

Prof. dr hab. Adam Patkowski
Uniwersytet im Adama Mickiewicza
Wydział Fizyki
Zakład Biofizyki Molekularnej
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 2
61-614 Poznań
Tel: +48-61-8295262
E-mail: patkowsk@amu.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

“Application of fluorescence correlation spectroscopy to biology and medicine: structural studies of the biological matter”

przedstawionej przez Panią mgr Martę Pilz

Spektroskopia korelacji fluorescencji (FCS) wyróżnia się spośród metod fizykochemicznych stosowanych w badaniach dynamiki cząsteczek w cieczach zaletami, które szczególnie predestynują ją do badań dynamiki w cieczach złożonych, w tym w układach biologicznych. Cechami tymi są: (i) czułość – optymalne stężenie substancji badanej jest rzędu nanomoli, a średnia ilość cząstek w mierzonej objętości konfokalnej jest rzędu 1; jest to możliwe ze względu na bardzo dużą wydajność kwantową procesu fluorescencji. (ii) Selektywność – mierzony sygnał pochodzi jedynie od znakowanych fluorescencyjnie cząsteczek i nie jest istotnie zakłócany obecnością dużej liczby nie fluoryzujących obiektów. (iii) rozdzielczość przestrzenna – mierzony sygnał pochodzi jedynie z objętości konfokalnej o średnicy ok. 200 nm i objętości rzędu femtolitrów. W oparciu o informacje o dynamice próbników fluorescencyjnych o różnych rozmiarach w układach złożonych można wnioskować o występującej tam strukturze i oddziaływaniach.

Doktorantka zastosowała metodę FCS do badania układów biologicznych o rosnącej złożoności, poczynając od białek w roztworze poprzez cytoplazmę komórek w trójwymiarowych modelach tkanki, do macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix – ECM) w modelach guzów nowotworowych.

Przeprowadzenie tych badań wymagało od Doktorantki szerokiej wiedzy i umiejętności w zakresie biologii, umożliwiających przygotowanie odpowiednich układów oraz wysokich umiejętności w zastosowaniu FCS i obrazowania konfokalnego, uzupełnionych świadomością ograniczeń i pułapek stosowanych metod oraz opracowania odpowiednich procedur gwarantujących powodzenie.

Pierwszym etapem były badania zmian struktury (denaturacji i degradacji) białka w roztworze pod wpływem czynników zewnętrznych.

Drugim etapem badań było wyznaczenie, zależnej od skali długości i mniejszej od makroskopowej, lepkości efektywnej i struktury cytoplazmy dla stanowiących model tkanki komórek w trójwymiarowych hodowlach oraz porównanie tych własności z własnościami komórek w tradycyjnie badanej warstwie dwuwymiarowej.

W trzecim etapie Doktorantka przeprowadziła analogiczne pomiary w macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) w trójwymiarowych modelach guzów nowotworowych. Do swoich badań wybrała ona białka: BSA (bovine serum albumin) i LDH (cardiac lactic dehydrogenase) oraz nowotworowe komórki HeLa i MCF-7, a także fibroblasty.

Cel i zakres badań przedstawionej pracy doktorskiej zostały szczegółowo omówione w rozdziale 1-szym.

Przedstawione w tej pracy badania należą do wiodącej tematyki w zakresie badań struktury i zjawisk transportu w komórkach i macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) hodowli 2- i 3-wymiarowych, istotnej dla tworzenia optymalnych modeli tkanek i projektowania leków.

Zawartość tej pracy doktorskiej ściśle odpowiada tytułowi.

Podstawy metody FCS przedstawione zostały w rozdziale 2. Z powodu bardzo skrótowej prezentacji metody rozdział 2.1 zawiera informacje niekompletne lub błędne. Schemat Jabłońskiego (rys. 2.1) jest niekompletny, odległości między niektórymi poziomami energetycznymi są nieprawidłowe, a zaznaczone przejścia absorpcyjne i emisyjne są niekompletne i nie pozwalają wyjaśnić położenia i kształtu widma emisji w stosunku do widma absorpcji. Dodatkowo idea funkcji korelacji została błędnie przedstawiona na rys 2.2a.

