

Lublin, 11 maja 2015 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Żurek-Biesiady pt. „Photoconversion of DNA-binding dyes and its application in super-resolution microscopy”

Trudno jest przecenić rolę jaką odegrały techniki mikroskopowe w odkrywaniu złożoności obiektów biologicznych. Stwierdzenie to wydaje się wyjątkowo rezonować w przypadku mikroskopii optycznej, nie wymagającej szczególnego traktowania próbek, w postaci napyłania warstw metalicznych czy też przenoszenia ich do warunków wysokiej próżni. Przy wszystkich swoich zaletach, ten rodzaj mikroskopii okazuje się posiadać, jednakże, bardzo istotne ograniczenia związane z rozdzielczością, uniemożliwiające uzyskanie precyzyjnych informacji na poziomie molekularnym a nawet subkomórkowym. Ograniczenia te wynikają bezpośrednio z falowej natury promieniowania elektromagnetycznego i przybierają formę limitu dyfrakcyjnego, określanego regułą Abbego. Pokora wobec praw Natury nakazuje szanować napotymane ograniczenia i pogodzenie się z nimi. Okazuje się jednakże, iż zastosowanie pewnych zjawisk fizycznych (nazwijmy je tak w związku z powagą recenzji w przewodzie doktorskim, choć na usta ciśnie się określenie „sztuczek”) przez wysoce zmotywowane, otwarte i spragnione wiedzy umysły badaczy, doprowadziło do pokonania limitu dyfrakcyjnego w mikroskopii optycznej. Co więcej, zaproponowano kilka alternatywnych podejść metodologicznych, umożliwiających analizy obrazów mikroskopowych z rozdzielczością

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



znacznie przekraczającą 100 nm, więc zdecydowanie poniżej wielkości wyznaczonej połową długości fali promieniowania stosowanego do obrazowania obiektów. Aktywność w obszarze zwiększania rozdzielczości mikroskopii fluorescencyjnej uhonorowana została ostatnio przyznana nagrodą Nobla w dziedzinie chemii. Jeden ze sposobów uzyskiwania wysokorozdzielczych obrazów mikroskopowych opiera się na precyzyjnej lokalizacji pojedynczych fluoryzujących molekuł, w obrębie badanej próbki, podczas gdy aktywność emisyjna pozostałych fluoroforów jest uśpiona, przeważnie na drodze indukowanej światłem konwersji. Technika ta nazywana jest Single Molecule Localisation Microscopy (SMSL). Wymaga ona znakowania badanych obiektów znacznikami fluorescencyjnymi charakteryzującymi się zdolnością przełączania (światłem) pomiędzy formą fluorescencyjnie aktywną i nieaktywną. W żargonie laboratoryjnym cechę tę określamy zdolnością „blinkania”. Podczas prac badawczych, prowadzonych w ramach przygotowywania swojej rozprawy doktorskiej, Pani mgr Dominika Żurek-Biesiada odkryła, iż cechę tę posiadają popularne fluorofory, stosowane do znakowania kwasów nukleinowych (w szczególności DNA): DAPI, Hoechst 33258/33342 oraz Vybrant® DyeCycle™ Violet (określany skrótem VdcV). Doktorantka pokazała, iż „wyłączanie” fluorescencji znaczników, intensywnym światłem krótkofalowym, nie polega w tym przypadku na drastycznym obniżeniu ich wydajności kwantowej emisji, ale na przesunięciu widma fluorescencji do obszaru długofalowego. W warunkach pomiaru fluorescencji przy wzbudzeniu laserowym oraz stosunkowo wąskim oknie spektralnym analizy emisji, efekt ten może być obserwowany jako wygaszanie emisji barwnika. Otwartość na nieznaną oraz zastosowanie techniki spektroskopii fluorescencyjnej (rejestracja pełnych widm wzbudzenia i emisji), w uzupełnieniu mikroskopowej analizy obrazów, doprowadziły Doktorantkę do właściwej interpretacji obserwowanych zjawisk. Co więcej, okazało się, iż niemalże identyczne widma emisji rejestruje się w przypadku uprotonowanych form badanych fluoroforów. Wynik taki wydaje się wskazywać na indukowaną światłem krótkofalowym (w szczególności z obszaru UV) konwersję barwników do form uprotonowanych. Konkluzja ta znalazła potwierdzenie w analizach przeprowadzonych z zastosowaniem spektrometrii masowej. Odkrycie mechanizmu foto-konwersji znaczników fluorescencyjnych do form długofalowych otworzyło drogę do zastosowania ich w celu rejestracji wysokorozdzielczych obrazów jąder komórkowych techniką SMSL. W przypadku znacznika VdcV, stosunkowo szerokie widmo absorpcyjne umożliwia



zastosowanie jednej linii laserowej (405 nm) zarówno do indukowania foto-konwersji fluoroforu jak i rejestracji sygnału fluorescencji, zarówno w obszarze krótkofalowym (niebieskim, przed konwersją) jak i obszarze długofalowym (zielonym, po konwersji). W ramach rozprawy, dokonano również udanej próby zastosowania odkrytego mechanizmu w wysokorozdzielczym obrazowaniu chromosomów w fazie mitotycznej jądra komórek HeLa.

W mojej ocenie wartość merytoryczna osiągnięć badawczych prezentowanych w ramach rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Żurek-Biesiady jest bardzo wysoka, zarówno z poznawczego jak i z aplikacyjnego punktu widzenia.

Z formalnego punktu widzenia, rozprawa doktorska opiera się na cyklu trzech oryginalnych prac badawczych, opublikowanych w międzynarodowych czasopismach specjalistycznych o znaczącej pozycji. W dwóch pracach Doktorantka jest pierwszym (głównym) autorem. Prezentacja oryginalnych artykułów, w ramach rozprawy, poprzedzona została dwoma rozdziałami, pełniącymi zarazem rolę wstępu jak i zarazem przeglądu literaturowego, dotyczącego problemów wysokorozdzielczej mikroskopii fluorescencyjnej. Rozdziały te zatytułowane zostały i obejmują zagadnienia w obszarze: „Microscopy” oraz „Photophysics”. Część ta zredagowana została, w mojej opinii, z wysoką dbałością o klarowność treści, precyzję sformułowań oraz o szatę graficzną. Rozprawę zamykają dwa rozdziały, zatytułowane: „Future perspectives” oraz „Conclusions”. O ile zastosowanie mechanizmu foto-konwersji w wysokorozdzielczym obrazowaniu chromatyny, opisane w trzeciej z prezentowanych prac, opierało się na znaczniku fluorescencyjnym Hoechst, w rozdziale trzecim rysowane są perspektywy zastosowania fluoroforu VdcV w uzyskaniu wysokiej rozdzielczości obrazów jąder komórkowych. Prezentowane w ramach tego rozdziału szczegółowe wyniki są na tyle wartościowe, iż wydają się posiadać walory dojrzałej i kompletnej pracy badawczej. Jakość, w szczególności zaś rozdzielczość prezentowanych obrazów jądra komórkowego, uzyskanych z zastosowaniem odkrytego mechanizmu fotokonwersji znacznika VdcV do formy o emisji długofalowej, wskazują na ogromne możliwości aplikacyjne zastosowanego podejścia. Wydaje się, iż treści te zamieszczone zostały w części rozprawy poświęconej perspektywom, nie zaś uzyskanym wynikom badawczym, w związku z faktem oczekiwania na przyjęcie do druku pracy opisującej te wyniki.



Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż Pani mgr Dominika Żurek-Biesiada zawarła w swojej rozprawie doktorskiej bardzo interesujące wyniki swoich prac eksperymentalnych oraz ich twórcze analizy. Centralnym osiągnięciem pracy jest odkrycie zjawiska fotokonwersji popularnych znaczników fluorescencyjnych stosowanych w badaniu jąder komórkowych. Przedstawiona została również analiza tego procesu, która doprowadziła do poznania mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za obserwowane przesunięcia spektralne. Bardzo istotnym osiągnięciem rozprawy jest również wskazanie i udokumentowanie możliwości praktycznego zastosowania odkrytego mechanizmu, w uzyskiwaniu wysokorozdzielczych obrazów mikroskopowych. W moim odczuciu, osiągnięcia te są bardzo istotne z punktu widzenia aktywności środowiska naukowego zaangażowanego w działalność zmierzającą do obniżania granic rozdzielczości w mikroskopii fluorescencyjnej, co przełoży się na rezonans ogłoszonych prac w postaci ich cytowań. Ponadto, uważam, iż poziom naukowy rozprawy, w szczególności zrównoważenie części poznawczej i aplikacyjnej, czyni ją godną uznania za wyróżniającą. Gratulując Doktorantce oraz Promotorowi tak cennych rezultatów, uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie mojej rekomendacji oraz stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Dominikę Żurek-Biesiadę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki