



prof. dr hab. Michał Dadlez  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
ul. Pawińskiego 5A  
02-106 Warszawa  
tel. 0-22 5923470-75  
e-mail: [michald@ibb.waw.pl](mailto:michald@ibb.waw.pl)

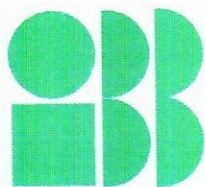
Wpłynęło dnia 2021-03-29 *AP*

Warszawa, 10.03.2021

**Recenzja pracy doktorskiej p. mgr Dominiki Strzeleckiej pt. „Jakościowa i ilościowa analiza nukleotydów o znaczeniu biologicznym lub terapeutycznym przy użyciu spektrometrii mas.”**

Pracy doktorska p. mgr Dominiki Strzeleckiej pt. „Jakościowa i ilościowa analiza nukleotydów o znaczeniu biologicznym lub terapeutycznym przy użyciu spektrometrii mas” podsumowuje własne wyniki badań zaprezentowane w czterech już opublikowanych pracach eksperymentalnych i jednej będącej w przygotowaniu. Kandydatka jest w trzech z tych prac pierwszym autorem. Wyniki były prezentowane na 17 konferencjach, 11 razy w formie plakatu i 6 razy w formie prezentacji ustnej. Otrzymane rezultaty opisano w opracowaniu przygotowanym w formie klasycznej rozprawy doktorskiej. Treść rozprawy została bardzo precyzyjnie podzielona na niewielkie objętościowo podrozdziały, co znacznie ułatwia lekturę tekstu. Prezentację wyników poprzedzono obszernym przeglądem literaturowym i opisem stanu metodyki badań dobrze uzasadniającym potrzebę podjęcia przedstawionych działań w dobie olbrzymiego zainteresowania oligomerami i polimerami nukleotydów, a także zmodyfikowanymi nukleotydami jako potencjalnymi terapeutykami. Usystematyzowanie analityki dotyczącej nukleotydów, w tym modyfikowanych, któremu poświęcona jest praca, wydaje się w sposób oczywisty niezbędne. Spektrometria mas jest powszechnie używana jako metoda referencyjna do analiz ilościowych najróżniejszych związków o znaczeniu biologicznym, w tym nukleotydów, niemniej doktorantka znalazła swoją niszę, wypełniając poprzez swoją pracę istniejącą lukę.

W pracy dokonano usystematyzowania aparatu analitycznego analiz jakościowych i ilościowych związków nukleotydowych i zaprezentowano przykłady zastosowań, zarówno w badaniach o charakterze poznawczym jak i aplikacyjnym. Prezentacja wyników składa się z dwóch części, których schemat przedstawia rys. 32. Pierwsza część, opisana w rozdziale 5.3, dotyczy jakościowej analizy nukleotydów, natomiast druga – ilościowego oznaczania nukleotydów w próbkach biologicznych takich jak ekstrakty komórkowe czy mieszaniny po reakcjach enzymatycznych. Wynikiem pierwszego etapu było skonstruowanie własnego warsztatu badawczego w formie unikalnej bazy danych fragmentacyjnych 150 związków i procedur pomiarów ilościowych MS. Wymagało to szeregu eksperymentów optymalizacyjnych, nie tylko dotyczących parametrów pomiaru MS, jak np. parametry źródła jonów, ale też warunków chromatografii cieczowej i sposobu przygotowania próbek. W niektórych przypadkach przypisanie jonów



fragmentacyjnych, wymagało syntezy i analizy związków znakowanych izotopowo. Jako podstawę przyjęto dogłębnie zanalizowane widma mono-, di- i trifosforanów nukleozydów, budując na niej bibliotekę widm poszczególnych ich modyfikacji i proponując ścieżki fragmentacyjne. Na koniec przygotowano bazę danych dostępną dla potencjalnych użytkowników, co samo w sobie stanowi znaczące osiągnięcie. Choć bazy widm fragmentacyjnych już istnieją, zawierają one dane dotyczące niemodyfikowanych, naturalnie występujących nukleotydów. Autorka potraktowała zagadnienie w sposób bardziej kompletny i korzystając z dostępnych w grupie bibliotek zmodyfikowanych nukleotydów opracowała dane dotyczące 150 związków, również izobarycznych i izomerycznych, co daje dużo lepsze podstawy zrozumienia ścieżek fragmentacyjnych. Cenna jest przeprowadzona weryfikacja stabilności wzorów fragmentacyjnych przy zastosowaniu różnych warunków przygotowania próbki i parametrów pomiaru MS i przy zastosowaniu różnego typu spektrometrów mas (Sciex, QTRAP 3200, Orbitrap).

