

O c e n a  
rozprawy na stopień doktora nauk biologicznych  
mgr Ewy BIELA

1. Podstawowe dane

Mgr Ewa Biela przedstawiła rozprawę doktorską pt. Obrazowanie włókien macierzy zewnątrzkomórkowej z wykorzystaniem nowej sondy fluorescencyjnej Col-F. Praca została wykonana w Pracowni Biofizyki Komórki, Wydział Biochemii Biofizyki i Biotechnologii UJ pod kierunkiem prof. dr. hab. Jerzego Dobruckiego, który jest promotorem.

2. Opinia o rozprawie doktorskiej

Rozprawa jest obszerną monografią podzieloną na wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję i wnioski, streszczenie oraz piśmiennictwo. W rozprawie Autorka omawia obrazowanie dynamicznych zmian w strukturze białek fibrylarnych macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) w żywych tkankach. Wprowadza nowe sposoby wizualizacji tych białek przez użycie barwników fluorescencyjnych, których efekty barwienia porównuje. Dodatkowo kontroluje żywotność obserwowanych komórek sprawdzając w nich prawidłowość obrazów mitochondriów oraz ujawniając jądra komórkowe.

Założone przez Autorkę cele pracy zostały osiągnięte. Przedstawione cele to:

- zbadanie mechanizmu oddziaływania fluorochromu Col-F z kolagenem,
- sprawdzenie, czy występuje oddziaływanie Col-F z innymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, oraz
- opracowanie nowej metody barwienia włókien macierzy zewnątrzkomórkowej, w szczególności zaś kolagenu, z zastosowaniem Col-F jako nowej sondy fluorescencyjnej.

Autorka najczęściej porównywała wyniki barwienia ECM dwoma fluorochromami: barwnikiem Col-F (połączenie fizostygminy z fluoresceiną) oraz sulforodaminą B (SRB). Ten ostatni fluorochrom dotąd był opisywany jako swoiście barwiący elastynę. Autorka obserwowała jednak równie dobre jego wiązanie z kolagenem. Ponieważ Col-F okazał się także barwnikiem wiążącym się z kolagenem i elastyną, więc Autorka wnioskuje, że:



- Col-F oddziałuje z elastyną i kolagenami, a fluorescencja barwnika związanego z elastyną jest silniejsza, niż z kolagenami,
- włókna elastyny i kolagenowe wiążące Col-F można odróżnić nie tylko na podstawie intensywności fluorescencji, ale też ich morfologii; sposób ten jest mało skuteczny, gdy jest obecne tylko jedno z tych białek,
- sulforodamina B opisana jako swoisty barwnik dla elastyny barwi jednak również kolageny, ale intensywność fluorescencji po połączeniu z kolagenem typu I jest niższa niż z elastyną,
- wykorzystane do ujawniania włókien ECM dwa główne fluorochromy: Col-F oraz SRB nie wiążą się swoiście z kolagenem i elastyną, ale wiążą się również z białkami nie będącymi składnikami ECM zwierząt kręgowych, np. z białkami produkowanymi przez bezkręgowce.

Wcześniej Autorka ustaliła, że Col-F nie wnika do żywych komórek i jest niskotoksycznym barwnikiem, co pozwala na kilkudniową obserwację obiektu żywego. Żywotność badanych komórek była kontrolowana fluorochromem TMRE (pochodna rodaminy) gromadzonym w mitochondriach aktywnych. Przedstawione w rozprawie obserwacje trwały do 3 dni. Pozwalało to na ocenę morfologiczną wydzielania przez komórki badanych elementów ECM i formowanie się z nich poza komórką elementów włóknistych. Można też było w mikroskopie konfokalnym bezpiecznie zbadać serię optycznych przekrojów np. ściany tętnicy mięśniowej. Na przykładzie różnych tkanek mysich i w eksperymentalnych guzach nowotworowych Autorka wykazała możliwość obrazowania nawet głęboko położonych struktur, w tym również możliwość otrzymywania obrazów trójwymiarowych. Jakość otrzymywanych obrazów jest znakomita, wzorowa szczególnie w obrazach komputerowych (nie drukowanych na papierze). Część zdjęć zamieszczonych w rozprawie była opublikowana w pracy wieloautorskiej (E.Biela, J.Galas, B.Lee et.al. *Cytometry A* 2013; 83(6), 533-9). Jakość prezentowanych zdjęć docenili również redaktorzy czasopisma *Cytometry* umieszczając zdjęcia wykonane przez Autorkę na okładce zeszytu z publikowaną w nim Jej pracą.

Ważną częścią rozprawy jest próba wyjaśnienia przez Autorkę mechanizmu oddziaływania Col-F oraz SRB z białkami fibrylarnymi ECM. W tym celu wykorzystowała metodę obliczeniową pozwalającą przewidzieć sposób wiązania cząsteczek barwnika do wybarwianego białka. Metoda jest określana dokowaniem molekularnym. Dokowanie nie określa precyzyjnie sposobu wiązania liganda z



receptorem, a jedynie pozwala przewidzieć prawdopodobny sposób ich oddziaływania. W tym celu wykorzystano monomeryczne struktury kolagenów typu I i III oraz ich modele strukturalne uzyskane dzięki analizie wyników z krystalografii rentgenowskiej. Model strukturalny elastyny nie jest dostępny, a jego konstrukcję przestrzenną na podstawie sekwencji aminokwasów białka przeprowadził dr Wiktor Jurkowski (UJ). Według wyników metody dokowania molekularnego Autorka oceniła, że najsilniejsze jest oddziaływanie SRB z elastyną, potem wiązanie Col-F z elastyną, dalej, słabsze jest oddziaływanie z kolagenem typu III, a najslabsze z kolagenem typu I.

Metodę dokowania Autorka wykorzystała również do oceny związków, które mogłyby selektywnie barwić kolagen typu III oraz elastynę. Jeden z takich związków, który słabo wnika do komórek żywych sugeruje Autorka dla kolagenu (trijodofluoresceina) oraz inny związek dla elastyny.

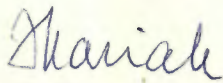
Powrót fluorescencji po fotobłaknięciu (Fluorescence Recovery After Photobleaching = FRAP) pozwala określić mobilność wyznakowanych fluorescencyjnie cząsteczek. Po wywołaniu fotobłaknięcia mierzy się czas powrotu fluorescencji cząstek badanych. Autorka obserwowała połowiczny powrót intensywności fluorescencji Col-F z kolagenem oraz elastyną po 60s. Na tej podstawie wnioskuje o niekwalencyjnym wiązaniu Col-F z obu białkami, co może ułatwiać długotrwałe eksperymenty.

3. W trakcie czytania rozprawy nasunęła mi się uwaga, o której przedyskutowanie chciałem prosić. Mam pytanie: jak Autorka widziała by możliwość przybliżonej ilościowej oceny przyrostu w czasie struktur kolagenu/elastyn ECM w trakcie ich wydzielania z komórki i podczas tworzenia się struktur włóknistych pozakomórkowych. Mogłoby to pozwolić na ocenę czasu odtwarzania struktur kolagenowych/elastynowych w obecności leków, czynników gojenia, czynników poprawiających zaburzenia odtwarzania kolagenu/elastyny.

4. Podsumowanie. Nowością i osiągnięciem mgr Ewy Biela w rozprawie doktorskiej jest wykazanie, że: Col-F oddziałuje z elastyną i kolagenami, a fluorescencja barwnika związanego z elastyną jest silniejsza niż z kolagenami. Autorka wykazała, że sulforodamina B opisana jako swoisty barwnik dla elastyny barwi również kolageny. Autorka przedstawiła znakomite zastosowania tych metod w obrazowaniu

elementów ECM w tkankach, w tym również w czasie ich powstawania podczas obserwacji do 3. dni. Obliczeniową metodą dokowania molekularnego wykazała, że najsilniejsze jest oddziaływanie SRB z elastyną, potem wiązanie Col-F z elastyną. Prowadziła też obserwacje powrotu fluorescencji po fotobłaknięciu i wnioskuje o niekowalencyjnym wiązaniu badanych fluorochromów z elementami ECM, co pozwala na długotrwałe obserwacje pojawiania się struktur kolagenowych i elastynowych w tkankach.

Rozprawa spełnia warunki wymagane przez ustawę. Wnoszę o dopuszczenie mgr Ewy Biela do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o Jej wyróżnienie za przedstawioną rozprawę.



Prof.dr hab. Jerzy Kawiak

Warszawa, 24 września 2013 r.