



Warszawa, 27 stycznia 2025

Prof. dr hab. Barbara Pałys  
Wydział Chemii  
Uniwersytetu Warszawskiego

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Mgr Katarzyny Cecylii Ratajczak zatytułowanej**  
***Opracowanie systemów bioczuJNIKOWYCH przeznaczonych do wykrywania mRNA surwiwiny i***  
***monitorowania stężenia ATP w komórkach nowotworowych***

Praca doktorska mgr Katarzyny Cecylii Ratajczak została wykonana pod kierunkiem pani profesor Magdaleny Stobieckiej w Katedrze Fizyki i Biofizyki Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Tematyka badań przedstawionych w rozprawie dotyczy wykrywania chorób nowotworowych we wczesnym stadium rozwoju choroby. Tematyka ta jest niezwykle ważna pod względem społecznym, gdyż udoskonalenie narzędzi diagnostycznych mogłoby znacząco poprawić przeżywalność pacjentów. Rozprawa koncentruje się na wykrywaniu mRNA surwiwiny oraz adenozy-no-5'-trifosforanu (ATP) jako markerów nowotworowych. Surwiwina jest białkiem hamującym proces apoptozy, które jest wydzielane nadmiernie przez komórki wielu rodzajów nowotworów. Mimo nadmiernej ekspresji jest to białko trudne do oznaczania analitycznego<sup>1</sup>. mRNA surwiwiny jako marker nowotworowy jest bardzo trafnym wyborem, ze względu na względnie prostszy sposób detekcji w porównaniu do samego białka. Drugą z badanych przez doktorantkę substancji jest ATP, występujący w nadmiarze w tkankach nowotworowych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa składa się z pięciu prac z czego cztery stanowią artykuły oryginalne oraz jeden artykuł przeglądowy. Wszystkie prace opublikowano w czasopismach naukowych o dużych współczynnikach oddziaływania, w tym *Biosensors and Bioelectronics* (IF = 10,257) i *ACS Applied Materials and Interfaces* (IF = 8,456). Dodatkowo pani Ratajczak jest współautorką kolejnych 7 prac oprócz tych składających się na rozprawę. Jej prace były cytowane 509 razy, dając współczynnik h = 9. Jest to znakomity wynik dla naukowca na początku kariery naukowej.

<sup>1</sup> Tsuruma, T. et al. (2010). Targeting Survivin in Cancer Therapy: Clinical Considerations. In: Cecconi, F., D'Amelio, M. (eds) Apoptosome. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3415-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3415-1_16)



Cykl publikacji jest poprzedzony wstępem wprowadzającym w tematykę chorób nowotworowych oraz znaczenie wczesnej diagnostyki. Doktorantka opisuje tło badań, przedstawia cel pracy, najważniejsze wyniki oraz podsumowanie, które zawiera wnioski z badań. Pod względem formalnym wstęp jest bez zarzutu. Jest bardzo starannie napisany. Błędy edytorskie są nieliczne (nie przytaczam). Dobrze wprowadza czytelnika do tematyki publikacji P1-P5.

Szerzej zostały omówione: ekspresja surwiwiny w różnych rodzajach raka oraz metabolizm komórek rakowych i mechanizmy prowadzące do podwyższonego stężenia ATP w mikrośrodku guza. Autorka zwięźle przedstawia podstawy fizykochemiczne proponowanych w dalszej części pracy oznaczeń, czyli zjawisko fluorescencji oraz zjawisko fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii (FRET). Następnie przedstawiła ogólną ideę działania biosensorów, w których elementem receptorowym są aptamery oraz sondy nukleotydowe typu „sygnalizator molekularny”. Aptamery i sondy typu „sygnalizator molekularny” były elementami receptorowymi czujników opisanymi w publikacjach składających się na rozprawę. Następnie opisane są typowe nano-nośniki służące do transportu sond molekularnych przez błony komórkowe. Omówionymi nośnikami są liposomy, które autorka stosuje w publikacjach P1 i P4. Omawia także po krótce tlenek grafenu (GO), który był stosowany jako nośnik w publikacji P2. Autorka przedstawia rolę i przykłady zastosowań GO w biosensorach. Opis jest ciekawy, chociaż można było sięgnąć po inne prace, na przykład grupy Martina Pumery, które opisują szerzej właściwości chemiczne GO. Na zakończenie opisu tła badań autorka przytacza przykłady oznaczeń mRNA surwiwiny zaproponowane przez innych autorów. Wstęp opiera się na 163 pozycjach literaturowych, co świadczy o tym, że doktorantka rzetelnie przedstawiła tło prowadzonych badań. Oprócz wstępu literaturowego jako tło badań można potraktować publikację P3 włączoną do rozprawy. Publikacja ta stanowi przegląd literatury dotyczącej oznaczania surwiwiny i oznaczania mRNA kodującego surwiwinę.

Po nakreśleniu tła badań przechodzi do sformułowania celu rozprawy doktorskiej, w którym autorka stawia sobie dwa podstawowe cele:

1. Opracowanie fluorescencyjnego systemu bioczujnikowego opartego o sondę oligonukleotydową typu „sygnalizator molekularny”, służącego do wykrywania sekwencji nukleotydowej mRNA, kodującej surwiwinę w komórkach nowotworowych.
2. Opracowanie fluorescencyjnego systemu bioczujnikowego opartego o aptamer, służącego do monitorowania poziomu stężenia ATP w komórka nowotworowych.

Określa także hipotezy badawcze:



H1: Wykrywanie ekspresji genu surwiwiny w komórkach nowotworowych może być prowadzone za pomocą sondy nukleotydowej typu „sygnalizator molekularny” z sekwencją komplementarną do sekwencji mRNA odpowiadającej za kodowanie surwiwiny.

H2: Zwiększone zapotrzebowanie energetyczne komórek nowotworowych może być wykrywane poprzez monitorowanie poziomu stężenia ATP w komórkach za pomocą systemu biocujnikowego opartego o aptamer, który wiąże się z ATP.

Realizacji pierwszego z celów poświęcone są publikacje P1 i P2. Najważniejsze elementy publikacji P1 i P2 doktorantka opisuje na stronach 52-56 rozprawy. Najistotniejszym wnioskiem z tego fragmentu pracy jest fakt, że zadanie badawcze 1 zostało wykonane z sukcesem. Publikacje P1 i P2 pokazują, że zaproponowana sonda typu „sygnalizator molekularny” - Sur-MB-Joe nadaje się do wykrywania mRNA surwiwiny w komórkach nabłonka gruczołakoraka okrężnicy SW480, podczas gdy w zdrowych komórkach nabłonka okrężnicy CCD841 sonda nie daje sygnału analitycznego. Oprócz podstawowego celu badawczego, ważnym osiągnięciem naukowym jest przedstawienie struktury drugorzędowej mRNA będącego celem analizy oraz struktur mRNA, które różnią się od badanego zmianą wybranych nukleotydów. Prace P1 i P2 pokazują, że mRNA tworzy strukturę uporządkowaną w odróżnieniu od spodziewanych nieuporządkowanych łańcuchów nukleotydów. W pracy P1 zaproponowano model oddziaływania pomiędzy mRNA a sondą typu sygnalizator molekularny. Model ten jest ważny dla projektowania nowych sensorów mRNA. W pracy P1 sonda Sur-MB-Joe był dostarczana do komórek za pomocą liposomów. W pracy P2 liposomy zastąpiono tlenkiem grafenu. Korzyścią z zastosowania takiego rozwiązania było dodatkowe obniżenie tła fluorescencji Sur-MB-Joe, która była obserwowana w nieobecności docelowego mRNA. Zmniejszenie fluorescencji tła pozwoliło na obniżenie limitu detekcji mRNA surwiwiny z około 26 do 16 nM. Należy podkreślić, że oba limity detekcji są niskie i okazały się wystarczające do rozróżniania chorych i zdrowych komórek. Bardzo istotną zaletą zaproponowanych oznaczeń była bardzo dobra selektywność, gdyż sondy nie reagowały z mRNA różniącym się o zaledwie o jeden nukleotyd.

W pracy P2 przedstawiono możliwe oddziaływania pomiędzy sondą i tlenkiem grafenu oraz ich możliwy wpływ na hybrydyzację sondy i mRNA. Badano także oddziaływanie pomiędzy tlenkiem grafenu i barwnikiem Joe. Udało się wyznaczyć stałą wygaszania Sterna – Volmera i określono proces wygaszania fluorescencji jako statyczny. Wykazano za pomocą dynamiki molekularnej, że zarówno cząsteczki barwnika jak wygaszacza tworzą wiązania wodorowe oraz



oddziaływania pi-pi z powierzchnią tlenku grafenu, co może mieć wpływ na proces wygaszania. Wnioski na temat oddziaływania barwnika z GO są interesujące dla szerokiego grona chemików, gdyż GO jest elementem wielu sensorów.

Prace P4, P5 są poświęcone oznaczaniu innego potencjalnego markera, czyli ATP w komórkach. Do badań wybrano - jak poprzednio komórki nabłonka gruczołakoraka okrężnicy SW480. Komórki inkubowano z inhibitorem syntazy ATP – oligomycyną (P4) lub inhibitorem glikolizy: 2-deosy-D-glukozą – 2-DG (P5) w celu uzyskania zmian stężeń ATP w próbkach. Jako elementy receptorowe wybrano aptamery specyficznie wiążące ATP. Wybrano dwa rodzaje aptamerów: modyfikowane fluoroforem FAM lub fluoroforem i wygaszczaczem. W wyniku tworzenia kompleksów pomiędzy aptamerami i ATP następowało wygaszanie fluorescencji.

Najważniejszymi elementami nowości naukowej w pracach P4 i P5 jest wykazanie, że poziom ATP, który można regulować za pomocą oligomycyny lub 2-DG, jest markerem nowotworowym, który można oznaczać z pomocą proponowanych przez autorkę sond aptamerowych.

Struktury drugorzędowe aptamerów badano za pomocą dynamiki molekularnej. Wykazano istnienie czterech możliwych struktur, z których każda posiadała pętlę przypominającą strukturę typu „spinki do włosów”. W pracach P4 i P5 zademonstrowano wpływ temperatury na fluorescencję układów. Jak wydaje się czytelnikowi, ten wpływ nie pogarsza oznaczalności ATP w temperaturze laboratoryjnej lub w temperaturze ciała ludzkiego. Zaproponowane sondy wykazywały się dużą selektywnością i względnie niskimi limitami detekcji rzędu kilkunastu mikromoli w rozcieńczonym lizacie komórek SW480. Prace P4 i P5 wnoszą nowe elementy do dyskusji o metabolizmie komórek nowotworowych i stanowią istotną nowość naukową.

Jak każda praca naukowa, rozprawa Pani Katarzyny Ratajczak otwiera kolejne wątki dyskusji. Mam nadzieję, że w czasie publicznej obrony będzie okazja do dyskusji.

Pytania do dyskusji w czasie obrony:

1. Porównując Figure 7 w pracy P1 i Figure 4 w pracy P2, wydaje się, że nośniki liposomowe są lepsze (otrzymuje się wyraźniejsze zdjęcia chorych komórek) niż GO, mimo iż sondy z GO mają niższy limit detekcji. Czy doktorantka mogłaby skomentować tę obserwację?



2. Czy praktyczne zastosowanie omawianych w rozprawie czujników wymaga biopsji tkanki nowotworowej, czy istnieje możliwość oznaczania markerów w płynach ustrojowych?
3. Jakie zakresy stężeń mRNA i ATP są charakterystyczne dla zdrowych komórek i czy warto w związku z tym starać się o obniżenie limitu detekcji?

Prace wchodzące w skład rozprawy są bardzo spójne. Dominujący wkład doktorantki w przeprowadzenie i opracowanie badań został potwierdzony przez oświadczenia współautorów. Rozprawa zawiera obszerny przegląd literatury. Zaletą jest także bardzo dobre projektowanie sond z wykorzystaniem dynamiki molekularnej oraz starannie przeprowadzone badania nad charakterystyką fizykochemiczną sond. Cele rozprawy zostały osiągnięte. Zaproponowane oznaczenia stanowią ważną nowość naukową, co potwierdza opublikowanie wyników w uznanych czasopismach naukowych o dużym współczynniku oddziaływania. Biorąc pod uwagę bardzo dobry poziom naukowy pracy, ważne elementy nowości naukowej stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia z należytą wymagalnością wymagania odnośnie prac doktorskich, które są określone w Ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. 2024 poz. 1571), dlatego wnoszę o dopuszczenie magister Katarzyny Ratajczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na nowatorski charakter zaproponowanych oznaczeń markerów nowotworowych, bardzo ciekawą dyskusję dotyczącą struktury sond i ich oddziaływania z analitami oraz znaczący dorobek publikacyjny doktorantki wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem,

Barbara Pałys



dotyczy Państwa  
dział Chemii  
uniwersytetu Warszawskiego  
l. Pasteura 1  
2-093 Warszawa



KANCELARIA GŁÓWNA SGGW  
2025 -01- 29  
WPŁYNEŁO DNIA -3-



**PRIORYTET**

(00)659007734757379388



(00)659007734757379388

Poczta Polska  
Opłata pobrana 10 zł 30 gr

2024

Sekretariat Instytutu Biologii  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego  
ul. Nowoursynowska 15  
02-776 Warszawa

