

Dr hab. n. med. Agnieszka Adamczyk
Zakład Patomorfologii Nowotworów
Pracownia Molekularno-Genetyczna
Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy Oddział w Krakowie
ul. Garncarska 11
31-115 Kraków

Kraków, 20.07.2026 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

autor: mgr Katarzyna Maria Romańczuk

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

Promotorzy:

Dr hab. Łukasz Łaczański, prof. IITD PAN

Dr hab. Joanna Jacków-Malinowska

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska autorstwa Pani Katarzyny Romańczuk pod tytułem: „Translacyjna ocena bezpieczeństwa edytorów zasad cytozynowych w modelu komórkowym nowotworu związanego z recesywną dystroficzną postacią pęcherzowego oddzielania się naskórka” napisana pod kierunkiem dr hab. Łukasza Łaczańskiego, prof. IITD PAN oraz dr hab. Joanny Jacków-Malinowskiej. Celem recenzji jest ustalenie, czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a Doktorantka wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną w danej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

PODSTAWA SPORZĄDZENIA RECENZJI

Recenzja została sporządzona w związku z powołaniem przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN do pełnienia funkcji recenzenta w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki medyczne mgr Katarzynie Romańczuk.

CHARAKTERYSTYKA STRUKTURY ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona rozprawa doktorska zawiera 141 stron i została podzielona na 13 części. Struktura pracy jest właściwa. Rozprawa zawiera między innymi streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wstęp opisujący teoretyczne podstawy przeprowadzonych badań. Następnie Doktorantka przedstawia hipotezę oraz cele szczegółowe. Rozdział Materiały i metody oraz Wyniki zawierają liczne ryciny właściwie przedstawiające opisywane techniki i wyniki. Rozdział 9,10 i 11 stanowią: podsumowanie, dyskusja i wnioski.

Rozprawę rozpoczyna spis stosowanych skrótów. Pewnym niedociągnięciem jest brak spisu rycin i tabel. Praca zawiera 50 starannie wykonanych rycin i 3 tabele (jedna jako suplement). Warto zwrócić uwagę, że bibliografia zawiera 201 pozycji, pochodzących w większości z ostatnich lat, a więc dyskutowane problemy i fakty dotyczą aktualnego stanu wiedzy.

OCENA STRONY FORMALNEJ I JĘZYKOWEJ ROZPRAWY

Na wstępie należy zaznaczyć niezwykłą zdolność Doktorantki do bardzo przejrzystego opisu prezentowanych zagadnień. Opracowanie zostało przygotowane tak, że odbiorca w logiczny sposób zostaje najpierw wprowadzony w teoretyczne podstawy pracy. Dokładnie też zostały wytłumaczone metody zastosowane w pracy. Dzięki temu czytelnik jest w stanie w łatwy sposób przyswoić i zanalizować wyniki. Także dyskusja prowadzona jest w logiczny sposób odnosząc się do zagadnień i problemów poruszonych w rozprawie. Podsumowując, Doktorantka jasno, klarownie i komunikatywnie przedstawiła założenia pracy oraz jej wyniki.

Strona formalna pracy nie budzi zastrzeżeń. Należy także podkreślić, że Doktorantka doskonale opanowała styl pisania prac naukowych. Praca jest wzorowa z perspektywy językowej. W opracowaniu właściwie nie zdarzają się błędy stylistyczne, kolokwializmy czy skróty myślowe. Bardzo rzadko występują także „literówki”. Ryciny, szczególnie we wstępie są wykonane przejrzysto i uzupełniają opisywane zagadnienia.

OCENA ZAŁOŻEŃ PROBLEMATYKI BADAWCZEJ, CELÓW ROZPRAWY, WYNIKÓW ORAZ WNIOSKÓW

W opinii recenzentki Doktorantka rozprawy podjęła ważny, bardzo aktualny i przyszłościowy problem badawczy. Inżynieria genetyczna jest ciągle rozwijającą się dziedziną nauki. Jednym z nowszych i bardzo interesujących narzędzi są edytory zasad wywodzące się z systemu CRISPR/Cas9. Edytory te pozwalają na precyzyjne modyfikacje pojedynczych nukleotydów nie prowadząc do powstania dwuniciowych pęknięć DNA, tak niebezpiecznych dla komórki. Niekwestionowane korzyści jakie niesie zastosowanie edytorów zasad, szczególnie w postaci mRNA, nie powinny jednak przesłaniać możliwych działań niepożądanych, a ocena bezpieczeństwa ich stosowania jest niezbędna.

We Wstępie można wyodrębnić 3 główne nurty. Pierwszy z nich dotyczy pęcherzowego oddzielania się naskórka, czyli grupy chorób o podłożu genetycznym charakteryzujących się upośledzeniem integralności skóry i powstawaniem pęcherzy. Doktorantka skupia się na szczegółowym opisie jednej z odmian choroby czyli dystroficznej postaci pęcherzowego oddzielania się naskórka spowodowanej mutacjami w obrębie genu *COL7A1*, kodującego kolagen typu VII. Druga część wstępu opisuje narzędzia inżynierii genetycznej pochodne CRISPR/Cas9, skupiając się na cytozynowych edytorach zasad. Doktorantka opisuje zalety jak i wady tego systemu. Warte podkreślenia jest krytyczne podejście Doktorantki, która dokładnie opisuje zagrożenia mogące wynikać z deaminacji w transkryptomie, czy też obecności mutacji typu *off-target*. Trzeci nurt skupiony jest na raku płaskonabłonkowym skóry związanym z recesywną dystroficzną postacią pęcherzowego oddzielania się naskórka. Wstęp napisany logicznie, w prawidłowy sposób opisuje przedstawione powyżej zagadnienia dowodząc dużej wiedzy Doktorantki.

W następnej części Doktorantka jasno formułuje hipotezę oraz szczegółowe cele badawcze. Postawiona hipoteza mówiąca, że „konstrukt mRNA edytora zasad cytozynowych wyposażony w aptamer wiążący czynnik inicjujący transkrypcję eIF4G jako jeden z elementów regulatorowych wykaże najkorzystniejszy profil skuteczności, precyzji i bezpieczeństwa w porównaniu z konstruktami posiadającymi standardowe elementy regulatorowe” determinuje szczegółowe cele badawcze: porównanie skuteczności, precyzji i bezpieczeństwa opracowanych konstruktów mRNA edytora zasad cytozynowych oraz opracowanie metod oceny bezpieczeństwa i wykrywania mutacji *off-target* dedykowanych dla edytorów zasad cytozynowych wprowadzanych w formie mRNA. Ostatnim celem badawczym było utworzenie

modelu komórkowego raka płaskonabłonkowego skóry związanego z recesywną dystroficzną postacią pęcherzowego oddzielania się naskórka. Przedstawione cele i hipoteza nawiązują do wstępu. Jednakże nie zostało wyjaśnione w treści rozprawy dlaczego do badania wybrano dystroficzną postać pęcherzowego oddzielania się naskórka. Nie ma wymienionych żadnych przesłanek, dlaczego Doktorantka zajęła się tym schorzeniem genetycznym oraz nie przedstawiono przyczyn wyboru cytozynowego edytora zasad. Wydaje się to tym bardziej ważne, że na stronie 26 Doktorantka wspomina o badaniach przedklinicznych dotyczących tego schorzenia z wykorzystaniem adeninowych edytorów zasad.

Część badawcza (Materiały i metody oraz Wyniki) zajmuje ponad 60 stron i podzielona jest na wiele podrozdziałów ze względu na mnogość wykorzystanych technik. Widać, że opisywane badania zostały zaplanowane w sposób przemyślany i logiczny, tak aby potwierdzić hipotezę i cele szczegółowe. Eksperymenty dotyczyły 1) wypracowania kompleksowej ścieżki oceny skuteczności, precyzji i bezpieczeństwa edytorów zasad cytozynowych w formie mRNA, (analiza skuteczności edycji *on-target*, profilu mutacji *off-target* oraz odpowiedzi komórkowej na poziomie transkryptomycznym) oraz 2) utworzenia modelu komórkowego raka płaskonabłonkowego skóry związanego z recesywną dystroficzną postacią pęcherzowego oddzielania się naskórka.

Bardzo ważną kwestią jest proponowana w dyskusji przez Doktorantkę ścieżka postępowania projektowania i oceny bezpieczeństwa zastosowania edytorów zasad w formie mRNA. Jest to narzędzie, które jak sama Doktorantka wskazuje stanowi punkt wyjścia dla dalszych badań, niemniej jednak stanowi wypracowaną cenną podstawę do takich badań.

Zwraca uwagę też szeroko dyskutowane bezpieczeństwo użycia edytora zasad w tym możliwość wprowadzania mutacji *bystander*, *off-target* oraz zmian splicingu. W tym kontekście warto podkreślić zwrócenie przez Doktorantkę uwagi na fakt, że zastosowanie edytorów zasad cytozynowych może prowadzić do mutacji typu *bystander* występujących również poza oknem edycji. Do tej pory jak wskazuje Doktorantka, nie był to problem szeroko badany (Doktorantka wykazuje tylko 1 publikację związaną z tym tematem).

