

Lublin, 22.06.2026 r.

Samodzielna Pracownia Diagnostyki Genetycznej

Katedry Pediatrii

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

20-093 Lublin, ul. prof. Antoniego Gębali 6

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Marii Romańczuk

pt. „Translacyjna ocena bezpieczeństwa edytorów zasad cytozynowych w modelu komórkowym nowotworu związanego z recesywną dystroficzną postacią pęcherzowego oddzielania się naskórka”

przygotowana na prośbę Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii

Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Promotorzy: dr hab. Łukasz Łacmański, prof. IITD PAN, oraz dr hab. Joanna Jacków-Malinowska

Recesywna dystroficzna postać pęcherzowego oddzielania się naskórka (RDEB, recessive dystrophic epidermolysis bullosa) należy do najcięższych genodermatoz, dziedziczonych autosomalnie recesywnie i uwarunkowanych mutacjami obu alleli genu *COL7A1* kodującego kolagen typu VII – białko budujące włókna kotwiczące w obrębie błony podstawnej. Utrata funkcjonalnego kolagenu typu VII prowadzi do skrajnej kruchości skóry, przewlekłych ran, bliznowacenia i ciężkich powikłań ogólnoustrojowych, a najpoważniejszym z nich jest agresywny, wcześniej pojawiający się rak płaskonabłonkowy skóry (RDEB-SCC), stanowiący główną przyczynę przedwczesnych zgonów chorych z ciężką postacią RDEB. Choroba ta, mimo że rzadka, pozostaje schorzeniem o szczególnie dramatycznym przebiegu i niezaspokojonej potrzebie skutecznych terapii przyczynowych.

W ostatnich latach przełomem w terapii chorób uwarunkowanych genetycznie stały się edytory zasad – narzędzia inżynierii genomu wywodzące się z systemu CRISPR/Cas9, umożliwiające wprowadzanie precyzyjnych substytucji pojedynczych nukleotydów bez konieczności indukowania dwuniciowych pęknięć DNA, a tym samym bez genotoksyczności charakterystycznej dla wcześniejszych narzędzi. Dynamiczny rozwój tej technologii zaowocował opracowaniem pierwszej terapii genowej dedykowanej pojedynczemu pacjentowi

oraz zaawansowanych terapii komórkowych CAR-T w nawrotowych białaczkach z komórek T, a kolejne badania kliniczne nad chorobami wrodzonymi i nowotworami są w toku. Pomimo tak szybkiego wejścia edytorów zasad do kliniki, kompleksowa ocena profilu ich skuteczności i – przede wszystkim – bezpieczeństwa pozostaje zagadnieniem niedostatecznie zbadanym, w szczególności w odniesieniu do najbardziej obiecującej terapeutycznie formy dostarczania, jaką jest mRNA.

W związku z powyższym podjęty przez Doktorantkę temat translacyjnej oceny bezpieczeństwa cytozynowych edytorów zasad dostarczanych w formie mRNA, połączonej z wykorzystaniem tej technologii do utworzenia modelu komórkowego RDEB-SCC, jest niezwykle aktualny i ważny zarówno z poznawczego, jak i z praktycznego, klinicznego punktu widzenia. Recenzowana praca łączy w sobie zaawansowaną inżynierię genetyczną, wieloparametryczną analizę bezpieczeństwa na poziomie genomu i transkryptomu oraz aspekt translacyjny ukierunkowany na chorobę o ogromnej niezaspokojonej potrzebie terapeutycznej, co czyni ją oryginalną i wnoszącą rzeczywiście nową wartość do dyscypliny.

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Romańczuk obejmuje 141 stron i ma przejrzystą, klasyczną strukturę pracy eksperymentalnej z zakresu nauk medycznych. Składają się na nią: spis skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, rozdział „Cel pracy” (zawierający hipotezę badawczą oraz cele szczegółowe), „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Podsumowanie”, „Dyskusja” (z wyodrębnionym podrozdziałem poświęconym ograniczeniom pracy), „Wnioski” oraz bibliografia. Całość wzbogaca 50 starannie, czytelnie i estetycznie przygotowanych rycin oraz 4 tabele; znaczną część materiału graficznego (m.in. wykresy analiz transkryptomycznych, mapy szlaków, schematy off-target) Doktorantka wykonała samodzielnie z wykorzystaniem zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych w środowisku R, co świadczy o opanowaniu warsztatu analitycznego. Na pochwałę zasługuje fakt, że praca zawiera czytelny spis skrótów, a kluczowe wnioski zostały przedstawione w postaci wypunktowanej listy odpowiadającej celom i hipotezie – układ rozprawy ułatwia zatem czytelnikowi orientację w obszernym i wieloaspektowym materiale.

