



Toruń, dnia 19 marca 2021 r.

Recenzja

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

Ocena wyboru tematyki badawczej

Pani mgr Dominika Strzelecka wykonała pracę doktorską pod opieką Pana profesora dr hab. Jacka Jemielitego oraz Pani dr hab. Joanny Kowalskiej w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Tematyka recenzowanej pracy jest ściśle związana z prowadzonymi w tym instytucie od wielu lat badaniami w zakresie syntezy modyfikowanych nukleotydów (w tym znakowanych) oraz RNA o znaczeniu biologicznym, jak również syntezy analogów końca 5' i 3' mRNA oraz ich wykorzystania w badaniach procesu ekspresji informacji genetycznej.

Istotą podjętego problemu naukowego jest poznanie i zrozumienie ścieżek metabolicznych, funkcji biologicznych i potencjalnych właściwości terapeutycznych syntetycznych analogów nukleotydów oraz kwasów nukleinowych. Jest to bardzo aktualna tematyka badawcza. Zgłębienie wiedzy z tego zakresu zainspirowało Doktorantkę do podjęcia badań, których podstawowym celem była analiza jakościowa nukleotydów, jak również opracowywanie metod bazujących na wykorzystaniu techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) do badania metabolizmu i przemian pronukleotydów, nukleotydów, analogów końca 5' mRNA, 3' mRNA oraz syntetycznych RNA. Zastosowanie opracowanych metod miało na celu m.in. zweryfikowanie wpływu różnych inhibitorów białek na metabolizm mRNA; określenie efektywności wbudowywania analogów ATP w strukturę RNA; zweryfikowanie specyficzności substratowej polimeraz RNA; określenie składu modyfikowanych mRNA otrzymywanych w reakcjach transkrypcji *in vitro*; monitorowanie postępu biodegradacji fluorescencyjnych sond molekularnych. Jest to praca o charakterze interdyscyplinarnym z pogranicza chemii organicznej (synteza nukleotydów), chemii analitycznej (opracowywanie metod oznaczania badanych związków) oraz biologii i biochemii (badanie metabolizmu, badania ekstraktów komórkowych, degradacji enzymatycznej). Dla młodego naukowca stanowi to zapewne wyzwanie, gdyż musi on posiadać wiedzę z różnych dziedzin. Uważam, że Pani mgr Dominice Strzeleckiej się to udało.

Ocena formalna i merytoryczna pracy

Z formalnego punktu widzenia oceniana rozprawa doktorska zawarta jest na 151 stronach maszynopisu i ma postać klasycznej rozprawy, której estetyka szaty graficznej zasługuje na wyróżnienie. Opracowanie obejmuje 7 podstawowych części, do których należą: streszczenie, cele, przegląd literaturowy, metodyka, wyniki badań własnych z ich omówieniem, podsumowanie, część eksperymentalna, literatura. Praca jest ilustrowana wykresami, schematami i tabelami. Na podkreślenie zasługuje dobra jakość opracowania wyników.

Strzelecka



Obejmujący 46 stron przegląd literaturowy Doktorantka poświęciła m.in. opisowi budowy i znaczenia biologicznego i terapeutycznego nukleotydów, ze szczególnym uwzględnieniem modyfikacji nukleotydów do celów terapeutycznych. W kolejnej części pracy Pani mgr Dominika Strzelecka przedstawiła zagadnienia związane z budową, syntezą i znaczeniem biologicznym mRNA, a zwłaszcza właściwościami końca 5' i 3'. Ciekawym podrozdziałem jest omówienie ścieżek degradacji mRNA, co jest bardzo istotne w kontekście projektowania, syntezy i stosowania stabilizowanego mRNA, a co było jednym z założeń recenzowanej pracy doktorskiej. Z tego względu uzasadniony jest przegląd literatury dokonany przez Doktorantkę, a poświęcony znaczeniu biologicznemu i terapeutycznemu analogów kapu oraz mRNA, które to powinny stać się konkurencyjne w stosunku do cząsteczek naturalnie występujących w komórkach. Należy podkreślić, że omówiona część pracy doktorskiej jest swego rodzaju wyjaśnieniem przesłanek, które zainspirowały Panią mgr Dominikę Strzelecką do wyboru tematyki badawczej. W związku z tym, że analogi nukleotydów, jak i modyfikowane RNA mają duże znaczenie terapeutyczne i biologiczne istnieje potrzeba udoskonalania metod analizy tych związków w różnego rodzaju matrycach. Z tego względu Pani mgr Dominika Strzelecka krótko opisuje techniki wykorzystywane do badania nukleotydów, oligonukleotydów i mRNA, ze szczególnym uwzględnieniem LC i MS, które to techniki były jej podstawowymi narzędziami analitycznymi w czasie realizacji pracy doktorskiej. Całość zamyka obszerny przegląd dotychczasowych wyników badań kwasów nukleinowych i nukleotydów za pomocą LC-MS. Jest to zdecydowanie najciekawsza część przeglądu literaturowego, która zapewne wymagała od Doktorantki dużego nakładu pracy, ale efekt należy ocenić wysoko. Ta część pracy doktorskiej jest przygotowana starannie i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do badań własnych mgr Dominiki Strzeleckiej. Dobór treści świadczy o dobrym rozeznaniu Doktorantki w literaturze z zakresu prowadzonych badań.

