Warszawa, dn. 6.10.2021

Prof. dr hab. Ryszard Stolarski
UNIWERSYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ FIZYKI
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Zakład Biofizyki
ul. Pasteura 5
02-093 Warszawa
E-mail: Ryszard.Stolarski@fuw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Pilz: „Application of Fluorescence Correlation Spectroscopy to biology and medicine: structural studies of the biological matter"

Konstruowanie biofizycznych, molekularnych modeli strukturalnych układów biologicznych, takich jak polimery biologiczne (białka, kwasy nukleinowe, lipidy i ich kompleksy), komórki i tkanki, odgrywa kluczową rolę w wyjaśnianiu mechanizmów ich funkcjonowania w procesach biologicznych i stanowi jedno z podstawowych źródeł informacji w racjonalnym projektowaniu środków chemioterapeutycznych (*rational drug design*), w szczególności przeciwnowotworowych. W tym szerokim nurcie badań z wykorzystaniem metodologii z zakresu fizyki, chemii i biologii mieści się rozprawa doktorska mgr Marty Pilz, wykonana w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk, w Zespole badawczym Fizykochemii Miękkiej Materii kierowanym przez prof. dr hab. Roberta Hołysta. Prof. Robert Hołyst jest promotorem rozprawy wraz z promotorem pomocniczym, dr Kariną Kwapiszewską.

Punktem wyjścia biofizycznych badań doświadczalnych obiektów biologicznych jest wybór odpowiednich metod, zazwyczaj fizycznych, oraz modelu lub modeli badanych układów, najczęściej molekularnych, które dają podstawy teoretycznego ujęcia uzyskanych wyników eksperymentalnych, a

jednocześnie są przez te wyniki weryfikowane. Podstawową metodą badawczą wykorzystaną przez autorkę rozprawy jest spektroskopia korelacji fluorescencji FCS (*fluorescence correlation spectroscopy*). Metoda została opracowana relatywnie niedawno pod względem teoretycznym i doświadczalnej realizacji. Wiąże się z publikacjami w Physical Review Letters (1972) i Biopolymers z 1974 r., w których współautorami są Elliot L. Elson, Douglas Magde i Watt W. Webb z *Cornell University* (USA). Przełomowym krokiem w zastosowaniach FCS okazało się wykorzystanie detekcji konfokalnej, opisane w cyklu prac Riglera i wsp. z *Karolinska Institutet* (Szwecja), opublikowanych w latach 90-tych ubiegłego wieku. Tym samym doktorantka wpisuje się w ważny i aktualny nurt badań biofizycznych.

Napisana w języku angielskim rozprawa doktorska mgr Marty Pilz jest oparta na trzech zespołowych pracach, opublikowanych w latach 2019 – 2021 w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz jednej pracy wysłanej do druku (autorka rozprawy jest ponadto współautorką dwóch dalszych publikacji i jednego zgłoszenia patentowego). Warto podkreślić, że związana z rozprawą praca, w której mgr Marta Pilz jest pierwszym autorem ukazała się w renomowanym czasopiśmie *Nanoscale*, *impact factor* 7,79 i została wyróżniona przez redaktora w ramach *„recent breakthroughs in nanobiotechnology"*.

Podstawowe cele pracy są jasno i wyczerpująco przedstawione we wstępnym rozdziale (*Introduction*), po którym następuje szczegółowe omówienie metody FCS. Wyniki (rozdziały 3, 4 i 5) są zaprezentowane dla kolejno badanych obiektów. Rozprawa dotyczy zagadnień strukturalnych trzech rodzajów układów biologicznych: białek, komórek w hodowli *in* vitro i macierzy pozakomórkowej, powiązanych poprzez zastosowanie spektroskopii FCS:

