabierają szczególnej wagi, dostarczając rzetelnych danych

i nowych metodologii pozwalających na dalsze doskonalenie technologii mRNA. Wobec narastających wyzwań, zarówno naukowych, jak i finansowych, prezentowane wyniki badań stają się cennym źródłem wiedzy dla przyszłych prac w tym obszarze.

Rozprawa doktorska mgra Tomasza Śpiewli powstała pod wspólną opieką naukową dr hab. Joanny Kowalskiej z Zakładu Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki oraz prof. dra hab. Jacka Jemielitego z Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego. Praca ma imponującą objętość, obejmując 218 stron i została napisana w sposób przejrzysty oraz uporządkowany, co ułatwia odbiór treści. Po sekcjach zawierających podziękowania, spis treści, wykaz skrótów, zestawienie dorobku naukowego oraz streszczenie, Autor zamieścił rozbudowany przegląd literatury. Jego celem było ułatwienie zrozumienia specjalistycznej terminologii związanej z biologią oraz chemią bioorganiczną, co może stanowić wyzwanie dla badaczy o fizycznym lub pokrewnym zapleczu naukowym. Cel badawczy rozprawy doktorskiej został precyzyjnie określony w krótkim rozdziale I, który pełni także rolę wprowadzenia do głównych zagadnień oraz przyjętej metodologii. Rozdział I poprzedza szczegółowe zestawienie wystąpień konferencyjnych ale także publikacji Autora, obejmujące zarówno artykuły naukowe bezpośrednio związane z tematyką pracy, jak i te niezwiązane. Liczba tych ostatnich robi wrażenie, co świadczy nie tylko o ogromnej pracowitości Autora, ale także o jego dążeniu do doskonalenia warsztatu naukowego pod okiem bardziej doświadczonych kolegów. Rozdział II, zatytułowany „Przegląd literatury”, oferuje szczegółowy przegląd badań dotyczących mRNA, uwzględniając współczesne wyzwania oraz najnowsze kierunki rozwoju w tej dziedzinie. Autor przedstawia aktualny stan wiedzy, zwracając uwagę na luki w dotychczasowych badaniach i otwarte problemy badawcze. W kolejnym podrozdziale omówiona zostaje główna technika eksperymentalna, wybrana i zastosowana przez Autora w badaniach – termoforeza mikroskalowa. Lektura rozdziałów I i II pozwala czytelnikowi lepiej zrozumieć wyniki przedstawione w kolejnych częściach rozprawy, jednocześnie pobudzając zainteresowanie dalszymi aspektami badań. Wyniki własnych badań Autora zostały przedstawione w rozdziale III, zatytułowanym „Badania własne”. Rozdział ten opisuje realizację szeregu ambitnych i czasochłonnych zadań badawczych w ramach projektu doktorskiego. Zadania te wymagały zaawansowanej wiedzy z zakresu syntezy organicznej, a także umiejętności w dziedzinie biofizyki i spektroskopii molekularnej, w tym spektroskopii fluorescencyjnej. Opisane badania tworzą logiczną i prawdopodobnie chronologiczną sekwencję, w której wyniki wcześniejszych

prac były podstawą do realizacji kolejnych etapów. W ramach cyklu badawczego skupiono się na kilku kluczowych obszarach: (i) opracowaniu biofizycznych metod oceny wpływu różnych modyfikacji na końcu 5' RNA (analogi kapu RNA) na interakcję RNA z białkiem IFIT1, które jest częścią wrodzonego układu odpornościowego człowieka, (ii) poprawieniu metod wykrywania dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA) w preparatach mRNA, oraz (iii) zbadaniu wpływu modyfikacji strukturalnych ogona poli(A) na końcu 3' RNA na wybrane właściwości matryc DNA i cząsteczek mRNA.

W świetle wyników uzyskanych w trakcie realizacji badań udało się zaprojektować nową metodę analizy cząsteczek RNA. Z dużym uznaniem przyjąłem podejście oparte na wykorzystaniu fluorescencji. Autor stworzył precyzyjną technikę badania interakcji cząsteczek mRNA z białkiem IFIT1, wykorzystując termoforezę mikroskalową (MST). Pozwala ona ocenić, jak zmienione wersje cząsteczek wpływają na ich rozpoznawanie przez układ odpornościowy. Dzięki powyższemu, możliwe jest lepsze dostosowanie ich struktury do zastosowań medycznych. Autor udoskonalił sposoby wykrywania niepożądanych form RNA. W następstwie tych badań, doprowadził do stworzenia prostszego i szybszego testu umożliwiającego wykrycie zanieczyszczeń powstających podczas produkcji, co może znacząco poprawić jakość terapii opartych na tych cząsteczkach. Nowe podejście eliminuje ograniczenia dotychczas stosowanych metod, które były czasochłonne i mniej dokładne. Wprowadzona technika bazuje na specyficznym rozpoznawaniu niepożądanych form RNA, co pozwala na ich selektywne wykrywanie. Dzięki temu można skuteczniej minimalizować ryzyko niepożądanych reakcji w organizmie. Metoda ta została przetestowana na wielu próbkach i wykazała wysoką powtarzalność wyników, co potwierdza jej wiarygodność. Wykorzystanie tej technologii może znacząco poprawić jakość RNA stosowanego w medycynie, zwiększając jego stabilność i ograniczając skutki uboczne.

