

Wrocław 08.05.2015

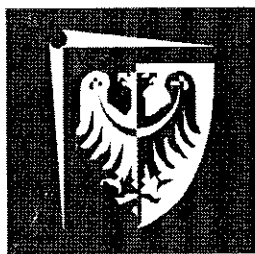
Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Żurek-Biesiady pt. "Photocorvesion of DNA-binding dyes and its application in super-resolution microscopy."

Mikroskopia fluorescencyjna jest obecnie jednym z podstawowych narzędzi badawczych stosowanych w naukach biologicznych. Aby metoda eksperymentalna wykorzystująca obrazowanie znakowanego fluorescencyjnie materiału biologicznego była skuteczna musi być spełnionych kilka koniecznych warunków. Obszar będący przedmiotem badań powinien być jednoznacznie oznakowany, tzn. sonda fluorescencyjna winna zachowywać się próbcie w przewidywalny i dobrze określony sposób. Emitowane światło fluorescencyjne powinno być odpowiedniej jakości tak aby możliwe było uzyskanie informatywnych obrazów z pomocą dostępnego sprzętu. Ostatnim ale wcale nie mniej ważnym elementem badań mikroskopowych jest ilościowa ocena uzyskanych obrazów. To krótkie wyliczenie pokazuje, jak złożona jest technika doświadczalna wykorzystująca mikroskopię fluorescencyjną. Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska stawia sobie za cel zbadanie możliwości wykorzystania zjawiska foto-konwersji, zachodzącego w znacznikach fluorescencyjnych specyficznie oddziałujących z kwasami nukleinowymi, w super-rozdzielczej mikroskopii fluorescencyjnej. Rozprawa dotyczy więc prac mających na celu rozwijanie ultranowoczesnych technik fluorescencyjnego obrazowania wykorzystując słabo zbadanych efekt foto-konwersji sond fluorescencyjnych. Zarówno zastosowana metodologia doświadczalna jak i ilościowa analiza procesu foto-konwersji sprawiają, że zaprezentowane wyniki spełniają z nadmiarem kryterium nowości.

Na rozprawę doktorską mgr Dominiki Żurek-Biesiady składają się trzy opublikowane prace opatrzone streszczeniem, obszernym wstępem (38 stron) oraz opisem możliwych kierunków przyszłych badań. W pracy znajdują się także elementy takie jak spis treści, zestawienie rysunków, tabel i stosowanych skrótów, które organizują tekst i ułatwiają jego czytanie. Całość opatrzona jest obszerną bibliografią złożoną z 224 cytowań.

Cele pracy jest hasłowo przedstawiony na stronie 14. Moim zdaniem cel zdefiniowany jest zbyt ogólnie co nie pozwala łatwo ocenić czy i w jakim zakresie został on osiągnięty.



Politechnika Wroclawska

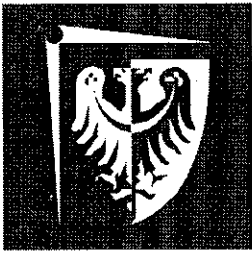
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370, Wrocław

tel. / fax. + 48 (71) 327 77 27

Wstęp zaprojektowany jest w taki sposób aby wprowadzić czytelnika w niuansy nowoczesnej mikroskopii fluorescencyjnej. Autorka rozprawy postanowiła osiągnąć ten cel poprzez zdefiniowanie pojęcia rozdzielczości w mikroskopii optycznej, która nie przenosi się prosto do mikroskopii fluorescencyjnej, gdzie cechą dominującą jest kontrast uzyskany poprzez specyficzne oddziaływanie znacznika z wybranymi elementami badanego układu biologicznego, w tym przypadku strukturami utworzonymi z cząsteczek DNA. Czytelnik w tej części wstępu uzyskuje wyczerpujące informacje z dotyczące fizycznych ograniczeń wynikającymi z natury mikroskopii optycznej oraz w jaki sposób ograniczenia te można pokonać poprzez znakowanie molekularne. Autorka ograniczyła tą część rozprawy do przedstawienia podstawowych definicji (strona 17), prezentacji historycznego rozwoju mikroskopii opartej o wzbudzanie sond fluorescencyjnych znajdujących się w ograniczonym i dobrze zdefiniowanej objętości próbki (strona 18). Wtrącenie wzmianki o mikroskopii elektronowej na stronie 19 wydaje mi się niepotrzebne. Ta część rozprawy zakończona jest prezentacją mikroskopii super-rozdzielczej zakończonej prezentacją sond fluorescencyjnych specyficznych do kwasów nukleinowych i wykorzystywanych w prezentowanych badaniach. Uważam, że ta część wstępu jest najlepiej napisana i do pewnego stopnia kompensuje braki części poprzednich. Wstęp zakończony jest zbyt pobieżnym przedstawieniem foto-fizyki sond fluorescencyjnych oraz krótkim opisaniem procesu foto-konwersji i „inżynierii stanu ciemnego”. We wstępie brakuje mi przedstawienia molekularnego podłoża specyficzności sond do kwasów nukleinowych z uwzględnieniem ilościowego opisu stopnia i miejsca wiązania. Zagadnienia te omawiane są wrywkowo w różnych częściach rozprawy co utrudnia uzyskanie jasnego obrazu molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie kompleksów sonda-kwas nukleinowy.

Wyniki i metody

Trzonem rozprawy są trzy publikacje oraz suplement prezentujące wyniki badań oraz opisujące stosowane techniki i metodologię. Wszystkie załączone publikacje posiadają znaczący indeks cytowań (Cytometry Part A > 3; J. Fluorescence > 1,6 a Nucleus > 3,1). Publikacje te prezentują postęp prac nad charakteryzacją, nigdy wcześniej tak szczegółowo nie analizowanego, procesu indukowanej UV foto-konwersji sond fluorescencyjnych o dużym powinowactwie do kwasów nukleinowych (Hoechst 33258, DAPI i Vybrant DyeCycle). W dwóch pierwszych publikacjach zaprezentowano systematyczne badania nad czynnikami wpływającymi na wydajność i trwałość indukowanej foto-transformacji sond zarówno w modelach fizykochemicznych jak i komórkowych. Wymagało to od autorki znacznych kompetencji w zakresie, trudnej i technicznie wymagającej, mikroskopii fluorescencyjnej jak i spektroskopii fluorescencyjnej oraz spektroskopii mas. Kompetencje te uzupełnione są sprawnym posługi-



Politechnika Wroclawska

Wydział Podstawowych Problemów Techniki
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370, Wrocław

tel. / fax. + 48 (71) 327 77 27

waniem się modelami komórkowymi. Ważnym wynikiem uzyskanym w prezentowanych badaniach jest pokazanie, że indukowana promieniowaniem UV foto-konwersja jest procesem odwracalnym niezależnym od stężenia sond oraz od obecności kwasu nukleinowego. Dodatkowo, analizy przeprowadzone technikami fluorescencyjnymi i spektroskopią mas pokazały, że ekspozycja sond na działanie promieniowania UV indukuje ich protonację. Trzecia praca, wraz z suplementem, jest najbardziej znacząca gdyż wskazuje na możliwość wykorzystania efektu czasowego wygaszania sondy w technice wysoko-rozdzielczej mikroskopii opartej na superpozycji lokalizacji pojedynczych molekuł fluorescencyjnych. W publikacji tej pokazano, że sondy Hoechst 33258, Hoechst 33342 oraz DAPI, które wiążą się w bruzdzie mniejszej helisy kwasu nukleinowego, pozwalają na uzyskanie struktury DNA w jądrze z rozdzielczością sięgającą dziesiątek nanometrów. Ponieważ obecność tych sond nie zakłóca struktury kwasu nukleinowego uznać należy, że uzyskane obrazy odzwierciedlają natywną topologię struktur biologicznych, w których skład wchodzi kwas nukleinowy. Kulminacją tej publikacji jest wygenerowanie wysokiej jakości map gęstości sond związanych z DNA znajdującym się w jądrze oraz w chromosomie.

W ostatnim rozdziale zatytułowanym **perspektywy na przyszłość** autorka opisuje głównie ograniczenia oraz trudności w stosowaniu wysokorozdzielczej mikroskopii opartej na określaniu lokalizacji pojedynczych molekuł znacznika fluorescencyjnego. Podkreśla znaczenie jakości stosowanych sond fluorescencyjnych wskazując na potrzebę poszukiwania nowych molekuł zdolnych do specyficznego znakowania struktur docelowych oraz posiadających zdolność penetracji całej przestrzeni próbki przy jednoczesnym zachowaniu wymaganych parametrów fotochemicznych. Znaczna część tego rozdziału skupia się na omówieniu procesu obróbki obrazu oraz analizy uzyskanych danych co pokazuje, że autorka rozprawy doskonale zdaje sobie sprawę z ograniczeń i zagrożeń wynikających ze stosowania złożonych metod numerycznych. W ostatnim rozdziale autorka przeprowadziła także krótką dyskusję, moim zdaniem zbyt krótką, dotyczącą molekularnych szczegółów wiązania się poszczególnych sond z kwasem nukleinowym. W dyskusji tej poziom wiązania określany jest przez liczbę „binding ratio”, której autorka nigdzie nie zdefiniowała. Nie jest do końca jasne czy jest to ilość sondy obecnej w próbce w stosunku do ilości par zasad czy jest to ilość sond związanych do ilości par zasad. Moim zdaniem prowadzone badania nad wyborem i oceną sond fluorescencyjnych przeznaczonych do zastosowania w mikroskopii wysoko rozdzielczej powinny być w przyszłości rozszerzone o eksperymentalne wyznaczenie stałych wiązania, aby możliwe było ilościowe opisanie badanych zespołów molekularnych oraz określenie w jaki sposób warunki fizykochemiczne środowiska wpływają na te oddziały-



Politechnika Wroclawska

Wydział Podstawowych Problemów Techniki
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370, Wrocław

tel. / fax. + 48 (71) 327 77 27

wania. Ilościowe oznaczenie stopnia związania sondy pomoże w jednoznacznym rozstrzygnięciu kwestii czy możliwe jest aby związana sonda pozbawiona była możliwości emitowania światła.

W bibliografii wskazano pozycje literaturowe, które w sposób zadowalający wspierają prezentowane w opracowaniu zagadnienia. Na uwagę zasługuje fakt, że znaczna część danych literaturowych pochodzi z okresu po 2010 roku (około 22%) co pokazuje, że autorka uwzględniła bardzo aktualny stan wiedzy.

Podsumowując, uważam, że mgr Dominika Żurek-Biesiada zaprezentowała nowe i ważne wyniki prac nad charakteryzacją oraz wykorzystaniem w wysoko-rozdzielczej mikroskopii fluorescencyjnej efektu foto-konwersji zachodzącego w sondach fluorescencyjnych o dużym powinowactwie do kwasów nukleinowych. Wyniki prezentowanych badań są znaczącym wkładem do rozwoju wyspecjalizowanych wysoko-rozdzielczych technik mikroskopowych z przeznaczeniem do obrazowania układów biologicznych.

Przełożona mi do recenzji rozprawa pokazuje, że mgr Dominika Żurek-Biesiada jest sprawnym eksperymentatorem, który opanował technicznie zawansowane techniki obrazowania oraz rozumie współzależność pomiędzy układem optycznym mikroskopu a molekularną sondą fluorescencyjną. Zrozumienie to jest konieczne dla poprawnej interpretacji uzyskanych obrazów.

Biorąc wszystko powyższe pod uwagę stwierdzam, że rozprawa Pani mgr Dominika Żurek-Biesiady spełnia wymagania stawiane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytułach naukowych wraz z późniejszymi poprawkami, stanowi oryginalną pracę naukową, wykazującą na znaczną wiedzę teoretyczną autorki, umiejętność samodzielnego projektowania i prowadzenia pracy badawczej oraz posługiwania się zaawansowanymi technikami doświadczalnymi. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Dominika Żurek-Biesiada do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dodatkowo, biorąc pod uwagę złożoność, zawansowanie techniczne, interdyscyplinarność oraz jakość zaprezentowanych badań wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Dominiki Żurek-Biesiady.

Prof. dr hab. inż. Marek Langner