Wstęp zawiera obszerne i wyczerpujące informacje wprowadzające czytelnika w problematykę pracy. Doktorantka omówiła kolejno: pęcherzowe oddzielanie się naskórka i jego recesywną dystroficzną postać, dostępne opcje terapeutyczne oraz terapie genowe w RDEB, rozwój i mechanizm działania narzędzi pochodnych CRISPR/Cas9, a następnie – najszerzej – edytory zasad i ich efekty niepożądane (niezamierzone mutacje towarzyszące i typu bystander,

deaminacje w transkryptomie, mutacje off-target), formy dostarczania edytorów do komórek ze szczególnym uwzględnieniem roli struktury i elementów regulatorowych mRNA, a wreszcie rak płaskonabłonkowy skóry związany z RDEB i znaczenie braku kolagenu typu VII dla jego agresywności. Bardzo wysoko oceniam ten rozdział – Autorka precyzyjnie i z dużą swobodą porusza się w problematyce molekularnej, wykazując głęboką znajomość literatury światowej oraz umiejętność syntetycznego łączenia odległych obszarów (genodermatologia, inżynieria genomu, bioinformatyka, onkologia). Wstęp w sposób logiczny i przekonujący buduje uzasadnienie podjętego problemu badawczego.

Doktorantka sformułowała jedną hipotezę badawczą oraz trzy cele szczegółowe, wyznaczające klarowny i logiczny kierunek prowadzonych analiz. Hipoteza zakłada, że konstrukt mRNA edytora zasad wyposażony w aptamer wiążący czynnik eIF4G wykaże najkorzystniejszy profil skuteczności, precyzji i bezpieczeństwa w porównaniu z konstruktami o standardowych elementach regulatorowych. Cele szczegółowe obejmują porównanie trzech konstruktyw mRNA o wymiennych elementach regulatorowych, opracowanie metod oceny bezpieczeństwa i wykrywania mutacji off-target dedykowanych dla edytorów zasad oraz utworzenie modelu komórkowego RDEB-SCC z użyciem wybranego konstruktu.

Tu nasuwa się pewna uwaga, do której pozwolę sobie powrócić w pytaniach do dyskusji. Postawiona hipoteza ma charakter kierunkowy – przewiduje przewagę konstruktu z aptamerem eIF4G (Apt) – tymczasem przeprowadzone analizy porównawcze nie wykazały różnic istotnych statystycznie pomiędzy trzema konstruktami w żadnym z badanych parametrów, a wybór konstruktu Apt do dalszych prac oparto na nieistotnych statystycznie korzystnych tendencjach (lepsza powtarzalność edycji oraz najmniejszy odsetek mutacji bystander i off-target). Proponowałabym, aby Autorka w zakończeniu jednoznacznie odniosła się do statusu postawionej hipotezy – czy w świetle uzyskanych wyników uznaje ją za potwierdzoną, częściowo potwierdzoną, czy niepotwierdzoną. Uczciwe i otwarte zaprezentowanie tej kwestii – podobnie jak ma to miejsce w innych częściach rozprawy – tylko podniosłoby jej wartość. Jest to uwaga porządkująca, która w żaden sposób nie umniejsza merytorycznej zawartości pracy.

Rozdział „Materiały i metody” jest opracowany szczegółowo i starannie, w sposób umożliwiający odtworzenie badania, i stanowi jeden z największych atutów rozprawy. Doktorantka wykazała się tu wyjątkowo szerokim, interdyscyplinarnym warsztatem metodycznym. Zaprojektowała i wytworzyła trzy konstrukty mRNA edytora zasad BE3

różniące się zestawami sekwencji regulatorowych UTR (Xen, Mod, Apt), wykorzystując klonowanie metodą Gibsona oraz transkrypcję *in vitro*. Do oceny skuteczności i precyzji edycji on-target zastosowała pogłębione sekwencjonowanie amplikonowe NGS z analizą profilu mutacji w oprogramowaniu CRISPResso2, a ocenę bezpieczeństwa oparła na wieloaspektowej analizie transkryptomicznej (RNA-seq, analiza różnicowej ekspresji genów metodą GSEA, analiza alternatywnego splicingu i izoform transkryptów, ocena deaminacji w transkrypcie, modelowanie białka neogeniny, walidacja qPCR).

