



UNIwersytet Medyczny
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 24.06.2026
L.dz. 105

Prof. dr hab. Dorota Diakowska
Zakład Biologii Medycznej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wrocław, dn. 22.06.2026r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

mgr Katarzyny Romańczuk

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk

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

Promotorzy:

Dr hab. Łukasz Łaczmanski, prof. IITD PAN

Dr hab. Joanna Jacków-Malinowska

Rozwój technologii edycji genomu otworzył nowe perspektywy leczenia chorób monogenowych, które do niedawna uznawano za schorzenia trudne lub niemożliwe do skutecznego leczenia przyczynowego. Szczególnie obiecującą grupę narzędzi inżynierii genetycznej stanowią edytory zasad, pozwalające na precyzyjną korektę mutacji punktowych (bez wystąpienia genotoksyczności towarzyszącej wcześniejszym narzędziom jak CRISPR/Cas9) odpowiedzialnych za znaczną część chorób wrodzonych i nowotworowych. Wobec szybko rosnącej liczby badań przedklinicznych i klinicznych wykorzystujących te technologie w opracowaniu nowych terapii genowych, kluczowego znaczenia nabiera ocena ich bezpieczeństwa biologicznego, obejmująca nie tylko skuteczność edycji docelowej, ale również potencjalne skutki uboczne na poziomie genomu i transkryptomu komórek.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w formie monografii naukowej liczy 141 stron maszynopisu i zawiera 50 rycin, 2 tabele oraz 201 pozycji piśmiennictwa. Układ pracy oceniam jako prawidłowy, kolejność poszczególnych rozdziałów w tekście jest zgodna z przyjętymi zasadami przygotowania rozpraw naukowych i zapewnia właściwą prezentację problemu badawczego. Praca zawiera wszystkie niezbędne elementy rozprawy doktorskiej, tj.

streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp przybliżający tematykę pracy i uzasadniający wybór tematu, jasno określony cel badania, opis materiału i metod, prezentację wyników, ich omówienie wraz z częścią dotyczącą ograniczeń pracy, wnioski oraz wykaz piśmiennictwa. Jednak z formalnego punktu widzenia wskazane byłoby rozpoczynanie każdego głównego rozdziału pracy od nowej strony, co pozwoliłoby zwiększyć czytelność rozprawy.

Wstęp zawiera aktualny stan wiedzy dotyczący badanego zagadnienia. Doktorantka przedstawia najpierw charakterystykę recesywnej dystroficznej postaci pęcherzowego oddzielania się naskórka (RDEB), następnie omawia współczesne możliwości terapii genowych i stosowane w nich narzędzia, niepożądane efekty działania cytozynowych edytorów zasad, kolejno rolę struktury mRNA w skuteczności, bezpieczeństwie i precyzji wprowadzania modyfikacji genomu wraz z uwzględnieniem możliwych zastosowań terapeutycznych. Klamrą spinającą kontekst tego rozdziału jest charakterystyka etiologii raka płaskonabłonkowego skóry związanego z recesywną dystroficzną postacią pęcherzowego oddzielania się naskórka (RDEB-SCC). Liczba i zakres poruszonych we *Wstępie* zagadnień świadczą o bardzo dobrej znajomości literatury przedmiotu. Opis ten znakomicie uzasadnia potrzebę prowadzenia badań nad bezpieczeństwem i skutecznością cytozynowych edytorów zasad dostarczanych w postaci mRNA. Jednak, biorąc pod uwagę dynamiczny rozwój technologii base editing, cennym uzupełnieniem *Wstępu* byłoby odniesienie się do informacji naukowych dotyczących klinicznego wdrażania tej metody, zwłaszcza u chorych na anemię sierpowatokrwinkową oraz rozwijanych obecnie terapii in vivo opartych na dostarczaniu edytorów zasad z wykorzystaniem nanocząstek lipidowych.

Główny cel pracy oraz hipoteza badawcza i cele szczegółowe zostały sformułowane w precyzyjny i spójny sposób, co świadczy o naukowej dojrzałości Doktorantki. Należy podkreślić, że cele szczegółowe zostały zaplanowane w sposób umożliwiający systematyczną realizację celu głównego oraz rzetelną weryfikację postawionej hipotezy badawczej.

Rozdział *Materiały i metody* został opracowany bardzo starannie i szczegółowo. Podkreślić należy, że szeroki zakres metod badawczych to najmocniejsza strona recenzowanej rozprawy. Praca łączy metody z zakresu biologii molekularnej, genomiki, transkryptomiki, bioinformatyki, analizę *off-target*, modelowanie białek oraz zastosowanie funkcjonalnych testów komórkowych. Moją uwagę zwrócił zaprezentowany na początku rozdziału plan

badania wraz ze schematem logicznie uporządkowanych działań, służących ocenie skuteczności, precyzji i bezpieczeństwa edytora zasad cytozynowych BE3 wprowadzanego do komórek w formie konstruktów mRNA z wymiennymi sekwencjami regulatorowymi. Na szczególne wyróżnienie zasługuje również wykorzystanie przez Doktorantkę nowoczesnych i komplementarnych metod badawczych takich jak: Nano-OTS i CRISPRroots służących analizie mutacji *off-target*, modelu predykcyjnego CBEdeepoff do oceny wydajności edycji poza miejscem docelowym czy walidacji przewidywanych miejsc *off-target* przy pomocy sekwencjonowania nanoporowego z wykorzystaniem Adaptive Sampling. Zastosowane metody świadczą o bardzo dobrej znajomości współczesnego warsztatu biologii molekularnej, genomiki i bioinformatyki. Opisy metod są miejscami bardzo szczegółowe, jednak w mojej ocenie jest to w pełni uzasadnione stopniem ich znacznej złożoności.

Rozdział *Wyniki* został przygotowany bardzo starannie, z użyciem blisko 50 rycin, które w sposób znaczący ułatwiają zrozumienie uzyskanych danych. Rozdział ten charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym. Na podkreślenie zasługuje fakt, że uzyskane wyniki przedstawiono w sposób zgodny z przyjętym planem badania i sformułowanymi wcześniej celami badawczymi. Wyróżniające jest właściwe połączenie wyników eksperymentalnych z zaawansowanymi analizami bioinformatycznymi, obejmującymi ocenę skuteczności i bezpieczeństwa zastosowanego cytozynowego edytora zasad, analizę transkryptomyczną oraz kompleksową identyfikację miejsc *off-target*. W przeprowadzonym badaniu Doktorantka wykazała ograniczoną liczbę rzeczywistych mutacji *off-target* oraz brak zwiększonego poziomu niepożądanych zmian w transkryptomie po zastosowaniu edytora dostarczanego w formie mRNA, co jest istotnym wynikiem w ocenie bezpieczeństwa tego narzędzia.

Jednym z najciekawszych wyników pracy jest obserwacja mutacji *bystander* poza wyznaczonym oknem edycji CBE, co w przyszłości należałoby uwzględnić przy projektowania gRNA oraz ocenie bezpieczeństwa terapeutycznego.

Kolejnym etapem badania było opracowanie modelu komórkowego raka płaskonabłonkowego skóry związanego z recesywną dystroficzną postacią pęcherzowego oddzielania się naskórka. Przeprowadzone analizy potwierdziły skuteczność uzyskanych modyfikacji genetycznych, a jednocześnie wykazały brak istotnych zmian w podstawowych parametrach morfologicznych i proliferacyjnych badanych komórek, co zwiększa wartość otrzymanego modelu dla przyszłych badań.

W rozdziale *Dyskusja* mgr Katarzyna Romańczuk dokonuje krytycznej interpretacji uzyskanych wyników badania w kontekście aktualnego stanu wiedzy, odnosząc własne obserwacje do licznych doniesień literaturowych. Wysoko oceniam m. in. fragment dotyczący bezpieczeństwa terapii genowych z zastosowaniem cytozynowych edytorów zasad oraz zwrócenie uwagi na potencjalne konsekwencje biologiczne i kliniczne wykrytych mutacji *off-target*.

Istotną częścią rozprawy jest analiza zmian transkryptomicznych i zdarzeń alternatywnego splicingu, jednak w rozdziale *Dyskusja* brak omówienia, które z obserwowanych zmian mogą posiadać znaczenie biologiczne oraz jakie mogłyby być funkcjonalne konsekwencje zaobserwowanych zmian.

Cenne naukowo jest omówienie wyników związanych z opracowaniem modelu komórkowego raka płaskonabłonkowego skóry związanego z recesywną dystroficzną postacią pęcherzowego oddzielania się naskórka. Doktorantka prawidłowo interpretuje brak istotnych zmian w wybranych parametrach funkcjonalnych komórek, wskazując jednocześnie możliwe przyczyny obserwowanych zjawisk oraz ograniczenia zastosowanego modelu badawczego.

Na zakończenie rozdziału *Dyskusja* opisano i zaprezentowano w postaci graficznej schemat ścieżki projektowania i oceny profilu bezpieczeństwa zastosowania edytorów zasad w formie mRNA, co nadaje rozprawie doktorskiej wymiar praktyczny z istotną wartością aplikacyjną.

Znamiennym elementem rozdziału jest również część dotycząca ograniczeń przeprowadzonych badań, która wskazuje na krytyczne podejście Doktorantki do własnych wyników i jest wskaźnikiem Jej dojrzałości naukowej.

Wnioski z przeprowadzonego badania, ujęte w 11 punktach, zostały sformułowane zwięźle i prawidłowo, w oparciu o założone cele badawcze.

Bibliografia wykorzystana w rozprawie jest obszerna (201 pozycji), aktualna i adekwatna do podejmowanej problematyki badawczej. Warto podkreślić, że aż 57% cytowanych prac zostało opublikowanych w ostatnich sześciu latach, co wskazuje na uwzględnienie najnowszego stanu wiedzy z omawianej dziedziny.

Podsumowując, mgr Katarzyna Romańczuk podjęła się zadania kompleksowej oceny skuteczności i bezpieczeństwa cytozynowych edytorów zasad dostarczanych w postaci mRNA, wykorzystując szeroki zakres nowoczesnych metod biologii molekularnej, genomiki oraz analiz bioinformatycznych. Postawione cele badawcze zostały zrealizowane w pełnym zakresie, a uzyskane wyniki mają charakter oryginalny i wnoszą istotny wkład do rozwoju

metod oceny bezpieczeństwa edytorów zasad stosowanych w terapiach genowych. Recenzowana rozprawa doktorska charakteryzuje się bardzo wysoką wartością merytoryczną i metodologiczną. Na podkreślenie zasługuje również znaczący potencjał aplikacyjny przeprowadzonych badań w kontekście rozwoju przyszłych terapii genowych.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Romańczuk zawiera oryginalne, bardzo wartościowe wyniki i spełnia warunki określone w art. 187 ust.1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. 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.

Mając na uwadze wysokie walory merytoryczne i aplikacyjne pracy wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Signed by / Podpisano
przez:

Dorota Danuta Dłakowska

Date / Data: 2026-06-22
19:01