Następny rozdział pracy „Badania własne” to opis przeprowadzonych badań wraz z interpretacją uzyskanych wyników. Wszystkie eksperymenty zostały należycie opisane, a przedstawiony materiał badawczy jest bardzo szeroki i stanowi świetną podstawę do dyskusji i wniosków. Autorka rozpoczyna od przedstawienia szczegółowych wyników badań fragmentacji nukleotydów za pomocą MS. Podkreślić należy nakład pracy Doktorantki podczas badań wpływu różnych warunków na fragmentację, a następnie podczas analizy uzyskanych widm fragmentacyjnych niemodyfikowanych mono-, di- i trifosforanów nukleotydów oraz ich modyfikowanych analogów. Efektem żmudnej pracy jest nie tylko zdobycie wiedzy, którą Doktorantka wykorzystywała w kolejnych etapach pracy badawczej, ale przede wszystkim współudział w tworzeniu bazy danych msTide. Jest to narzędzie, które znajduje już i z pewnością nadal będzie znajdować zastosowanie w różnych dziedzinach, w których analizuje się nukleotydy za pomocą tandemowej spektrometrii mas.

Kolejne rozdziały Pani mgr Dominika Strzelecka poświęciła opisowi wyników badań wykorzystujących LC-MS do jakościowego i ilościowego (w niektórych przypadkach) oznaczania nukleotydów i ich analogów. Opracowana przez Doktorantkę metoda umożliwiła śledzenie procesu degradacji kapu i jego analogów, którymi wzbogacane były ekstrakty komórkowe HEK 293. Wyniki badań pozwoliły na określenie który z enzymów jest w głównej mierze odpowiedzialny za ten proces, przy jednoczesnym poznaniu procesu i określeniu ścieżek

Strzelecka



degradacji, co może być użyteczne podczas projektowania analogów nukleotydów. Poniekąd kontynuacją tych badań było monitorowanie metabolizmu sześciu nowych analogów nukleotydów modyfikowanych tryptaminą w ekstraktach komórkowych. Otrzymane przez Doktorantkę wyniki pozwalają na stwierdzenie, że nukleotydy zawierające w strukturze grupę tiofosforanową mogą działać jako pronukleotydy, uwalniające w procesie metabolizmu m^7 GMPS. Jest to cenny wynik i wniosek, ponieważ dzięki temu związki te mogą znaleźć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

Dużą część badań Doktorantka poświęciła określeniu tego jak modyfikacje wiązań 3',5'-fosfodiesterowych w mRNA lub w obrębie ogona poli(A) wpływają na właściwości mRNA. Przedstawiła sposób otrzymywania zmodyfikowanych cząsteczek RNA oraz wyniki badań LC-MS związane z analizą ich składu. Z dużym sukcesem porównano efektywność działania trzech różnych polimeraz oraz ich użyteczność w syntezie zmodyfikowanych mRNA. Wykorzystanie LC-MS pozwoliło mgr Dominice Strzeleckiej na określenie częstotliwości wbudowywania modyfikowanych nukleotydów w sekwencję mRNA przez polimerazy (co prawda w sposób pośredni, niemniej należy uznać to za dobre osiągnięcie). Co więcej, mRNA, które modyfikowane były w obrębie ogona poli(A) grupami tiofosforanowymi okazały się być mniej podatne na degradację enzymatyczną, co czyni z nich cząsteczki o bardzo wysokim potencjale terapeutycznym.