Na szczególne podkreślenie zasługuje sposób oceny mutacji off-target. Doktorantka zastosowała trzy komplementarne metody przewidywania potencjalnych miejsc – eksperymentalną metodę *in vitro* (Nano-OTS), podejście *in silico* (Cas-OFFinder w połączeniu z BEDeepoff) oraz analizę opartą na transkryptomie (CRISPRroots) – a do eksperymentalnej weryfikacji ponad sześciu tysięcy wytypowanych loci wykorzystwała innowacyjną metodę Adaptive Sampling w sekwencjonowaniu nanoporowym, umożliwiającą selektywne wzbogacanie pokrycia docelowych regionów bez konieczności przygotowywania dedykowanych paneli amplikonowych. Jest to rozwiązanie metodologicznie nowatorskie i niezwykle eleganckie, świadczące o dojrzałości badawczej Autorki oraz o jej zdolności do samodzielnego sięgania po najnowsze technologie i twórczego ich adaptowania do postawionego problemu. Wybór linii HEK293T do części porównawczej został trafnie uzasadniony brakiem natywnej ekspresji kolagenu typu VII, dzięki czemu obserwowane efekty komórkowe wynikały wyłącznie z działania edytora. Część translacyjną oparto na linii raka płaskonabłonkowego skóry A431, z zastosowaniem przesiewowego badania ARMS PCR, potwierdzeniem sekwencjonowaniem metodą Sangera, oceną białka kolagenu typu VII metodą western blot oraz badaniami funkcjonalnymi (prolifracja, podatność na odklejanie pod wpływem trypsyny, analiza morfologii i parametrów optycznych w mikroskopie holotomograficznym). Zaplanowanie badania oraz dobór metod świadczą o wysokiej rzetelności naukowej Doktorantki.

Rozdział „Wyniki” został przedstawiony obszernie, czytelnie i logicznie, z bogatą dokumentacją graficzną i tabelaryczną, a poszczególne podrozdziały zamykane są syntetycznymi wnioskami cząstkowymi. Doktorantka wykazała wysoką i zbliżoną skuteczność transfekcji oraz edycji on-target (40–50%) dla wszystkich trzech konstruktorów. Szczególnie wartościowa – i warta wyróżnienia – jest obserwacja, że mutacjom on-target towarzyszyły mutacje typu bystander sięgające nawet 15% odczytów i występujące poza klasycznym oknem edycji edytora zasad (m.in. w pozycji C(-1) dla gRNA 1732). Spostrzeżenie to ma istotne

znaczenie praktyczne – wskazuje na konieczność rozszerzenia okna analizy mutacji *bystander* poza zakres dotychczas przyjmowany w narzędziach przewidujących, co jest cenną wskazówką dla projektowania terapeutycznych gRNA.

Bardzo wysoko oceniam część poświęconą ocenie bezpieczeństwa na poziomie transkryptomu. Doktorantka wykazała, że komórki traktowane edytorem zasad w formie mRNA wykazują znaczną aktywację szlaków odpowiedzi przeciwwirusowej, sygnalizacji interferonu typu I oraz odpowiedzi na uszkodzenia DNA, przy jednoczesnym obniżeniu szlaków metabolicznych i związanych z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej – co potwierdziła analizą qPCR i co trafnie umieściła w kontekście terapeutycznym RDEB, gdzie docelowe komórki skóry wyjściowo cechuje prozapalny i zaburzony fenotyp. Niezwykle wartościowa jest analiza alternatywnego splicingu, która ujawniła zmiany izoform w setkach genów (>400 w każdej grupie), w większości niezależne od zmian ogólnej ekspresji – co stanowi mocny argument za prowadzeniem osobnej analizy form splicingowych. Na uwagę zasługuje przykład genu *NEO1*, w którym doszło do przełączenia dominującej izoformy na skróconą formę pozbawioną kluczowej domeny funkcjonalnej. Cenne jest również wykazanie przemijającego charakteru większości obserwowanych zmian (powrót do poziomu bazowego po pięciu pasażach), przy utrzymującej się nieznacznie podwyższonej ekspresji genów odpowiedzi na uszkodzenia DNA, a także brak rozsianych deaminacji w transkryptomie, co korzystnie odróżnia formę mRNA od wcześniej badanych konstruktów plazmidowych.

Równie starannie opracowano analizę mutacji off-target. Spośród 6385 wytypowanych loci (228 wskazanych przez więcej niż jedną metodę) wykrytych zostało 25 potwierdzonych mutacji typu C>T i G>A, charakterystycznych dla cytozynowych edytorów zasad, z czego 14 wystąpiło we wszystkich trzech grupach; najmniej mutacji wprowadził konstrukt Apt (15), najwięcej Xen (24). Cennym ustaleniem o znaczeniu metodycznym jest dominacja miejsc różniących się od sekwencji gRNA o 4–6 nukleotydów przy braku korelacji między liczbą niedopasowań a częstością mutacji – co Autorka słusznie interpretuje jako dowód, że ograniczenie analizy wyłącznie do miejsc o małej liczbie niedopasowań, zgodnie z algorytmami opracowanymi dla CRISPR/Cas9, mogłoby prowadzić do przeoczenia biologicznie istotnych mutacji off-target.