Zbudowany w ten sposób kompletny aparat analityczny nie powstał z abstrakcyjnej potrzeby wypełnienia luki, lecz z konkretnej potrzeby grupy badawczej. Stworzenie katalogu danych fragmentacyjnych i lepsze zrozumienie tego procesu posłużyło do zaprojektowania metod LC-MS/MS do analizy metabolizmu pronukleotydów, nukleotydów, analogów nukleotydów, analizy ścieżki degradacji struktury „cap” (rozdz. 5.4) i fluorescencyjnych sond nukleotydowych (rozdz. 5.5) oraz procesów degradacji mRNA od końca 3' w zależności od jego składu (rozdz. 5.6). Choć procesowi degradacji mRNA poświęcono wiele badań, pozostają nadal białe plamy, które Autorka starała się wypełnić, na przykład analizując wzajemną rolę enzymów dekapujących DcpS i Fhit w degradacji struktury czapeczki (kapu) w komórce. Z kolei inżynieria mRNA ma niebagatelne znaczenie aplikacyjne, co uzasadnia metody analizy procesów efektywności wbudowywania analogów ATP przez polimerazy RNA w obrębie RNA, w szczególności ogona poli(A) oraz degradacji modyfikowanych wersji mRNA, mających na celu uzyskanie produktów o przedłużonym czasie życia. Wykonane badania opisano jasno i przejrzyście, z nielicznymi wyjątkami opisanymi poniżej.

Metabolizm wariantów czapeczki badano w ekstraktach komórek HEK293, śledząc czasowe zmiany sygnałów MS znakowanych izotopowo substratów i metabolitów w obecności i nieobecności selektywnych inhibitorów enzymów degradujących (rozdz. 5.4). Wyniki pozwoliły zaproponować ścieżkę degradacji tej struktury końca 5' mRNA. Podobnie, śledząc względne ilości odpowiednich jonów fragmentacyjnych analizowano stabilność potencjalnych proleków - nukleotydów modyfikowanych tryptaminą i nukleotydowych sond fluorescencyjnych (rozdz. 5.5). Rozdział 5.4.3 wbrew tytułowi nie zawiera informacji o optymalizacji parametrów pomiarowych MS zwyczajowo przeprowadzanych w procedurach MRM celem uzyskania jak największej czułości, lecz jedynie opis doboru metody LC. Czy optymalizacja parametrów MRM była prowadzona i jakie parametry optymalizowano?

Kolejnym kierunkiem badawczym (rozdz. 5.6) była metodyka analizy składu produktów syntezy mRNA wykonywanej z udziałem modyfikowanych nukleotydów, szczególnie umieszczonych w obrębie ogona poli(A). Porównywano preferencje substratowe polimeraz używanych do transkrypcji *in vitro* poprzez analizę składu produktów poddanych degradacji enzymatycznej. Metoda ta została też użyta do oceny stabilności mRNA modyfikowanych na końcu 3' po to, by uzyskiwać konstrukty o zwiększonej stabilności/wydajności translacyjnej. Badano efektywność degradacji różnej długości mRNA z

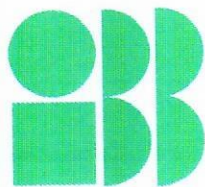


wbudowanymi modyfikowanymi nukleotydami. W tym celu opracowano metodykę LC-MS oznaczeń ilościowych przewidywanych nukleotydowych produktów degradacji różnymi enzymami. Zastosowano analizę ilościową z użyciem kalibracji wewnętrznej znakowanymi izotopowo wariantami nukleotydów. Prezentacja wyników analiz ilościowych nie jest jednak spójnie i konsekwentnie stosowana w toku rozprawy. Na rysunkach 48,49,50,51 stosuje się miarę „Względne intensywności”. Potem, w rozdziale 5.5.1 w analizie pronukleotydów w ekstraktach komórkowych, na osi pionowej w rys. 54 pojawia się wartość „Względne ilości”, obliczone jak zadeklarowano na podstawie przygotowanych krzywych kalibracyjnych. Nie podano jednak „względem czego”, nie podano też jakie krzywe kalibracyjne tu stosowano i jak prowadzą one do uzyskania wartości określanej jako „Względna ilość”. Opis przygotowania krzywych kalibracyjnych dla związków 25-32 można znaleźć na str. 134 w rozdziale 7.4.5-6, gdzie pokazano na rys. 70 krzywe kalibracyjne dla tych związków. Forma krzywych kalibracyjnych z rys. 70 nie jest zgodna z opisem podanym w rozdziale 7.4.5, gdzie podano, że podczas tworzenia krzywej odkładano na osi pionowej stosunek stężeń analitu i znakowanego izotopowo wzorca (nie podano tu jakiego), a na poziomej stosunek intensywności sygnału analitu i wzorca. Należałoby się spodziewać, że takie wartości znajdują na rys. 70 na str. 134 i że na rys. 54 na osi pionowej znajdzie się albo stężenie analitu (bo określeniu stężenia analitu temu służy użycie krzywej kalibracyjnej), albo chociaż wartość stosunku stężenia analitu do wzorca, bo tę wartość odczytuje się zazwyczaj wprost z krzywej kalibracyjnej. Tymczasem na rys. 70 i 54 są inne wartości, w dodatku różne, na rys. 70 to „Intensywność sygnału”, tak jakby nie uwzględniano tu wzorca, a na rys. 54 „Względne ilości”. Rys. 70 wydaje się pokazywać jedynie zależność stężeniową sygnału podanych związków (na rys. 32 i rys. 70 oznaczonych dla odmiany liczbami 1-7) w odniesieniu do  $m^7GDP$ , które można uzyskiwać bez udziału wzorca wewnętrznego. Z kolei rys. 54 prezentuje „Względne ilości” jak należy się domyślać podane względem początkowego stężenia/sygnału?? substratu, a nie stężenia, których należałoby oczekiwać. Wyżej podniesione niejasności co do sposobu zastosowania wzorca wewnętrznego dla uzyskania tego rezultatu należałoby wyjaśnić podczas obrony. Tym bardziej, że krok dalej, na rys 58 D i rozdz. 5.6.2.2 znajduje się opis przygotowania krzywej kalibracyjnej w pełni prawidłowy, podano jakie związki były użyte w charakterze wzorców i na rys. 63 podano na osi pionowej stężenia analitów.

Na str. 106 z kolei określono optymalne stężenie enzymu degradującego SVDPE na  $3\mu M/ml$ , podczas gdy na następnej stronie stosuje się  $9\mu M(?) / ml$ , czyli jak się można domyślać  $9\mu g/ml$ , które jak wynika z informacji podanej na stronie poprzedniej (rys. 61C) prowadzi do nadmiernej desulfurylacji AMPS. Ta niekonsekwencja też prosi się o wyjaśnienie.

Następna niekonsekwencję wypada odnotować na str. 111 gdzie podano, że obie metody pomiaru długości poli(A), z użyciem żeli (panel A,B rys. 64), lub LC-MS (panel E,F rys 64) powinny szacować średnią długość produktu i być względem siebie komplementarne. Na stronie 112 doktorantka zmienia definicję i stwierdza, że obie metody jednak mierzą odmienny parametr - żele dominującą długość ogona, a LC-MS – wartość średnią, ta definicja jest spójna z obserwowanymi dużymi różnicami.

Co oznacza definicja cAMP, cGMP jako stężenia AMP, GMP w RNA? Stężenie zazwyczaj służy jako miara ilości w objętości i jest tak mianowane.



Ostatnie zdanie na str. 117 wymagałoby jednak wyjaśnienia, do których danych ta informacja się odnosi. 6% zawartości ATPaS mogłoby odnosić się do słupka 9:1 na rys 66 B, dla którego spadek wydajności degradacji pokazany na rys. 69 A jest znaczny, ale trudno w tym przypadku mówić o „niemal całkowitej odporności na degradację”.