(1) dyfuzja translacyjna albuminy z surowicy wołowej BSA (*bovine serum albumun*) i dehydrogenazy mleczanowej LDH (*lactate* lub *lactic dehydrogenase*), znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym ATTO 488, w buforze PBS oraz wpływ dodawania trimtyloaminy (TMA) albo N-tlenku trimetyloaminy (TMAO) na wyznaczane współczynniki dyfuzji obu białek w kontekście ich globalnej struktury (denaturacja, degradacja);

(2) dyfuzja dwu różnych co do wielkości nanopróbników, tetrametylorodamina-dekstranu (TRITC-dextran) o masie cząsteczkowej 4,4 kDa i o masie cząsteczkowej 155 kDa, w cytoplazmie komórek HeLa w hodowlach dwuwymiarowych (monowarstwy 2D) i trójwymiarowych (sferoidy 3D), obrazowanie fluorescencyjne mikrotubuli i retikulum endoplazmatycznego oraz wpływ rodzaju hodowli na ekspresję polimerazy naprawczej DNA, PARP1 (*poly(ADP-ribose) polimerase*), z wykorzystaniem fluoryzującego olaparibu, analogu inhibitora enzymu;

(3) dyfuzja siedmiu nanopróbników, czterech typu TRITC-dextran (od 4,4 kDa do 155 kDa) oraz trzech nanoczastek krzemowych pokrytych glikolem polietylenowym (wymiary od 20,6 nm do 110 nm) w macierzy pozakomórkowej (ECM) sferoidów komórek nowotworowych HeLa i MCF-7 oraz fibroblastów tkanki łącznej i śledzenie czasowych zmian struktury ECM sferoidów HeLa.

W każdym z tych trzech omawianych zagadnień autorka rozprawy uzyskała interesujące wyniki. Wymieniam oczywiście tylko niektóre z nich, te które wydają mi się szczególnie istotne. Po pierwsze, doktorantka wykazała degradujące białka własności TMA, ale nie TMAO. Po drugie, hodowle komórkowe 3D wydają się charakteryzować większą ekspresją białka w porównaniu z hodowlami 2D, przy jednakowej nanolepkości wewnątrz komórek obu typów hodowli. Po trzecie, uzyskane dane dla dyfuzji w złożonym systemie macierzy pozakomórkowej ECM potwierdzają model opisujący zależność lepkości od promienia Stokesa dyfundującej nanosondy.

Całą pracę cechuje wysoka dbałość o właściwy dobór warunków eksperymentalnych i wykonywanie pomiarów kontrolnych. W 12 załącznikach (A1 ÷ A12) zostały zamieszczone procedury eksperymentalne, zarówno w zakresie eksperymentów FCS, takich jak dobór parametrów pomiarowych (FCS *setup*), kalibracja objętości konfokalnej z wykorzystaniem dyfuzji rodaminy 110, jak i protokoły przygotowywania znakowanych białek do badań w buforze, przygotowywania dwu- i trójwymiarowych hodowli komórkowych, immuno-wybarwiania struktur wewnątrzkomórkowych i białek macierzy pozakomórkowej, wprowadzanie nanoznaczników do wnętrza komorek i do macierzy pozakomórkowej oraz sprawdzanie cytotoksyczności wprowadzanych sond metodą MTT. Analiza statystyczna wyników ma charakter standardowy, aczkolwiek w zestawieniu z wyżej wymienionymi, szczegółowo opisanymi procedurami, zabrakło mi nieco szerszej analizy wpływu poszczególnych parametrów fitowania (amplituda składowej trypletowej T, czas życia trypletu τ_T, liczba cząsteczek w objętości konfokalnej, parametr kształtu objętości konfokalnej κ) na przebieg funkcji autokorelacji. W procedurze A2 na str. 111 doktorantka podaje: „*Collected data I analysed by using self-written Python script*", ale nie podaje, czy skrypt umożliwiał sam proces nieliniowego fitowania krzywych teoretycznych do punktów doświadczalnych oraz wyznaczania odchyleń residualnych (?)