Podobne problemy napotykamy w rozdziale 2.2: Idea mikroskopu konfokalnego i fizyczne znaczenie słowa konfokalny nie zostały prawidłowo przedstawione. Dodatkowo występują stwierdzenia częściowo prawdziwe lub nieprawdziwe jak: „The signal from FCS is inversly proportional to the number of fluorescence molecules in observation volume”, czy „Hence, a small detection volume increases the singnal amplitude...”. W obu tych zdaniach sygnał-natężenie fluorescencji pomyłony jest z kontrastem funkcji korelacji.

Podstawy teoretyczne FCS przedstawione zostały w rozdziale 2.3. Występują tu również drobne pomyłki, jak: „Since τ_d depends on D, it can be considered that diffusion time is also a molecular parameter and independent of the instrument”, czy błędne równanie (2.5).

Przypuszczam, że błędy te wynikły ze zbyt skrótowej prezentacji i uważam, że nie mają one żadnego wpływu na wysoką wartość naukową wyników przedstawionych w dalszej części pracy.

W rozdziałach 2.4 i 2.5 Doktorantka krótko i kompetentnie omówiła zastosowania FCS do badań biologicznych oraz ograniczenia tej metody.

Wyniki własne Autorka omówiła w rozdziałach 3-5.

Pierwszym etapem (rozd. 3) były badania wpływu TMA (trimethylamine) i TMAO (trimethylamine N-oxide) na denaturację i degradację dwóch białek: BSA i LDH. Najpierw omówiono rolę TMAO i TMA w organizmach żywych w powiązaniu z chorobami sercowo-naczyniowymi. Następnie przedstawiono ideę badań denaturacji i degradacji białek przy pomocy FCS. W przypadku badań degradacji istotną informacją jest liczba i miejsce wiązania barwnika (ATTO) do białka, ponieważ w eksperymencie FCS widoczne są jedynie fragmenty białka znakowane barwnikiem. Takiej informacji w pracy nie podano.

Doktorantka pokazała, że to raczej TMA, a nie TMAO (jak podaje literatura) w stężeniach powyżej 100 mM powoduje denaturację i degradację białek, podczas gdy stężenie TMA w cytoplazmie wynosi 10 μ M. Badania długo-czasowej ekspozycji HSA (human serum albumin) na TMA wykazały, że szkodliwe działanie obserwuje się jedynie dla stężeń TMA powyżej 10 mM i powodowane jest ono alkaliczną hydrolizą wiązania peptydowego.

Wyniki uzyskane przy pomocy FCS zostały jakościowo potwierdzone przy pomocy metody SDS-PAGE.

W rozdziale 4-tym Doktorantka przedstawiła nowe wyniki badań zależnej od skali długości lepkości efektywnej i struktury cytoplazmy w 3-wymiarowych hodowlach komórkowych i porównała je z odpowiednimi parametrami komórek w hodowlach 2-wymiarowych (pojedyncza warstwa komórek). Najpierw omówiono budowę komórek i wyniki badań lepkości efektywnej w pojedynczych warstwach komórek, a także sposoby realizacji hodowli 2- i 3-wymiarowych. Badania przeprowadzono na liniach komórkowych HeLa, MCF-7 i fibroblastów.

Doktorantka szczegółowo omówiła 3-wymiarową hodowlę komórek, sposób wprowadzania próbników fluorescencyjnych o różnych rozmiarach i przeprowadzenia pomiarów FCS. Następnie porównała lepkość efektywną dla komórek z hodowli 2- i 3-wymiarowych dla próbników fluorescencyjnych o promieniu 1,33, 2,50 i 8,60 nm uzyskując bardzo zbliżone wyniki dla obu hodowli. Dla lepszego scharakteryzowania różnic w organizacji cytoplazmy w komórkach z obu hodowli przeprowadziła dodatkowo badania przy pomocy konfokalnego obrazowania organelli komórkowych: mikrotubuli i reticulum endoplazmatycznego (ER). Wykazała, że mimo iż zależna od skali długości lepkość efektywna jest prawie identyczna dla komórek z obu rodzajów hodowli, to jednak architektura cytoplazmy i organizacja mikrotubuli i ER są bardzo różne.

Dodatkowo, przy pomocy FCS Doktorantka zbadała poziom ekspresji białka PARP1 (poly-(ADP-ribose) polymerase) w komórkach HeLa z hodowli 2- i 3-wymiarowych. W badaniach

użyła znakowanych fluorescencyjnie cząsteczek olaparib – PARPi-FL (inhibitora PARP1). Wykazała, że stężenie olaparib było dwukrotnie wyższe w komórkach z hodowli 3-wymiarowych niż 2-wymiarowych i wyjaśniła to wyższym stężeniem PARP1 (wiążącego olaparib) w komórkach z hodowli 3-wymiarowych. Pokazała też, że stężenie znakowanego olaparib w komórkach było znacznie wyższe niż na zewnątrz, co wyjaśniła wysokim stężeniem w komórkach cząsteczek PARP1 wiążących olaparib.

Rozdział 5 poświęcony jest badaniom struktury macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Jest to zagadnienie bardzo istotne ponieważ od zależnej od skali długości efektywnej lepkości ECM zależy efektywność penetracji tkanki przez leki przeciwnowotworowe.

W rozdziałach 5.1-5.4 Doktorantka szczegółowo omówiła stosowane procedury związane z dostarczaniem leków do komórki oraz strukturę i modele ECM. Zobrazowała też rozkład kolagenu I, fibronektyny, elastyny i tenascyny-C w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w 3-wymiarowej hodowli komórek HeLa, MCF-7 i fibroblastów.

Przedstawiła także metodykę badań ECM przy pomocy FCS opartą o model lepkości efektywnej zależnej od rozmiarów próbника fluorescencyjnego. Przedstawiła też procedurę przygotowania 3-wymiarowej hodowli komórek do pomiarów FCS. Jako próbników fluorescencyjnych Doktorantka użyła czterech rodzajów znakowanych fluorescencyjnie nanocząstek TRITC-dekstranu o promieniach 1,3 – 8,6 nm oraz trzech rodzajów pokrytych PEG-iem nanocząstek krzemionki o promieniach 20,6 – 110,7 nm. Oszacowała także, że wskutek stosunkowo niskiej gęstości użytych nanocząstek ich dynamika w cieczy zdominowana jest przez dyfuzję, a wkład sedymentacji jest zanedbywane mały. Zbadała również cytotoksyczność stosowanych nanocząstek i pokazała, że cząstki dekstranu nie wykazują żadnej cytotoksyczności, natomiast dla cząstek krzemionki przeżywalność komórek wynosi ok. 50% dla stężeń cząstek powyżej 100 nm, dla wszystkich trzech linii komórkowych w hodowlach 2-wymiarowych. Niższa cytotoksyczność oczekiwana jest dla hodowli 3-wymiarowych.

Następnie (rozd. 5.7) Doktorantka przedstawiła wyniki zależnej od skali długości lepkości efektywnej przestrzeni zewnątrzkomórkowej (ECM) w 3-wymiarowych hodowlach wszystkich trzech linii komórkowych. Wyniki te przedstawiła w postaci wykresu $\ln(\eta_{\text{eff}}/\eta_0)$ w zależności od promienia próbника r_p i dopasowała do nich krzywą daną przez poprzednio przedstawiony model. Z tego dopasowania otrzymała, dla każdej linii komórkowej, parametry modelu: długość korelacji ξ , promień hydrodynamiczny przeszkody R_h i długość przeszkody L . Na podstawie tych parametrów Doktorantka stwierdziła, że głównymi przeszkodami dla dyfuzji nanocząstek we wszystkich badanych ECM są włókna kolagenu, natomiast makrolepkość i

długość korelacji ξ w hodowlach HeLa są około dwukrotnie większe niż w dwóch pozostałych. Wyniki pomiarów FCS uzupełnione i potwierdzone zostały konfokalnym obrazowaniem składników ECM: kolagenu i elastyny we wszystkich trzech hodowlach komórkowych. Badania te dodatkowo wykazały różnice w morfologii i strukturze ECM dla różnych linii komórkowych.