W części translacyjnej Doktorantka, stosując równocześnie dwa gRNA, wprowadziła do linii A431 dwie mutacje typu PTC w genie *COL7A1* (c.1732C>T oraz c.4894C>T) w celu odtworzenia genotypu heterozygoty złożonej charakterystycznego dla pacjentów z RDEB. Spośród 227 wyprowadzonych monoklonalnych linii potomnych pięć posiadało pożądany

genotyp; do dalszych analiz wybrano trzy klonów edytowane (E1–E3) i trzy nieedytowane (NE1–NE3). Potwierdzono skuteczne, drastyczne obniżenie ekspresji kolagenu typu VII (w linii E3 poniżej 4% wartości kontrolnej mimo obecności ok. 14% allelu typu dzikiego), nie wykazano natomiast różnic w morfologii, proliferacji ani podatności na odklejanie między klonami edytowanymi i nieedytowanymi. Chciałabym podkreślić, że tę część pracy oceniam wysoko za rzetelność i transparentność – Autorka otwarcie sygnalizuje niepełną edycję w linii E3 oraz ograniczenie wynikające z zastosowania sekwencjonowania krótkich odczytów (brak możliwości ustalenia fazy mutacji), co świadczy o uczciwości i dojrzałości badawczej.

Tu pozwolę sobie na pewną uwagę. Analizy funkcjonalne modelu RDEB-SCC oparto na niewielkiej liczbie klonów (po trzy w każdej grupie), co przy uzyskanych wynikach negatywnych istotnie ogranicza moc statystyczną wnioskowania o braku różnic w fenotypie. Warto byłoby, aby Autorka wyraźniej zaznaczyła ten aspekt przy interpretacji obserwacji dotyczących proliferacji i adhezji. Jest to jednak uwaga drugorzędna – sama Doktorantka trafnie podkreśla, że uzyskany model ma charakter potwierdzenia słuszności koncepcji (proof-of-concept), a głównym celem pracy pozostaje opracowanie ścieżki oceny bezpieczeństwa.

Rozdziały „Podsumowanie” i „Dyskusja” stanowią wyraz dużej wiedzy teoretycznej i kompetencji Doktorantki, zrozumienia przeprowadzonych analiz oraz umiejętności ich krytycznej oceny w odniesieniu do prac innych grup badawczych. Autorka dojrzałe dyskutuje zarówno mocne strony, jak i ograniczenia badań, a w wyodrębnionym podrozdziale otwarcie deklaruje najważniejsze z nich (wykorzystanie komercyjnych linii unieśmiertelnionych zamiast komórek pochodzących od pacjentów, charakter proof-of-concept modelu, niepełna edycja w jednej z linii). Za szczególnie wartościowe – i będące głównym osiągnięciem rozprawy – uznaję zaproponowanie spójnego, wieloparametrycznego schematu projektowania i oceny profilu bezpieczeństwa terapii opartych na mRNA edytorów zasad (Ryc. 50), obejmującego projekt i weryfikację gRNA in silico, przewidywanie i eksperymentalną ocenę mutacji off-target, ocenę skuteczności on-target oraz ocenę skutków molekularnych na poziomie transkryptomu i splicingu. Schemat ten ma realny potencjał do stania się podstawą standaryzowanej przedklinicznej oceny bezpieczeństwa tej klasy terapii, a nakreślone perspektywy translacyjne (edycja komórek pierwotnych pacjentów, formułacje do miejscowego dostarczania do skóry) są dobrze osadzone w aktualnym kierunku rozwoju dziedziny.

Rozdział „Wnioski” obejmuje jedenaście klarownie sformułowanych, wypunktowanych konkluzji, dobrze osadzonych w uzyskanych wynikach i odpowiadających postawionym

celom. Taki sposób prezentacji – syntetyczny i czytelny – zasługuje na pochwałę i ułatwia identyfikację najważniejszych ustaleń pracy.

Bibliografia obejmuje 201 pozycji, w przeważającej większości anglojęzycznych, w tym znaczną liczbę publikacji z lat 2020–2025, co świadczy o aktualności wykorzystanej literatury. Pozycje dobrano zgodnie z poruszaną problematyką, obejmując zarówno klasyczne prace dotyczące biologii RDEB i edytorów zasad, jak i najnowsze doniesienia z badań klinicznych.