Należy podkreślić, że Doktorantka w bardzo umiejętny sposób prowadziła swoje badania. Cechuje je duża kompleksowość i systematyczność, co jest niewątpliwą zaletą ocenianej rozprawy. Uzyskiwane przez Panią mgr Dominikę Strzelecką wyniki mają elementy nowości naukowej, czego potwierdzeniem jest ich publikacja w czterech artykułach naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Scientific Reports*, *Chemical Communications*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *RNA*. Sumaryczny IF tych prac wynosi około 16, co jest świetnym osiągnięciem biorąc pod uwagę dorobek naukowy do pracy doktorskiej. Wartym podkreślenia jest fakt, że w dwóch z tych publikacji Pani mgr Dominika Strzelecka jest pierwszą autorką. Ponadto, Doktorantka jest współautorką jeszcze dwóch publikacji oraz 17 wystąpień na konferencjach krajowych i międzynarodowych (6 razy w formie prezentacji ustnej). Uczestniczyła w realizacji projektu Iuventus Plus oraz była kierownikiem projektu Preludium 12. Na realizację pracy doktorskiej uzyskała także finansowanie w ramach programu Etiuda 7. Ma zatem doświadczenie w kierowaniu i realizacji grantów badawczych. Przedstawiony dorobek naukowy pozwala na stwierdzenie, że Doktorantka jest aktywnym młodym naukowcem i potwierdza jej potencjał do dalszego rozwoju naukowego.

Do najważniejszych osiągnięć ocenianej rozprawy doktorskiej zaliczam:

- bardzo kompleksowe badanie procesu fragmentacji nukleotydów oraz sformułowanie ogólnych reguł rządzących tym procesem (identyfikacja modyfikacji, rozróżnianie mono-, di-, trifosforanów, izobarów, izomerów),
- zdeponowanie jonów fragmentacyjnych w bazie msTide dostępnej *on-line*,
- opracowanie metody LC-MS/MS do badania metabolizmu nukleotydów i ich analogów w ekstraktach komórkowych,



- wykorzystanie LC-MS do monitorowania degradacji analogów kapu oraz badanie wpływu czterech inhibitorów wybranych enzymów na procesy degradacji; wykazanie, że głównym enzymem biorącym udział w procesie degradacji kapu jest DcpS, a produktem degradacji mono- i dinukleotydowych pochodnych kapu jest 7-metyloguanozyna,
- zaproponowanie ścieżek degradacji kapu z uwzględnieniem głównych metabolitów i enzymów biorących udział w każdym z etapów,
- opracowanie metody wykorzystującej LC-MS/MS do analizy składu cząsteczek mRNA modyfikowanych na końcu 3' oraz fragmentów RNA z ogonem poli(A),
- określenie efektywności wbudowywania analogów ATP do RNA lub ogona poli(A) i scharakteryzowanie specyficzności substratowej polimeraz,
- wykazanie, że mRNA zawierające w strukturze modyfikację tiofosoranową są bardziej odporne na degradację enzymatyczną w porównaniu z mRNA nieposiadającymi modyfikacji w obrębie ogona poli(A),
- istotny wkład w poszerzenie wiedzy o właściwościach i procesach biodegradacji analogów mRNA, a zwłaszcza końców 3' i 5' tych cząsteczek.

Uwagi szczegółowe

Pani mgr Dominika Strzelecka popełniła drobne błędy językowe i edytorskie, które jako nieistotne dla meritum pracy pozwolę sobie pominąć. Przykrym obowiązkiem recenzenta jest niestety także wskazanie wątpliwości, których wyjaśnienie zapewne będzie możliwe w trakcie obrony. Pozwolę sobie uczynić to poniżej:

- niezrozumiałym jest dla mnie zamienne stosowanie sformułowań „technika” i „metoda”, które mają różne znaczenie;
- stosowanie niepoprawnego nazewnictwa, którego nomenklatura została już unormowana, m.in. elektrosprej (elektrorozpraszanie); analiza ruchliwości jonów (str. 43)/spektrometria mobilności jonów (str. 54) (spektrometria ruchliwości jonów); rozdział w chromatografii cieczowej (sugerowałabym użycie słowa rozdzielanie); chromatografia w odwróconej fazie (chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych/w odwróconym układzie faz); limit detekcji (granica wykrywalności); limit oznaczalności (granica oznaczalności), itp.;
- ciekawi mnie dlaczego Doktorantka zdecydowała się na wielokrotne stosowanie nazw angielskojęzycznych bez ich tłumaczenia na język polski, np. porous graphic carbon (porowaty węgiel grafityzowany), hydrophilic interaction liquid chromatography (chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych), desorption/ionization on silicon (desorpcja/ionizacja na porowatym krzemie), product ion scan (tryb monitorowania jonów potomnych), precursor ion scan (tryb monitorowania jonów pierwotnych/macierzystych), cutrain gas (gaz osłonowy), ion spray voltage (napięcie źródła jonów), itp.;
- str. 53, pierwsze zdanie: Doktorantka zrównuje tryby chromatografii z rodzajami kolumn, co jest dla mnie niezrozumiałe („chromatografia jonowymienna, filtracja żelowa, kolumny monolityczne, kolumny porous graphic carbon, fazy stacjonarne zawierające grupy cyjanowe, fenyłowe, fluorofenyłowe, oraz różne kombinacje tych rodzajów chromatografii”),

Strzelecka



- np. cyjanopropylowe fazy stacjonarne możemy stosować zarówno w HILIC, NP HPLC oraz w niektórych przypadkach w RP HPLC;
- str. 81: Doktorantka pisze: „intensywności poszczególnych sygnałów zależą od struktury nukleotydu, a nie zależą od warunków analizy, przy zastosowaniu tej samej metody jonizacji”. Sądzę, że na intensywność będzie miało wpływ stężenie związków; jakie jest zdanie Doktorantki w tej kwestii? Jeśli tak jest, to nasuwa się pytanie o stężenia i objętości dozowane w trakcie badań np. izomerów i izobarów nukleotydów, itp. (str. 79);
 - stosowanie określeń „metoda uniwersalna”, „uniwersalne narzędzie” jest wg. mnie ryzykowne (a Doktorantka używa ich kilkakrotnie w odniesieniu do opracowywanych metod). Nie sądzę aby dotychczas udało się w nauce taką metodę opracować. Jako metoda uniwersalna musiałaby dawać możliwość oznaczenia każdego związku w każdego rodzaju matrycy. Oczywiście chętnie poznam zdanie Doktorantki na ten temat;
 - rysunek 70: czy na osiach y na pewno są intensywności sygnałów z chromatogramów uzyskanych w trybie MRM? Jeśli są to krzywe kalibracyjne, to na osiach tych powinny się znaleźć pola powierzchni pików; chyba, że piki były bardzo symetryczne, wówczas można założyć proporcjonalność intensywności (wysokości) piku do stężenia;
 - chciałabym zapytać o przygotowanie próbek bezpośrednio przed ich analizą za pomocą LC-MS zwłaszcza w przypadku analiz ekstraktów komórkowych lub próbek RNA po badaniu ich degradacji enzymatycznej (informacji tej nie mogłam znaleźć w opisie wyników i części eksperymentalnej, a jest ona istotna z punktu widzenia jakości uzyskanych wyników);
 - rozdział 5.6.2: proszę, aby Doktorantka wyjaśniła czym jest walidacja i odniosła to pojęcie do opracowywanych przez nią metod. Parametrami walidacyjnymi są m.in. specyficzność, precyzja (odtwarzalność metody i jej powtarzalność), dokładność, zakres liniowości, granica wykrywalności i oznaczalności. Często wyznaczany jest także tzw. efekt matrycy. Poza liniowością w tym rozdziale nie znalazłam żadnego z wymaganych parametrów walidacyjnych. W związku z tym uważam, że być może lepiej byłoby zmodyfikować tytuł podrozdziału i usunąć z niego sformułowanie „walidacja”;
 - rozdział 5.4.3 oraz 5.6.2.1: co Doktorantka ma na myśli pisząc złożę Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography? Jaka to była faza stacjonarna/kolumna? Z jakiego względu jako odczynnik do tworzenia par jonowych w opracowywanych przez Doktorantkę metodach użyto dimetyloheksyloaminy? Jakie było kryterium wyboru parametrów źródła jonów w MS?

Pomimo wspomnianych powyżej uwag i pytań uważam, że Pani mgr Dominika Strzelecka przygotowała pracę doktorską o bardzo aktualnej tematyce i na bardzo dobrym poziomie.

Wniosek końcowy

Podsumowując swoją recenzję stwierdzam, że cele pracy badawczej Pani mgr Dominiki Strzeleckiej zostały zrealizowane, wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są bardzo wartościowe i mają elementy nowości naukowej. Praca spełnia wszystkie wymagania stawiane

Strzelecka



pracom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 187 ust. 1 i 2). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Dominiki Strzeleckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sylwiusz Szulc