Następnie (rozdz. 5.8) Doktorantka zbadala zmiany odległości między fibrylami w ECM, określonej przez parametr ξ , w trakcie procesu tworzenia struktury tkankowej w hodowlach 3-wymiarowych (spheroid formation). Już na początku tworzenia struktury 3-wymiarowej przez komórki obserwuje się stosunkowo małą wartość ξ świadcząca o stosunkowo szybkim procesie powstawania oddziaływań makromolekuł zewnątrzkomórkowych różnych komórek. Po upływie 3 dni struktura ECM, scharakteryzowana przez wartość ξ , nie zmienia się. Widać więc, że nowe, przedstawione w tej pracy, zastosowanie FCS do badania ECM pozwala określać parametry odpowiedzialne za własności transportowe ECM.

Następnie (rozdz. 5.9) Doktorantka pokazała, że FCS może być także użyte do badania wpływu czynników zewnętrznych na ECM, na przykładzie komórek HeLa i dekoryny, która zapobiega dojrzewaniu włókien kolagenu i reguluje ekspresją kolagenazy. Spodziewanym efektem powinno być zmniejszenie wpływu przeszkód kolagenowych i przyspieszenie dyfuzji wybranych nanocząstek o promieniu 20,6 nm. Pomiary Doktorantki potwierdziły te oczekiwania i wykazały, że wzrost stężenia dekoryny od 0 do 2% spowodował 20-krotny wzrost długości korelacji przeszkód ξ i odpowiednio szybszą dyfuzję nanocząstek.

Jako przyszły kierunek badań Doktorantka wskazała pomiary FCS w ECM 3-wymiarowych hodowli komórkowych powstałych z mieszaniny różnych komórek. Pokazała badania dla 3-wymiarowych hodowli mieszaniny komórek HeLa i fibroblastów, wykazujące istotne różnice w ECM w stosunku do hodowli monokomórkowych.

Określanie struktury ECM na podstawie badań FCS stanowi nowatorskie podejście do problemu transportu nanocząstek w ECM, co jest niezmiernie istotne dla zastosowań terapeutycznych.

Rozdział 6 stanowi podsumowanie najważniejszych wyników tej pracy.

W dodatkach Doktorantka szczegółowo opisała procedury eksperymentalne stosowane w badaniach, poczynając od opisu układu pomiarowego FCS i jego kalibracji oraz analizy błędów pomiarów, poprzez metody fluorescencyjnego znakowania białek i elektroforezy SDS-PAGE. Opisała też metody hodowli komórek i przygotowywania ich od pomiarów, metody

wybarwiania mikrotubul i składników ECM, testy proliferacji komórek oraz obrazowanie kolagenu i elastyny w 3-wymiarowych hodowlach komórkowych.

Przedstawiona praca doktorska ma nietypowy układ: każda z trzech części wyników własnych zawiera swoje wprowadzenie, przegląd literatury i wyniki. Taki układ pracy jest uzasadniony różnorodnością badań wchodzących w jej skład i ułatwia czytanie pracy. Doktorantka wykazała się tu szeroką wiedzą biologiczną i potrafiła w zwięzły sposób przedstawić, od strony biologicznej, aktualny stan badań i istotę podejmowanych problemów. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo duża staranność w zdefiniowaniu i przestrzeganiu optymalnych procedur eksperymentalnych przygotowania próbek biologicznych i wykonania pomiarów oraz szczegółowa analiza wpływu czynników, które mogłyby zakłócić prawidłowy pomiar. Przeprowadzona jest też analiza błędów. Świadczy to o bardzo szerokiej wiedzy Doktorantki odnośnie biologii badanych układów i stosowanych metod badawczych.

Moim zdaniem najważniejszymi osiągnięciami i wnioskami tej pracy doktorskiej są:

- Wykazanie, że TMA, a nie TMAO jest bardziej toksyczne i w odpowiednich stężeniach prowadzi do degradacji białek.
- Wyznaczenie, zależnej od skali długości lepkości efektywnej cytoplazmy komórek w hodowlach 3-wymiarowych i wskazanie na różnice struktury cytoplazmy w komórkach z hodowli 2- i 3-wymiarowych.
- Zastosowanie FCS do badania i wyznaczenia zależnej od skali długości lepkości efektywnej matrycy zewnątrzkomórkowej (ECM) komórek w hodowlach 3-wymiarowych.

Te wszystkie nowe i bardzo interesujące wyniki zostały krytycznie przedyskutowane w ramach dostępnych modeli i porównane z literaturą. Otrzymane wyniki są bardzo ważne dla lepszego zrozumienia transportu cząstek o różnych rozmiarach w cytoplazmie i matrycy zewnątrzkomórkowej (ECM), co jest niezbędne dla projektowania i optymalizacji leków.

Przedstawiona praca doktorska jest bardzo dobrze napisana w poprawnym języku angielskim. Zawiera wystarczający przegląd literatury w tej dziedzinie – bibliografia zawiera 153 publikacje. Prezentacja wyników jest wystarczająca i jasna. Wyniki własne Autorki są wyraźnie odseparowane od danych literaturowych i porównane z nimi, wszędzie gdzie to było możliwe.

W trakcie swoich studiów doktoranckich Pani mgr Marta Pilz stała się ekspertem w badaniach cytoplazmy komórek i matrycy zewnątrzkomórkowej (ECM) w 2- i 3-wymiarowych hodowlach komórek, przy pomocy FCS i obrazowania konfokalnego.

Jako Doktorantka, okazała się być utalentowaną i ciężko pracującą osobą z wysokimi umiejętnościami w hodowli komórek i ich badań przy pomocy FCS i obrazowania konfokalnego, zdolną niezależnie rozwiązywać problemy naukowe. Wykazała się również wysoką umiejętnością pracy z innymi.

Wartość naukowa przedstawionej pracy doktorskiej jest bardzo wysoka. Autorka uzyskała bardzo interesujące, nowe i ważne wyniki dotyczące zjawisk transportu nanocząstek w cytoplazmie komórek i matrycy zewnątrzkomórkowej. Nie mam wątpliwości, że te nowe, bardzo interesujące wyniki otrzymane przez Doktorantkę istotnie poszerzają naszą wiedzę w tej dziedzinie.

Doktorantka jest współautorką 4 prac związanych z tematyką przedstawionej pracy doktorskiej: 3 opublikowanych i 1 wysłanej do druku w wysokiej rangi czasopismach naukowych. Jest też współautorką 2 innych prac w wysokiej rangi czasopismach naukowych i jednego patentu.

Jestem w pełni przekonany, że praca doktorska "Application of fluorescence correlation spectroscopy to biology and medicine: structural studies of the biological matter" przedstawiona przez Panią mgr Martę Pilz spełnia wszystkie formalne i naukowe wymagania (art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) i wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Marty Pilz do publicznej obrony pracy doktorskiej.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

Uzasadnienie

Praca doktorska Pani mgr Marty Pilz oparta jest na trzech współautorskich pracach opublikowanych w najwyższej rangi czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej, które na liście MNiSW otrzymały odpowiednio 140, 100 i 140 pkt. Pani Pilz jest w 1-szej z tych prac pierwszą autorką. Czwarta praca została wysłana do czasopisma. Dodatkowo jest współautorką 2 publikacji w najwyższej rangi czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej, nie wchodzących w skład jej pracy doktorskiej, które na liście MNiSW otrzymały odpowiednio 200 i 100 pkt. Świadczy to o Jej bardzo wysokiej aktywności naukowej i bardzo wysokiej randze Jej badań naukowych. Jestem głęboko przekonany, że Jej praca doktorska zasługuje na wyróżnienie.

Poznań, 20. września 2021.



Prof. dr hab. Adam Patkowski