

Dr hab. inż., prof. uczelni Elżbieta Jastrzębska
Wydział Chemiczny
Politechnika Warszawska
Ul. Noakowskiego 3
00-664 Warszawa
elzbieta.jastrzebska@pw.edu.pl

Warszawa, dn. 11 lutego 2025 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Cecylii Ratajczak
pt. „**Opracowanie systemów bioczuJNIKOWYCH przeznaczonych do wykrywania mRNA
surwiwiny i monitorowania poziomu stężenia ATP w komórkach nowotworowych**”
(ang. „*Development of biosensing systems for survivin mRNA detection and monitoring of
ATP level concentrations in cancer cells*”)

wykonanej w Katedrze Fizyki i Biofizyki, Instytutu Biologii,
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Promotor: dr hab. Magdalena Stobiecka, prof. SGGW

Podstawę wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne, Pani prof. dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej (z dnia 18.12.2024 r.), zgodnie z Uchwałą Rady podjętą w dniu 14.11.2024 roku.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska ma charakter cyklu pięciu publikacji tematycznie ze sobą powiązanych, dotyczących szeroko pojętej tematyki diagnostyki chorób nowotworowych. Tematyka podjęta w ramach rozprawy doktorskiej wpisuje się w aktualny i bardzo istotny trend badań związanych z poszukiwaniem potencjalnych biomarkerów nowotworowych, mogących stanowić metody znajdujące zastosowanie w diagnostyce nowotworów. Tytuł rozprawy doktorskiej „*Opracowanie systemów bioczuJNIKOWYCH przeznaczonych do wykrywania mRNA surwiwiny i monitorowania poziomu stężenia ATP w komórkach nowotworowych*” jest poprawnie sformułowany i ściśle powiązany z treścią przedstawionych publikacji.

W skład cyklu wchodzi publikacje opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, wydawane przez czasopisma takiej jak: *ACS Applied Materials and Interfaces, Nanomaterials, Biosensors and Bioelectronics, Analytical and Bioanalytical Chemistry, International Journal of Molecular Sciences*. Należy podkreślić, że wśród nich znajdują się również czasopisma o bardzo wysokiej renomie i wysokim współczynniku oddziaływania. Prace zostały przygotowane we współautorstwie, przy czym w dołączonych oświadczeniach opisano indywidualny wkład Doktorantki w każdej z publikacji. Doktorantka

jest pierwszym autorem w czterech (z pięciu) przedstawionych publikacji, z czego w jednej z nich jest również autorem korespondencyjnym. Analiza danych bibliometrycznych: IF wynosi 31,284, punkty MNiSW wynoszą 485 (z czego 75 opartych jest o poprzedni system punktacji czasopism, w przeliczeniu na obecną punktację liczba punktów wyniosłaby 710) świadczy o wysokim poziomie merytorycznym prowadzonych prac, a także o wysokiej aktywności Doktorantki. Wkład Doktorantki polegał (w zależności od publikacji) na przeglądzie literatury, tworzeniu koncepcji badań, ich wykonywaniu oraz opracowaniu i analizie wyników, pisaniu i edycji manuskryptów. Na podstawie przedstawionych oświadczeń wnoszę, że praca Doktorantki stanowi istotny wkład w powstanie tych publikacji. W tym miejscu należy również zwrócić uwagę, że w naukach przyrodniczych prowadzone prace są bardzo często pracami z pogranicza wielu dziedzin. W związku z czym, w celu uzyskania wysokiej wartości naukowej prowadzonych prac badawczych prowadzenie badań w zespołach, w szczególności interdyscyplinarnych, jest wręcz wskazane.

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską ukazały się w latach 2018 – 2023 i obejmują następujące pozycje:

P1. Ratajczak K., Kraziński B.E., Kowalczyk A.E., Dworakowska B., Jakiela S., Stobiecka M.; Hairpin-Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in Malignant SW480 Cells, *ACS Applied Materials and Interfaces*, (2018) 10(20), 17028-17039

P2. Ratajczak K., Kraziński B.E., Kowalczyk A.E., Dworakowska B., Jakiela S., Stobiecka M.; Optical biosensing system for the detection of survivin mRNA in colorectal cancer cells using a graphene oxide carrier-bound oligonucleotide molecular beacon, *Nanomaterials*, (2018) 8(7), 510

P3. Stobiecka M., Ratajczak K., Jakiela S.; Toward early cancer detection: Focus on biosensing systems and biosensors for an anti-apoptotic protein surviving and survivin mRNA, *Biosensors and Bioelectronics*, (2019) 137, 58-71

P4. Ratajczak K., Łukasiak A., Grel H., Dworakowska B., Jakiela S., Stobiecka M.; Monitoring of dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent "On-Off" switching DNA aptamer, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2019) 411(26), 6899-6911

P5. Ratajczak K., Stobiecka M.; DNA Aptamer Beacon Probe (ABP) for Monitoring of Adenosine Triphosphate Level in SW480 Cancer Cells Treated with Glycolysis Inhibitor 2-Deoxyglucose, *International Journal of Molecular Sciences*, (2023) 24(11), 9295

Przedstawiony przez Doktorantkę cykl publikacji poprzedzony jest 78 stronicowym „przewodnikiem”/ autoreferatem przygotowanym w języku polskim w skład, którego wchodzi: 1) streszczenia w języku polskim i angielskim, 2) lista publikacji wchodząca w skład rozprawy doktorskiej, 3) wykaz najważniejszych skrótów, 4) wstęp teoretyczny, 5) cel rozprawy

doktorskiej, zakres badań i hipotezy, 6) materiały i metodyka badań, 7) podsumowanie i 8) bibliografia (163 pozycje). Od strony edytorskiej tę część rozprawy oceniam pracą bardzo dobrze.

Podsumowując od strony formalnej przedłożona do recenzji rozprawa doktorska nie budzi moich zastrzeżeń.

Tematem prac prowadzonych przez Doktorantkę było poszukiwanie metod detekcji dwóch biomarkerów: surwiwiny oraz adenozylo-5'-trifosforanu (ATP). W związku z tym, jako cel rozprawy doktorskiej doktorantka postawiła opracowanie fluorescencyjnych systemów bioczuJNIKOWYCH opartych na jednoniciowych sondach oligonukleotydowych, które zastosowano do wykrywania potencjalnych biomarkerów nowotworowych: genu surwiwiny na poziomie mRNA oraz ATP w ludzkich komórkach. Tytuł opracowania bardzo dobrze odzwierciedla jego treść.

W części literaturowej autoreferatu Doktorantka opisuje najistotniejsze zagadnienia będące przedmiotem rozprawy doktorskiej, dobrze wprowadzając w jej tematykę. Opisuje zagadnienia dotyczące: nowotworów, surwiwinę i ATP jako potencjalne biomarkery nowotworowe, spektroskopii fluorescencyjnej, typów bioczuJNIKÓW, nośników – liposomów i utlenionego grafenu. W rozdziale 10 Doktorantka opisała przykłady zastosowania fluorescencyjnych sond do wykrywania surwiwiny i ATP. Zabrakło mi jednak technicznych aspektów dotyczących opracowywania sond. Usprawiedliwieniem może być jedna z prac P3 (opublikowana w renomowanym czasopiśmie) będąca elementem cyklu publikacji przedstawionego przez Doktorantkę. W tej pracy przeglądowej omówione zostały metody wczesnego wykrywania zmian nowotworowych opartych na detekcji białka lub mRNA kodującego surwiwinę. W przeglądzie podsumowano najnowsze osiągnięcia systemów bioczuJNIKOWYCH i mikroprzepływowych w oparciu o detekcję optyczną, piezoelektryczną oraz elektrochemiczną. Ponadto, zabrakło mi klasycznego podsumowania części literaturowej, z której wynikałaby potrzeba badania postawionych przez Doktorantkę hipotez badawczych.

Doktorantka postawiła dwie główne hipotezy badawcze oraz z tym związane cele szczegółowe.

Hipoteza 1 brzmiała: *„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.”*

Hipoteza 2 brzmiała *„Zwiększone zapotrzebowanie energetyczne komórek nowotworowych może być wykrywane poprzez monitorowanie poziomu stężenia ATP w komórkach za pomocą systemu bioczuJNIKOWEGO opartego o aptamer, który wiąże się z ATP”*

Kolejna część „przewodnika” stanowiła metodyka pracy, w której przedstawiono podstawowe materiały, metody oraz aparaturę stosowaną w trakcie prowadzenia prac będących podstawą powstania publikacji P1, P2, P4 oraz P5. Rozprawa doktorska oparta jest na cyklu publikacji, niemniej jednak dodanie szczegółów metodycznych (numery katalogowe odczynników, analiza statystyczna, uszczegółowienie opisów stosowanych technik i metod) pozostawia pewien niedosyt.

Pierwszy nurt badań prowadzonych przez Doktorantkę dotyczył opracowania systemu bioczuJNIKOWEGO opartego o sondę oligonukleotydową typu „sygnalizator molekularny” - sondę Sur-MB-Joe - służącą do wykrywania sekwencji nukleotydowej kodującej surwiwinę w komórkach nowotworowych. Wyniki tych badań zostały opisane w pracach P1 oraz P2, gdzie doktorantka scharakteryzowała sondę Sur-MB-Joe składającą się z anty-sense sekwencji oligonukleotydowej komplementarnej do sekwencji mRNA kodującej surwiwinę. Sekwencje sondy nukleotydowej Sur-MB-Joe, krótkie oligonukleotydy oraz sekwencje sond aptamerowych (opisywanych w drugim nurcie badań, wykorzystanych do monitorowania zmian stężenia ATP) zostały otrzymane we współpracy z Pracownią Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk.

W ramach tego etapu Doktorantka z powodzeniem przeprowadziła badania nad charakterystyką opracowanej sondy nukleotydowej typu „sonda molekularna”, wyznaczyła limit detekcji na poziomie 26 nM, potwierdziła jej selektywność względem syntetycznych oligonukleotydów oraz sprawdziła stabilność w różnych temperaturach. W publikacjach P1 i P2 zostały opisane badania, w których Doktorantka potwierdziła, że sonda nukleotydowa Sur-MB-Joe przyjmuje w roztworze zamkniętą strukturę przypominającą „spinkę do włosów” (intensywność fluorescencji wynosiła $I_{FL} = 26$ j.u.). Natomiast, po dodaniu komplementarnej do sekwencji „pętli” sondy oligonukleotydu obserwowano 20-krotny wzrost intensywności fluorescencji ($I_{FL, maks.} = 561,2$ j.u.), co potwierdza utworzenie struktury dwuniciowej. Doktorantka wykazała również, że wzrost temperatury w zakresie od 30°C do 50°C powoduje 8-krotny spadek intensywności fluorescencji w porównaniu z wartościami uzyskanymi w obecności komplementarnego oligonukleotydu w temperaturze 23°C. Opracowana sonda jest zdolna do rozróżniania sekwencji nukleotydowej różniących się jednym nukleotydem, co zostało potwierdzone na podstawie reakcji z oligonukleotydami, które posiadały w swojej sekwencji jeden lub dwa niekomplementarne do „pętli” sondy nukleotydy. W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka zaproponowała nowy mechanizm interakcji sondy nukleotydowej z komplementarnymi oligonukleotydami: biorozpoznanie następuje podczas reakcji typu „spinka do włosów – spinka do włosów” (hairpin – hairpin). Z wykorzystaniem metody kwantowej

dynamiki molekularnej wykazała również, że pomiędzy molekułami Joe i powierzchnią utlenionego grafenu tworzą się wiązania wodorowe oraz występują oddziaływania π - π między pierścieniami aromatycznymi równoległe ułożonych obu cząsteczek, co wpływać może na proces wygaszania fluorescencji. W celu potwierdzenia przydatności opracowanego bioczuJNIKA Doktorantka przeprowadziła transfekcję komórek sondą nukleotydową przy użyciu dwóch nanoosiłników: utlenionego grafenu i liposomów. W badaniach wykorzystano komórki nowotworowe (nabłnka gruczolakoraka okrężnicy) SW480 oraz komórki prawidłowe (nabłnka okrężnicy) CCD841 CoN. Z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej z powodzeniem wskazano, że przeprowadzone eksperymenty umożliwiły wykrycie ekspresji genu surwiwiny na poziomie mRNA, tym samym odróżniając komórki nowotworowe od prawidłowych.

Drugi nurt badań dotyczył opracowania fluorescencyjnych systemów bioczuJNIKOWYCH opartych o aptamer, służący do monitorowania poziomu stężenia ATP w komórkach nowotworowych. Doktorantka z powodzeniem opracowała system bioczuJNIKOWY oparty o

1) aptamer Apt(ATP) mający sekwencję oligonukleotydową specyficzną do łączenia z cząsteczkami ATP modyfikowaną na jednym końcu fluoroforem FAM, umożliwiający wykrywanie ATP w roztworze buforowym w stężeniu 17 μ M;

2) aptamer ABP posiadający dodatkowo cząsteczkę wygaszacza Dabcyl oraz na obu końcach sekwencji komplementarne do siebie nukleotydy, pozwalające utworzyć strukturę „spinki do włosów”, umożliwiający wykrywanie ATP w roztworze buforowym w stężeniu 27,4 μ M.

Wyniki badań zostały opisane w publikacjach P4 i P5, gdzie między innymi Doktorantka zbadała trwałość struktury aptameru ABP w zakresie temperatur od 23°C do 91°C i wykazała, że wraz ze wzrostem temperatury, pojedyncza nić oligonukleotydowa aptameru przyjmuje przypadkową, losową konformację, co prowadzi to do wygaszania fluorescencji. Doktorantka zbadała również selektywność opracowanych aptamerów w obecności innych trifosforanów nukleotydów: CTP, GTP i UTP. Wykazała, że podwyższenie temperatury pomiaru zwiększa skuteczność wygaszania fluorescencji aptameru w obecności ATP i zmniejsza ją dla pozostałych nukleotydów (CTP, GTP i UTP). Otrzymane wyniki wskazują, że proponowana sonda aptamerowa zapewnia dobrą selektywność, a także służy rozróżnieniu poszczególnych nukleotydów. Za pomocą oprogramowania UNAFold, Doktorantka wyznaczyła drugorzędowe struktury aptamerów przypominającej „spinkę do włosów”. Podobnie jak w poprzednim typie sond sprawdziła ich użyteczność z wykorzystaniem hodowli komórkowych (komórek nabłnka gruczolakoraka okrężnicy SW480 oraz komórek SW480). W tym przypadku do badań

wykorzystano lizaty komórkowe otrzymane z komórek inkubowanych wcześniej z różnymi stężeniami inhibitora syntazy ATP, oligomycyną (w przypadku Apt(APT) - P4) lub inhibitorem glikolizy, 2-deoksy-D-glukozą (2-DG) (w przypadku ABP - P5). Poprzez zastosowanie opracowanego systemu bioczuJNIKOWEGO Doktorantka potwierdziła zahamowanie produkcji ATP przez oligomycynę. Powstanie mniejszej liczby cząsteczek ATP, powodowało słabsze wygaszenie fluorescencji barwnika FAM wprowadzonego do komórek aptameru Apt(ATP). Ponadto, za pomocą sondy ABP wykazała różnice w stężeniu ATP w lizatach komórkowych, które otrzymano z komórek inkubowanych bez oraz z dodatkiem 2-DG.

Powyższe badania potwierdzają, że doktorantka potwierdziła stawiane w rozprawie doktorskiej hipotezy badawcze. Warte podkreślenia jest to, że opracowane systemy bioczuJNIKOWE, stanowią obiecujące narzędzia służące do wykrywania biomarkerów chorób nowotworowych.

Powyższe wyniki badań są elementem recenzowanych publikacji i zostały już poddane rzetelnej analizie i ocenie. Niemniej jednak z obowiązku recenzenta podaję kilka aspektów, które mogą być podstawą do dyskusji w trakcie obrony rozprawy doktorskiej.

- W badaniach Doktorantka zastosowała dwa typy nośników: liposomy i GO. W „przewodniku” zabrakło mi dyskusji na temat tego czemu wybrano te nośniki i jakich różnic w finalnych badaniach się spodziewano. Który z zastosowanych nośników okazał się lepszy?
- Czy Doktorantka badała efektywność/wydajność ładowania sond do liposomów i GO? Jeśli tak to czy zaobserwowano różnice w tej wydajności? Jeśli nie prowadzono takich badań bardzo proszę o odniesienie do tego zagadnienia.
- Jako jedno z dokonań Doktorantka wskazuje „...*opracowanie skutecznej metody transfekcji komórek sondą nukleotydową...*”, jednocześnie w metodyce badań wskazując „*Transfekcję przeprowadzono według procedury producenta.*” Bardzo proszę przybliżyć metodykę prowadzenia tego eksperymentu. Czy do oceny transfekcji komórek Doktorantka mogłaby zastosować inne metody oprócz tych przedstawionych w publikacjach (mikroskopia fluorescencja, analiza lizatów) będących elementem rozprawy doktorskiej. W jaki sposób oceniano % transfekowanych komórek w danej populacji?
- Doktorantka oceniła, że dodatek oligomycyny wpływa na spadek żywotności komórek. Jak spadek żywotności komórek wpływał na wiązanie opracowanej sondy z ATP?
- Czy systemy bioczuJNIKOWE będące tematem rozprawy doktorskiej mogłyby być stosowane do diagnostyki surwiwiny i ATP w modelach trójwymiarowych?

Inne drobne uwagi, pytania:

- W bibliografii „przewodnika”/autoreferatu w niektórych pozycjach brak stron (poz. 24, 85,107, 159).
- Brakuje informacji odnośnie analizy statystycznej, liczby powtórzeń.
- Sugestia stosowania nazwy Rycina zamiast Rysunek.
- Brak rozwinięcia skrótu UTP w wykazie skrótów
- Str. 49 – czy na pewno stosowano kuwetę o drodze optycznej 10 cm?
- P4 – Proszę o wyjaśnienie co przedstawiono na Rys. 3 h oraz 3i.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Cecylii Ratajczak **stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571)**. Zgodnie z zapisem Ustawy Art. 187. Pkt 1. “Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej” oraz pkt. 2. "Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej albo oryginalne dokonanie artystyczne." Na podkreślenie zasługuje fakt, że przedstawione wyniki wpisują się w nurt obecnych badań dotyczących poszukiwania metod diagnostycznych chorób nowotworowych oraz mają potencjał nie tylko w zakresie badań podstawowych, ale również aplikacyjnych w przyszłości mogących mieć zastosowanie w badaniach klinicznych. W związku z przedstawioną wyżej bardzo pozytywną oceną całej pracy doktorskiej **wniosuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie mgr Katarzyny Cecylii Ratajczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wysoki poziom merytoryczny badań, a także dorobek naukowy Doktorantki pragnę rekomendować niniejszą rozprawę do wyróżnienia.**

Recenzent



Dr hab. inż., prof. uczelni Elżbieta Jastrzębska

OPŁATA POBRANA
TAXE PERÇUE - POBRIE
Umowa z Poczta Polska S.A. nr 701018IG.52.2023
(ID 539540)

KANCELARIA GŁÓWNA SGGW
2025 -02- 28
WPLYNĘŁO DNIA -8-



Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w
Warszawie, Instytut Biologii, Sekretariat
Nowoursynowska 159 9355
02-776 Warszawa
24.02.2025