Rozprawę uzupełniają zwięzłe i przejrzyste streszczenia w języku polskim oraz angielskim. Praca napisana jest na ogół poprawną polszczyzną. Występują w niej pojedyncze drobne błędy literowe i usterki edytorskie (np. „genotosyczości” zamiast „genotoksyczności”, „rówlolegle” zamiast „równoległe”, „danaego” zamiast „danego”), które jednak nie wpływają na zrozumienie treści ani nie obniżają wartości merytorycznej pracy i są łatwe do skorygowania w wersji ostatecznej.

W ramach dyskusji nad rozprawą pozwolę sobie sformułować kilka pytań i kwestii do rozważenia:

1. Czy w świetle braku różnic istotnych statystycznie pomiędzy konstruktami Autorka uznaje postawioną hipotezę badawczą (o przewodze konstrukt z aptamerem eIF4G) za potwierdzoną, częściowo potwierdzoną czy niepotwierdzoną?
2. Czy obserwacja mutacji *bystander* poza klasycznym oknem edycji (pozycja C(-1)) jest, zdaniem Autorki, swoista dla edytora BE3, czy należy się jej spodziewać także w przypadku edytorów nowszej generacji o zawężonym oknie edycji? Jakie ma to implikacje dla projektowania terapeutycznych gRNA?
3. Jak Autorka interpretuje utrzymującą się po pięciu pasażach podwyższoną ekspresję genów odpowiedzi na uszkodzenia DNA w kontekście podkreślanego „przejściowego” charakteru ekspresji z mRNA – czy może to wskazywać na trwalsze, potencjalnie genotoksyczne następstwa edycji?
4. Czy brak różnic funkcjonalnych (prolifracja, adhezja, morfologia) między klonami edytowanymi i nieedytowanymi może wynikać z ograniczeń modelu A431 (komórki o w pełni utrwalonym fenotypie nowotworowym), a tym samym czy planowane jest odtworzenie modelu w komórkach pierwotnych keratynocytów/fibroblastów lub komórkach pacjentów?

Doktorantka wykazała się umiejętnością poprawnego sformułowania i rozwiązania aktualnego oraz ważnego problemu badawczego, uzyskała oryginalne i istotne wyniki oraz wykazała się

bardzo dobrą, interdyscyplinarną znajomością problematyki prowadzonych badań – zarówno na poziomie biologii molekularnej i inżynierii genomu, jak i zaawansowanej bioinformatyki, sekwencjonowania nanoporowego oraz hodowli i charakterystyki modeli komórkowych nowotworu. Doktorantka osiągnęła zamierzone cele, dając tym samym dowód umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Marii Romańczuk zatytułowana „Translacyjna ocena bezpieczeństwa edytorów zasad cytozynowych w modelu komórkowym nowotworu związanego z recesywną dystroficzną postacią pęcherzowego oddzielania się naskórka” jest oryginalnym opracowaniem, wnoszącym istotną nową wiedzę zarówno do zrozumienia profilu bezpieczeństwa cytozynowych edytorów zasad dostarczanych w formie mRNA, jak i do praktyki przedklinicznej – przede wszystkim poprzez wykazanie konieczności rozszerzenia okna analizy mutacji *bystander*, wieloparametryczną charakterystykę odpowiedzi komórkowej na edycję, innowacyjne zastosowanie metody Adaptive Sampling w sekwencjonowaniu nanoporowym do weryfikacji mutacji off-target oraz opracowanie kompleksowego schematu oceny bezpieczeństwa o potencjale standaryzacyjnym.

Przedstawioną rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Marii Romańczuk spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) oraz wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dyscyplinie nauki medyczne.

Biorąc pod uwagę oryginalność i interdyscyplinarny charakter podjętego problemu badawczego, nowatorstwo metodyczne (w szczególności zastosowanie sekwencjonowania nanoporowego w trybie Adaptive Sampling do walidacji mutacji off-target), wartość poznawczą i translacyjną uzyskanych wyników oraz potencjał standaryzacyjny opracowanej ścieżki oceny bezpieczeństwa, zwracam się dodatkowo z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

Signature Not Verified

Dokument podpisany przez
Monika Małgorzata Lejman
Data: 2026.06.30 12:27:05
CEST

Z wyrazami szacunku
Samodzielnej Pracowni Diagnostyki Genetycznej

dr hab. n. med. **Monika Lejman, prof. UM**

Samodzielna Pracownia Diagnostyki Genetycznej

Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie