



Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Instytut Fizyki
Katedra Biofizyki
Pracownia Spektrometrii Mas

Plac Marii Curie-Skłodowskiej 1, 20-031 Lublin
tel. (+48 81) 5376178, fax (+48 81) 537 61 91
e-mail: Andrzej.Pelc@poczta.umcs.lublin.pl

Dr hab. Andrzej Pelc,
prof. UMCS

Lublin, 19.02.2021

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

W obecnych czasach w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie bardzo dynamicznie rozwijane są badania na styku biologii, chemii i fizyki. Dzieje się tak głównie dlatego, że wyniki takich badań niosą ze sobą ogromny potencjał aplikacyjny. W tę tematykę badawczą bardzo dobrze wpisują się również badania związane ze strukturą, stabilnością i możliwym przebiegiem reakcji nukleotydów. Ostatnie – pandemiczne czasy jednoznacznie pokazują, że badania tego typu obiektów są niesłychanie istotne. Można tu wspomnieć sprawę wytworzenia i podawania ludziom szczepionek przeciw covid-19 na bazie mRNA. Choćby z tego powodu badania mRNA, jego stabilności i potencjalnych produktów rozpadu są niezwykle interesujące i ważne.

Nie inaczej rzecz się ma z badaniami mgr D. Strzeleckiej. Doktorantka zajmuje się badaniami nukleotydów - molekuł uczestniczących w syntezie kwasów nukleinowych, które biorą udział w ekspresji genu. Aktualny stan wiedzy na temat tych związków jest ciągle niekompletny i wymaga dalszych badań. Należy pogratulować Doktorantce, ale również i Promotorowi prof. dr. hab. Jackowi Jamielitemu intuicji badawczej i doskonałego wyczucia czasu z wstrzeleniem się w tematykę badawczą i wykonaniem prezentowanych w rozprawie badań.

W rozprawie wiele miejsca poświęca się również technice badawczej - spektrometrii mas. Technika ta umożliwia stosunkowo łatwe rozpoznanie, zarówno pod względem ilościowym jak i jakościowym analizowanej substancji. Dzięki opracowaniu nowych metod jonizacji tzw. „miękkiej jonizacji” spektrometria mas umożliwia badanie dużych molekuł o masach sięgających nawet kilku milionów jednostek mas

atomowych. Jeśli dodamy tu również dużą czułość techniki to jest to wręcz idealne narzędzie do badań zarówno DNA, RNA jak i związków wchodzących w ich skład, co też zostało wykorzystane w prezentowanych w rozprawie badaniach.

Przedstawiona do oceny rozprawa obejmuje 151 stron. Praca składa się z 8 głównych rozdziałów, w których umieszczone są: streszczenie, opis celów pracy, przegląd dotychczasowej wiedzy dotyczącej badanych obiektów i ich biologiczne znaczenie, opis metod badawczych, wyniki badań, ich dyskusja i wnioski. Dodatkowo w pracy umieszczono również listy skrótów oraz odnośników literaturowych. Rozprawa zawiera również 5 tabel i 70 wykresów i schematów, które dodatkowo ilustrują temat pracy.

Bibliografia składa się z 232 pozycji źródłowych bezpośrednio związanych z problemami rozważanymi w pracy. Zdecydowana większość publikacji ukazała się w ciągu ostatnich 10 lat. To pokazuje, że temat pracy jest bardzo aktualny, wciąż nie do końca poznany i interesują się nim inne grupy naukowe. Dokonania publikacyjne mgr D. Strzeleckiej są imponujące – jest ona współautorem 7 publikacji w międzynarodowych periodykach oraz 10 komunikatów konferencyjnych.

Jednym z głównych celów rozprawy było opracowanie metod umożliwiających na podstawie widm fragmentacyjnych rozpoznanie związku ulegającego jonizacji. Na podstawie otrzymanych rezultatów stworzono bazy widm pozwalających na łatwą identyfikację nukleotydów. Kompleksowe badania RNA i mRNA wraz z rozwinięciem metodyki masowo-spektrometrycznych badań degradacji mRNA oraz wpływu na metabolizm mRNA kilku substancji, a także analiz składu modyfikowanych mRNA, były kolejnym celem Doktorantki. Trzeba tu nadmienić, że pomimo wysoko zawieszanej poprzeczki mgr D. Strzelecka znakomicie poradziła sobie z postawionymi na początku swojej pracy zadaniami.

W rozdziale trzecim Autorka dokonuje przeglądu wiadomości odnoszących się do obiektów swoich badań – nukleotydów. Przedstawiono tu podstawowe informacje dotyczące budowy strukturalnej oraz funkcji nukleotydów w organizmie. Bardzo ważne z punktu widzenia biologii jest również to, że opisano tu również różne modyfikacje nukleotydów i ich znaczenie w funkcjonowaniu organizmu. Modyfikacje takie mogą prowadzić do zaburzeń w biosyntezie innych nukleotydów oraz ich działania koenzymatycznego. Modyfikacje w obrębie DNA lub RNA mogą także powodować zaburzenia w procesach transkrypcji i translacji genów, przez co powodować różnego typu dysfunkcje komórkowe czy powstanie nowotworu. Zmodyfikowane nukleotydy są

też markerami chorób. Modyfikacje mogą również nadać nukleotydowi zupełnie nowe funkcje – np. terapeutyczne. Jedną z częstszych modyfikacji nukleotydów jest ich metylacja oraz przyłączenie protonu i tymi modyfikacjami zajmuje się między innymi Doktorantka w swoich badaniach. W rozdziale tym Autorka odnosi się także do budowy oraz znaczenia mRNA, w szczególności jego końców (5' – kapu, 3' – ogona poli(A)). Zwłaszcza kap jest kluczowym elementem w procesach ekspresji genu. Doktorantka opisuje tu również sposób działania mRNA w komórce. Rozdział ten jest napisany z bardzo dużą rozwagą i przybliża czytelnikowi molekuły będące przedmiotem badań. Niemniej jednak ze względu na dość liczne pojęcia związane z chemią czy biologią dla łatwiejszej – przyjemniejszej lektury pracy przydałby się tu krótki słowniczek zawierający objaśnienia podstawowych pojęć takich jak np. fosforylacja, splicing, depurynacja itp.. Pani mgr D. Strzelecka, jak widać z treści rozprawy, doskonale orientuje się w tych pojęciach, ale rozprawa może również „wpaść w ręce” osób spoza dziedziny nauki jaką zajmuje się Autorka, a wtedy mogą pojawić się problemy z pełnym zrozumieniem treści rozprawy. Treści rozdziału są również doskonale zilustrowane poprzez szereg rysunków, które moim zdaniem ze względu na ilość informacji w nich zawartych w niektórych przypadkach powinny być odrobinę większe – zbyt mała czcionka sprawia, że niektóre wzory strukturalne związków, są mało czytelne.

Rozdział czwarty to opis metodyki badań. Rozdział ten jest uzupełniony przez rozdział 7 – część eksperymentalną na końcu pracy, w którym w szczegółach opisano procedury związane z preparatyką próbek. Przedstawiono tu ideę działania spektrometru mas, a także przybliżono metody jonizacji próbek i analizy powstałych w źródle jonów. Autorka opisuje tu również zastosowania różnych technik spektrometrii mas w kilku dotychczasowych badaniach nukleotydów prowadzonych w innych ośrodkach. Najwięcej uwagi poświęca stosowanej przez siebie metodzie, a mianowicie połączenia chromatografii cieczowej ze spektrometrem mas ze źródłem jonów typu elektrosprej. Mimo, że rozdział ten zawiera obrazowy opis metodyki badań to czuję trochę niedosyt w tym opisie związany z brakiem szczegółów używanej aparatury. Rozpisanie kanałów reakcji jonizacji prowadzących do powstania jonów dodatnich jak i ujemnych zdecydowanie ułatwiłoby interpretację otrzymanych widm masowych. Czytelnik otrzymałby również dodatkową informację o skomplikowanych procesach zachodzących w źródle jonów. Również opis działania kwadrupola jest dosyć skąpy – w moim odczuciu nie było potrzeby podawania równań 5 i 6 bez ich gruntownej analizy.

Parametry a_u i q_u występujące w tych równaniach prawdopodobnie przez przeoczenie jednego słowa opisano jako dotyczące stabilności jonów, a nie trajektorii ruchu. Szkoda również, że Doktorantka nie opisała działania aparatury w trybach pomiaru jonów dodatnich i ujemnych. Brak tych szczegółów sprawia, że pojawia się tu się kilka dodatkowych pytań. Co miała na myśli Autorka pisząc o przyłożonym napięciu do kapilary 700V do 5kV (str. 44)? Co oznacza czas pojawiający się w opisie metody pomiarowej na wykresach z rysunku 18. Czy metoda HILC i HILIC (strona 52 i 53) to te same metody?

Rozdział 5 jest oryginalnym wkładem pani mgr D. Strzeleckiej do dziedziny nauki, którą Autorka się zajmuje. Przeprowadzone badania zostały bardzo starannie zaplanowane jak i wykonane – schemat na rys 32. Badania Doktorantki można podzielić na dwie podstawowe części. W części pierwszej Autorka zajęła się badaniem znanych nukleotydów oraz ich zmodyfikowanych analogów. Dzięki tym badaniom poznała ścieżki fragmentacji nukleotydów. W otrzymanych widmach masowych można rozpoznać wierzchołki pochodzące od poszczególnych części nukleotydów. Co bardzo ważne ścieżki fragmentacji tych związków zostały dodatkowo zweryfikowane podczas badań nukleotydów oznaczonych izotopowo - zsyntetyzowanych przez Autorkę. Warto dodać, że metoda syntezy związków znakowanych izotopowo została również opracowana przez mgr D. Strzelecką. Wyniki z tej części badań stały się podstawą do stworzenia bazy danych (msTide) z widmami fragmentacyjnymi dla ponad 150 nukleotydów. Baza jest ogólnie dostępna i umożliwia szybką identyfikację związków otrzymanych podczas syntezy w innych eksperymentach, wybranych metabolitów leków nukleotydowych czy modyfikacji w obrębie nukleotydów. Jest to bardzo użyteczne narzędzie mogące być pomocne np. w projektowaniu nowych nukleotydów o potencjale terapeutycznym oraz mRNA o dłuższym czasie degradacji.

Równie cenne są wyniki drugiej części badań, dotyczących analizy nukleotydów w próbkach biologicznych. Pani mgr D. Strzelecka w ramach rozprawy zajmowała się zagadnieniami związanymi z metabolizmem mRNA (z zaangażowaniem końców 3' i 5') w procesach komórkowych. Analizowała również naturalne metabolity, pronukleotydy i inne związki uczestniczące w procesach komórkowych. W tych celach Doktorantka opracowała dedykowane metody LC-MS/MS pozwalające na analizę odpowiednich molekuł. Opracowanie tych metod wiązało się z rozpracowaniem reakcji syntezy np. kapu oraz potencjalnych metabolitów znakowanych izotopowo. Bardzo cenne wydają się obserwacje dotyczące działania enzymów DcpS i Fhit - prowadzące

do degradacji kapu. Autorka zaproponowała mechanizm degradacji kapu podczas działania DcpS gdyż okazało się, że ten enzym ma decydujące znaczenie w procesie rozpadu kapu. Wyniki te są bardzo istotne z punktu widzenia projektowania analogów nukleotydów o lepszych parametrach związanych z ich degradacją. W dalszej części rozprawy przedstawiono wyniki badań modyfikacji w wiązaniach 5' i 3' mRNA. Ważnym wnioskiem z tych badań jest to, że mRNA zawierające modyfikacje w ogonie poli(A) są bardziej odporne na degradację co również może mieć znaczenie aplikacyjne.

Wysoki poziom merytoryczny tej części pracy świadczy o bardzo dobrej znajomości Autorki zarówno tematyki badawczej jak i metodyki wykonywania pomiarów przy użyciu skomplikowanej aparatury masowo-spektrometrycznej.

Dodatkowo z obowiązku recenzenta chciałbym przedstawić parę pytań dotyczących nieścisłości dostrzeżonych w tej części rozprawy, a które wymagają wyjaśnienia: Co oznacza energia kolizji (str. 70) i w jaki sposób można ją zmienić? Jakie jest znaczenie skrótów u_a i LOQ użytych w tabeli 3? Co znaczy wyrażenie „wyczerpująca degradacja” (str. 106)?

Podsumowując, rozprawa prezentuje bardzo wysoki poziom treści, a zastosowana metodologia w pełni odpowiada przedmiotowi i celowi pracy. Autorka potrafi analizować uzyskane przez siebie wyniki, a dyskusja odnosi się także do innych wyników z literatury. Uzyskane wyniki są bardzo ważne, oryginalne i niosą ze sobą ogromny potencjał aplikacyjny. Wszelkie, wymienione w niniejszej recenzji niedociągnięcia zauważone w rozprawie oraz drobne błędy edytorskie (literówki) mają raczej niewielkie znaczenie i nie mają większego wpływu na jakość pracy.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana praca zatytułowana “Jakościowa i ilościowa analiza nukleotydów o znaczeniu biologicznym lub terapeutycznym przy użyciu spektrometrii mas” autorstwa mgr Dominiki Strzeleckiej spełnia z naddatkiem wszystkie wymagania dotyczące rozpraw doktorskich opisanych w Ustawie o stopniach i tytułach naukowych w dziedzinie nauki i sztuki z 14 marca 2003 r., wraz z kolejnymi zmianami (Dziennik Ustaw, 21 czerwca 2016 r.). Biorąc powyższe pod uwagę, składam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o przyjęcie rozprawy złożonej przez mgr Dominikę Strzelecką i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