Podsumowując, przedstawiona do recenzji dysertacja stanowi ciekawą i ważną analizę, potwierdzając rzetelną wiedzę Doktorantki. Analiza treści rozprawy dowodzi, że Doktorantka potwierdziła założoną hipotezę oraz osiągnęła cele szczegółowe, co nie jest wystarczająco zaznaczone w dyskusji czy wnioskach. Rozprawa doktorska Pani Katarzyny Romańczuk jest na

wysokim poziomie merytorycznym. Wykorzystywane są w niej różne metody badawcze, dowodząc bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę warsztatu badawczego. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę można uznać za oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka udowodniła swoje predyspozycje do samodzielnej pracy naukowej, krytycznej analizy i logicznego wnioskowania.

UWAGI KRYTYCZNE

Mimo bardzo pozytywnej oceny pracy, należy zwrócić uwagę na kilka niedociągnięć:

1. Jak zostało już wspomniane wcześniej nie zostało wyjaśnione w treści rozprawy dlaczego do badania wybrano dystroficzną postać pęcherzowego oddzielania się naskórka.
2. Jak zostało również wspomniane wcześniej nie przedstawiono przyczyn wyboru cytozynowego edytora zasad.
3. W pracy ze względu na brak przewidzianych mutacji *bystander* i odpowiednie położenie pozycji edycji (5-7) wybrane zostały dwa gRNA dla mutacji w genie *COL7A1*: c.1732C>T oraz c.4894C>T. Dobrym nawykiem jest podawanie sekwencji referencyjnej według której oznaczono warianty. Warto by było podać tą informację na stronie 45 w sekcji 7.3.1 Projektowanie gRNA.
4. Str. 86 zawiera stwierdzenie „Dla genów zaangażowanych w odpowiedź przeciwwirusową i sygnalizację interferonu typu I (*RELB* i *STAT1*) obserwowano podobne poziomy zwiększonej ekspresji dla wszystkich zastosowanych gRNA, co wskazywałoby na główną rolę samej cząsteczki mRNA i wprowadzania egzogenne RNA do komórki w aktywacji tych szlaków.” Nie znajduje ono potwierdzenia na wykresie 26. Owszem, ekspresja *STAT1* jest zbliżona we wszystkich grupach, jednakże ekspresja genu *RELB* jest bardziej zróżnicowana.
5. W pracy pojawia się określenie „pęknięcia podwójnej nici DNA” odnoszące się do zerwania obu nici DNA (np. str. 26). W tym przypadku lepszym i jednoznacznym określeniem byłoby dwuniciowe pęknięcia DNA, które to określenie Doktorantka wymienia w spisie skrótów.
6. W części badawczej (Wyniki) można mieć drobne zastrzeżenia do części rycin
 - Rycina 8, str. 66 zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego są nieczytelne
 - W niektórych rycinach brak tłumaczenia wszystkich skrótów np. rycina 42.

Oczywiście są one podane tekście, jednakże z założenia wykres lub rycina powinny być bytem niezależnym od tekstu.

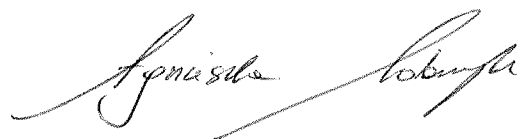
- Rycina 19 i 20 stwierdzenie „Górna lewa 1/3 węzła pokazuje wartości dla grupy Xen, dolna 1/3 dla grupy Mod i górna prawa 1/3 dla grupy Apt” jest dla czytelnika mało zrozumiałe i trudne do zastosowania na wykresach. Być może lepszym rozwiązaniem byłoby zakreślenie linią obszaru dla danej grupy. Dodatkowo dla tych rycin z punktu widzenia czytelnika korzystniej byłoby zamieścić każdy diagram na osobnej stronie.

WNIOSKI KOŃCOWE

Zwracając uwagę na aktualność tematyki rozprawy doktorskiej Pani Katarzyny Romańczuk, ważność celów a także logikę i spójność pracy, należy uznać, że rozprawa doktorska jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego, potwierdza wysoki poziom wiedzy teoretycznej i umiejętność samodzielnego prowadzenia prac badawczych.

W związku z tym, stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust.1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz. U. z dnia 2024 r. poz.1571 z późn. zm.) oraz wnioskuje o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dyscyplinie nauki medyczne.

Dodatkowo, biorąc pod uwagę wkład pracy Doktorantki, opanowanie i wykorzystanie w pracy wielu technik zarówno laboratoryjnych jak i bioinformatycznych, a także ważność tematyki rozprawy składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Romańczuk pt. „Translacyjna ocena bezpieczeństwa edytorów zasad cytozynowych w modelu komórkowym nowotworu związanego z recesywną dystroficzną postacią pęcherzowego oddzielania się naskórka”.



dr hab. n. med. Agnieszka Adamczyk