Kolejnym interesującym kierunkiem prac badawczych pana Śpiewli było przeprowadzenie szerokiej analizy zmian chemicznych wpływających na trwałość RNA. Oceniono, w jakim stopniu zmiany w długości i strukturze ogona poli(A) wpływają na efektywność translacji w układach komórkowych. Eksperymenty wykazały, które modyfikacje sprawiają, że te cząsteczki są bardziej odporne na rozkład. O ogromnym znaczeniu tych badań niech świadczy fakt, że prace w tym obszarze zostały wczoraj opublikowane w prestiżowym czasopiśmie *Nature*, gdzie pan magister Śpiewla jest współautorem. Jest to istotny krok

w kierunku tworzenia bardziej efektywnych terapii. Odkrycia pana magistra Śpiewli pokazują, że określone zmiany w sekwencji cząsteczek mogą zwiększać ich aktywność, a to może wspierać rozwój skuteczniejszych leków. Przeprowadzono eksperymenty w komórkach ssaczych oraz układach modelowych, aby zbadać efektywność translacyjną zmodyfikowanego mRNA. Doktorant potwierdził ponadto, że niektóre zmiany mogą zmniejszać ryzyko reakcji obronnych organizmu. Jego badania wykazały, że określone modyfikacje powodują, że komórki rzadziej traktują wprowadzane RNA jako zagrożenie. Odkrycie to ma kluczowe znaczenie dla bezpieczeństwa terapii, a jednocześnie pokazuje, jak dużym wyzwaniem jest kontrola obiektów w skali nano tak, aby spełniały nasze oczekiwania dotyczące organizacji i działania w bardziej złożonych systemach.

Wyniki zaprezentowane w rozprawie przesuwają niewątpliwie granice poznawcze, ale nasuwają jednocześnie pewne pytania, które formułuję poniżej:

- Z danych eksperymentalnych zawartych na stronie 95 wynika, że pomiary MST prowadzono w kapilarach o objętości 4  $\mu$ l z wykorzystaniem światła w zakresie podczerwieni. Czy mógłby Pan podać, jaki był rozmiar plamki lasera ogniskowanej na kapilarze i jak ta wartość odnosi się do wymiarów geometrycznych samej kapilary?
- Jakie, według Pana, są zasadnicze zalety metody mikroskalowej termoforezy (MST) w porównaniu z techniką korelacji fluorescencji (FCS) w kontekście analizy oddziaływań molekularnych? Interesuje mnie w szczególności kwestia absorpcji promieniowania podczerwonego przez roztwór. Czy obserwowane osłabienie sygnału fluorescencji wynika w tym przypadku głównie z efektów dyfuzyjnych, czy też ma charakter dynamicznego wygaszania?

Przechodząc do podsumowania, należy podkreślić, że mgr Tomasz Śpiewla przedłożył rozprawę doktorską opartą na wynikach licznych, samodzielnie zrealizowanych badań o wysokim stopniu innowacyjności i zaawansowania. Przedstawione w pracy eksperymenty cechują się przygotowaniem koncepcyjnym oraz dużą starannością wykonania. Zarówno stopień trudności podjętej problematyki, jak i poziom jej rozwiązania są w pełni zgodne z wymaganiami stawianymi rozprawom doktorskim, co potwierdza spełnienie kryteriów określonych w obowiązujących przepisach. Istotna część rezultatów badawczych uzyskanych w ramach projektu została opublikowana w postaci artykułów naukowych w prestiżowych,

recenzowanych czasopismach międzynarodowych. Należy również zaznaczyć, że doktorant rozwijał swoje kompetencje badawcze, uczestnicząc w pokrewnych projektach naukowych, których efektem były kolejne publikacje. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie pana mgr. Tomasza Śpiewli do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę zakres przeprowadzonych prac oraz rangę uzyskanych wyników, wnoszę również o uznanie przedmiotowej rozprawy doktorskiej jako wyróżniającej. Główne osiągnięcia rozprawy doktorskiej Tomasza Śpiewli polegają na określeniu wpływu modyfikacji chemicznych kapu 5' mRNA na jego interakcje z białkiem IFIT1 oraz określeniu modyfikacji chemicznych ogona poli(A) na właściwości cząsteczek mRNA.

Uprzejmie proszę o przyjęcie moich rekomendacji.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Prof. J. Lichowski". The signature is fluid and cursive, with the first part being more stylized and the last part clearly legible.