Praca odznacza się dużą starannością w opracowaniu wyników, w formułowaniu wniosków i ich uzasadnianiu, co odzwierciedla przejrzysty sposób prezentacji w formie trzech rozdziałów, z których każdy dotyczy jednego określonego obiektu biologicznego, jest poprzedzony wstępem i zakończony wnioskami. Sumaryczne, trzystronicowe podsumowanie ogólne (rozdz. 6: *Summary*) zostało zamieszczone na końcu rozprawy. Doktorantka opisuje ponadto wstępne wyniki eksperymentów (podrozdziały *Further directions*), które wskazują potencjalne kierunki dalszych badań. W podrozdz.

4.7 są to wyniki obrazowania w komórkach HeLa znakowanej fluorescencyjnie eribuliny, inhibitora mikrotubuli i leku przeciw rakowi piersi. Podrozdz. 5.10 dotyczy wyznaczania współczynnika dyfuzji TRICT-dextran 155 kDa w macierzy pozakomórkowej połączonej hodowli 1:1 sferoidów HeLa i fibroblastów.

Zauważone braki i niejasności nie mają wpływu na wysoką wartość merytoryczną rozprawy. Przytaczam je głównie z obowiązku recenzenta:

- chętnie przeczytałbym więcej informacji (bez sięgania do prac źródłowych) o założeniach modelu *„lengh-scale dependent viscosity model"*, który autorka rozprawy zastosowała do analizy dyfuzji w macierzy pozakomórkowej, np. w formie osobnego załącznika na wzór załączników z procedurami eksperymentalnymi (A1 ÷ A12);
- wzór 2.5 str. 14: brak kwadratu przy ω_0; ponadto warto było podać odnośnik do wzoru na objętość konfokalną, którego wyprowadzenie nie jest trywialne;
- str. 23, 24, 29: kolizja oznaczeń; chyba powinno być r_h (promień hydrodynamiczny białka) zamiast R_h (promień hydrodynamiczny usieciowania polimerowego ECM);
- str. 25: wyznaczony stosunek wartości współczynnika dyfuzji D dla BSA i LDH o dwukrotnie większej masie cząsteczkowej wynosi maksymalnie 1,064 (po „korzystnym" uwzględnieniu błędów doświadczalnych), podczas gdy analogiczny stosunek, przytoczony w cytowanej w rozprawie pracy Zuk *et al.* Biophys, J. 115, 782, 2018 wynosi 1,196, zresztą zgodnie z promieniami obu białek globularnych, które można oszacować na podstawie ich mas cząsteczkowych; warto było skomentować ten wynik;
- str. 50/51 Fig 4.9: pożądany byłby jeszcze jeden dodatkowy punkt doświadczalny dla wartości r_p pomiędzy 2,5 nm i 8,6 nm;
- brakuje oznaczeń i rozwinięcia skrótów MTT i MCF-7 na liście (zakładka do książeczki z tekstem rozprawy).

Podsumowując, podjęta w pracy doktorskiej problematyka badawcza ma w wymiarze ogólnym istotne znaczenie dla rozwoju zastosowania spektroskopii FCS do analizy własności obiektów biologicznych, a także wnosi nowe, szczegółowe informacje strukturalne dotyczące badanych białek, komórek i macierzy pozakomórkowej. Szczegółowe cele rozprawy w formie jasno ujętych tez zostały moim zdaniem w pełni zrealizowane. Drobne niedociągnięcia nie wpływają na **bardzo dobrą ocenę recenzowanej pracy**. Rozprawa doktorska mgr Marty Pilz spełnia zarówno ustawowe kryteria określone w art. 187 ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" (Dz. U. poz. 1668 ze zm.), jak i wymogi zwyczajowe, powszechnie przyjęte w środowisku naukowym do oceny rozpraw doktorskich o tematyce z zakresu nauk przyrodniczych. W związku z tym, **wnioskuję o dopuszczenie mgr Marty Pilz do dalszych etapów przewodu doktorskiego**.