Z recenzenckiego obowiązku należy też odnotować kilka drobnych uchybień opisu spektrometrii mas i procesu pomiaru mas, który jest miejscami uproszczony i nieprecyzyjny. Ruch jonów wewnątrz spektrometru nie polega tylko na ich przyspieszaniu, pominięto istotne nowe typy analizatorów, które scalają funkcje analizy i detekcji w jednym, np. rys 15 nie uwzględnia kluczowych obecnie analizatorów tj. ICR i Orbitrap. Pojawiają się one dopiero na str. 45. Rys. 18 - do kompletu wypadałoby wspomnieć jeszcze o Parallel Reaction Monitoring. Zdanie „Wyselekcjonowane jony trafiają do detektora, którym najczęściej jest powielacz elektronowy” też już jest mylące, bo w bardzo ważnych najnowszych konstrukcjach nie ma już wydzielonego detektora. Zdanie „Analizator TOF umożliwia najszerszy zakres pomiaru masy od kilku Da do ponad 100 kDa” brzmi nieprofesjonalnie w obliczu możliwych pomiarów mas przekraczających 1 MDa w trybie Native. „ESI posiada wiele zalet takich jak możliwość analizy masy małych i dużych cząsteczek (do 70 000 Da), pikomolowa czułość” – skąd te informacje, mierzy się masy o wiele większe z lepszą czułością. O komorze kolizyjnej: „Zachodzi tam zjawisko dysocjacji indukowanej kolizyjnie (collision induced dissociation, CID).” – tak jakby CID był jedyną metodą fragmentacji. „IMS pozwala na pomiar zarówno masy, jak i wielkości biomolekuł w fazie gazowej, przez co możliwe jest określenie struktury przestrzennej i stabilności pojedynczych cząsteczek, a także dużych wieloskładnikowych kompleksów.” Co autorka ma na myśli mówiąc o określeniu struktury przestrzennej na podstawie pomiaru przekroju czynnego, wartość przekroju czynnego nie pozwala na „określenie struktury przestrzennej” - brak tu precyzji.

Angielskie „electrospray” spolszcza się zazwyczaj jako elektrorozpylanie a nie elektrosprej. W streszczeniu angielskim tłumaczenie wydaje się czasami nieporadne: „mRNA carries codes from the DNA in the nucleus to the sites of protein synthesis in the cytoplasm.” jako odpowiednik: „Funkcją mRNA jest przenoszenie informacji genetycznej z DNA na sekwencję peptydów”. Albo: „instrumental in understanding natural metabolic processes as well as disease diagnostic and discover their therapeutic properties.” jako odpowiednik: „...pozwala na lepsze poznanie ich ścieżek metabolicznych, funkcji biologicznych i potencjalnych właściwości terapeutycznych.”

W podpisach pod rysunkami Autorka często używa formy „Na podstawie”, co sugeruje modyfikację tych rysunków. Informacja „Rysunek z pracy...., z modyfikacją” usunęłaby tę wątpliwość, jeśli bez, to po prostu „Rys zaczerpnięty z pracy...”.

Powyższe uwagi dotyczą warstwy prezentacyjnej, czy redakcyjnej pracy, w najmniejszym stopniu nie wpływają na bardzo pozytywną ocenę merytoryczną pracy. Przedstawiony zestaw badań jest ponadstandardowo obszerny, stanowi logiczny ciąg bardzo ważnych działań, od przygotowania narzędzi badawczych do ich wykorzystania dla uzyskania ważnej nowej wiedzy podstawowej, ale też informacji o aplikacyjnym charakterze. W podsumowaniu, pani mgr Dominika Strzelecka uzyskała rezultaty o istotnej wartości, obrany kierunek niewątpliwie będzie rozwijany w przyszłości. W przedstawionej rozprawie



Autorka jasno opisała uzyskane rezultaty. Powyższa ocena pozwala wnioskować o dopuszczenie p. mgr Dominiki Strzeleckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jedynie niespełnienie kryterium „odkrycia naukowego”, jedyna publikacja która opisuje stricte odkrycie naukowe jest dopiero w przygotowaniu, nie pozwala na wnioskowanie o wyróżnienie rozprawy, wartej tego ze względu na systematyczność ujęcia ważnego obszaru badawczego, którego rezultaty zaowocują w przyszłości i pomogą licznym następcom w ich pracy.

prof. dr hab. Michał Dadlez