



Poznań, 07.11.2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Anny Wychowaniec

zatytułowanej

„Multi-analyte fluorescent small molecule probes for investigation of biologically relevant local microenvironment”

Recenzja przygotowana w związku z pismem sekretarza Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu dr Joanny Banasik z dnia 13 września 2024 r. na podstawie dostarczonej kopii rozprawy doktorskiej przygotowanej zgodnie z zapisami ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 3 lipca 2018 roku.

Przedłożona dysertacja, której ocenę powierzyła mi Rada Naukowa Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, a stanowiąca podstawę w procedurze uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne przez mgr Annę Wychowaniec, została wykonana w Zakładzie Sond Molekularnych i Proleków Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierownictwem naukowym dr hab. Jacka Kolanowskiego i opieką promotora pomocniczego dra inż. Michała Jakubczyka.

Procesy biologiczne zachodzące wewnątrz komórki angażują wiele elementów składających się na jej budowę. Możliwość śledzenia tych procesów umożliwiają, między innymi, luminescencyjne sondy molekularne, które wizualizują i określają lokalizację wewnątrzkomórkową, niewidzialnych dla innych metod, składników (analitów) wewnątrzkomórkowych. Informacje te są kluczowe do określenia ich biologicznej roli. Większość doniesień naukowych dotyczy sond obrazujących pojedyncze anality. Niewiele jest doniesień związanych z bardziej użytecznymi sondami wieloanalitowymi pozwalającymi, na bardziej wiarygodnie wykrywanie i monitorowanie relacji zachodzących między dwoma czy trzema elementami układu biologicznego.

Tematyka opiniowanej rozprawy dotyczy opracowania i wykorzystania sond fluorescencyjnych do pomiaru parametrów środowiska wewnątrzkomórkowego. Sondy fluorescencyjne stały się w ostatnich latach modnym i ważnym tematem badań naukowych. Doktorantka idealnie wpisuje się w działania, których celem jest poszukiwanie sond wieloanalitowych pozwalających badać mechanizmy procesów zachodzących w ludzkim organizmie na poziomie komórkowym w tym samym czasie.

Charakterystyka rozprawy

Przedstawiona do oceny dysertacja to 227 stronicowy świetnie uporządkowany materiał o klasycznej formie. Tekst pracy napisany w języku angielskim został podzielony na 7 wyraźnie podzielonych rozdziałów. Są to *Wprowadzenie* będące częścią teoretyczną rozprawy (43 strony), *Cel pracy* (1 strona), *Materiały i metody* (21 stron), *Wyniki i dyskusja* osiągniętych rezultatów (81 stron) oraz *Wnioski i plany badawcze* (3 strony). Dysertację uzupełnia licząca 437 pozycji *Bibliografia*, zawierająca w przeważającej mierze aktualne publikacje, oraz *Dane uzupełniające* będące zbiorem zarejestrowanych widm ^1H i ^{13}C NMR, HRMS-ESI oraz rezultatów dotyczących przeprowadzonych badań absorpcyjnych i emisyjnych. Niektóre z wymienionych części zostały podzielone na rozdziały i podrozdziały. Rozprawę poprzedzają dwustronicowe *Streszczenia w języku polskim i angielskim* a także wykaz stosowanych *Skrótów*.

Wprowadzenie, stanowiące przegląd piśmiennictwa, jest bardzo cenną częścią recenzowanej rozprawy, opisuje bowiem w sposób wyczerpujący podstawy stosowanych metod wraz z odnośnikami do literatury. W nim, Autorka scharakteryzowała mikrośrodowisko komórkowe, zwracając szczególną uwagę na polarność wewnątrzkomórkową, lepkość i zmiany pH, to jest czynniki, które mogą wywoływać zmiany w mikrośrodowisku komórkowym. Krótko, aczkolwiek kompletnie scharakteryzowała fluorescencję jako spektroskopową technikę badawczą z uwzględnieniem narzędzi do obrazowania fluorescencyjnego w biologii. Za to kolejne dwa podrozdziały dostarczają czytelnikowi szerokiej informacji na temat sond fluorescencyjnych i strategii wewnątrzkomórkowego znakowania fluorescencyjnego, które umożliwiają śledzenie wewnątrzkomórkowych procesów biologicznych. Tak przygotowane przez Doktorantkę *Wprowadzenie* bardzo dobrze wdraża w tematykę prezentowanych zagadnień badawczych jednocześnie wskazując motyw wyboru kierunku podjętych badań. Ponadto, przedstawione w tej części rozprawy informacje są niezbędne w prowadzeniu dyskusji nad osiągniętymi wynikami w dysertacji.

Cel stanowi logiczną konsekwencję informacji płynących z analizy danych literaturowych. Doktorantka formuje jeden nadrzędny cel badawczy oraz trzy cele szczegółowe, przedstawiające skrótowo plan pracy, a dotyczące syntezy i walidacji dwóch fluorogenicznych cząsteczek. Zdefiniowane cele wymagały od Autorki wykonania szeregu czynności eksperymentalnych od syntezy określonych związków, ich analizy spektroskopowej po walidację działania sond.

W *Części doświadczalnej* opisano, w sposób szczegółowy, etapy prac badawczych związanych z przygotowaniem sond fluorescencyjnych. Doktorantka dobrze dobrała poziom szczegółowości prezentowanych tam informacji. *Część eksperymentalna* rozprawy rozpoczyna się od przedstawienia stosowanych odczynników, aparatury i sprzętu badawczego. Następnie mgr Wychowaniec prezentuje opisy prowadzonych syntez łącznie z wynikami analiz widm ^1H i ^{13}C NMR oraz HRMS-SI potwierdzających poprawność przeprowadzonych działań syntetycznych. W następnych podrozdziałach przedstawia szczegóły dotyczące sposobu określenia właściwości fizykochemicznych fluoroforów, eksperymentów komórkowych oraz eksperymentów *in vitro* z udziałem hCAII (ludzkiej anhidrazy węglanowej).

Zasadniczą częścią pracy jest rozdział zatytułowany *Wyniki i dyskusja*, w którym mgr Wychowaniec przedstawiła rezultaty swoich obszernych, wielotorowych działań eksperymentalnych dotyczących spreparowanych sond *SOLpH1* i *SOLpH2* opartych odpowiednio na szkielecie 4-sulfonoamidu benzo[c][1,2,5]oksadiazolu i 1,8-naftalimidu. Wyzaczyła wydajność kwantową emisji, molowy współczynnik absorpcji i jasność, zbadła wpływ szerokiej grupy jonów na ich emisję, określiła wrażliwość obu sond na polarność i lepkość środowiska oraz przeprowadziła badania dotyczące kolokalizacji z trackerami mitochondriów i lizosomów w linii komórkowej HEK293T (zdrowej) i A549 (nowotworowej). Autorka podjęła również badania dotyczące znakowania *in vitro* ludzkiej anhidrazy węglanowej II z wykorzystaniem przygotowanej sondy *SOLpH1-Tos*.

W rozdziale *Wnioski* Doktorantka zwróciła uwagę na osiągnięcia pracy i wskazała możliwą drogę wykorzystania sond fluorescencyjnych w przyszłych badaniach.

Ocena wartości naukowej

Metodologia badań została opisana szczegółowo i świadczy o dużej wiedzy Autorki, dotyczącej analizowanych zagadnień i pokory w interpretacji uzyskanych wyników. Zwraca uwagę właściwy dobór metod badawczych dla wiarygodnej realizacji celów badania jak i zastosowanie poprawnych analiz statystycznych.

Wyniki pracy przynoszą wiele ciekawych informacji i z naukowego punktu widzenia są bardzo wartościowe. Po pierwsze, wartości długości fal wzbudzenia i emisji sondy *SOLpH1* są zbieżne z danymi literatowymi. Doktorantka zwraca uwagę, że niska wydajność kwantowa emisji sondy jest typowa dla fluoroforów ze znacznymi przesunięciami Stokesa, a wyższa wartość wydajności kwantowej emisji w układzie o wartości pH równej 4, wskazuje, że stężenie protonów wokół sondy wpływa na jej właściwości optyczne. Udowadnia, że to pH a nie chemiczna natura stosowanego buforu jest odpowiedzialna za zmianę intensywności fluorescencji sondy, na co wskazują identyczne wartości natężenia fluorescencji w pH równym 6, obserwowane w buforze cytrynianowo-fosforanowym i fosforanowym. Akcentuje, że wyznaczona średnia wartość pK_a $6,4 \pm 0,2$ jest odpowiednia do stosowania tej sondy w badaniach wewnątrzkomórkowych. Ważnym elementem pracy było zbadanie wpływu polarności i lepkości środowiska na właściwości luminescencyjne sondy *SOLpH1*. Wyznacza dla mieszanin dioksan-woda, rozpuszczalników i stosowanych buforów empiryczny parametr polarności Reichardta. Zauważa, że obniżeniu polarności rozpuszczalnika i wzrostowi lepkości środowiska towarzyszy wzrost natężenia emisji sondy co czyni sondę odpowiednim kandydatem do badania ich zmian w środowisku wewnątrzkomórkowym. Zwraca uwagę na zdolność sondy do rozpuszczania się w organicznych i nieorganicznych roztworach bez potrzeby stosowania DMSO. Poczyniona obserwacja, zdaniem Doktorantki, ma ogromne znaczenie eksperymentalne. Demonstruje bowiem możliwość wykorzystania sondy *SOLpH1* w eksperymentach obrazowania żywych komórek bez potrzeby przygotowania roztworów macierzystych na bazie DMSO. Innym ważnym elementem dysertacji jest badanie kolokalizacji z trackerami mitochondriów i lizosomów z wykorzystaniem zdrowej i nowotworowej

linii komórkowej tj. HEK293T oraz A549 jak i wewnątrzkomórkowa detekcja pH w zdrowej linii komórkowej. Autorka zaobserwowała występującą różnicę w natężeniu emisji pomiędzy obiema liniami komórkowymi, co Jej zdaniem może w przyszłości zostać wykorzystane do rozróżnienia komórek nowotworowych od zdrowych. Równie ważnym składnikiem recenzowanej rozprawy są badania dotyczące znakowania *in vitro* ludzkiej anhidrazy węglanowej II z wykorzystaniem przygotowanej sondy SOLpH1-Tos, jak i aktywności enzymatycznej znakowanego białka SOLpH1-hCAII. Analogiczne badania, z wyjątkiem badań znakowania i aktywności enzymatycznej, przeprowadziła z udziałem sondy SOLpH2. W odróżnieniu od sondy SOLpH1, SOLpH2 generowała wyższe wartości natężenia emisji w roztworach wodnych w porównaniu z roztworami niepolarnymi i charakteryzowała się mniejszą wrażliwością na zmiany lepkości środowiska. Wyznaczona wartość pK_a $6,5 \pm 0,1$ jest również odpowiednia do monitorowania zmian w środowisku wewnątrzkomórkowym.

Przeprowadzona w rozprawie dyskusja osiągniętych rezultatów, jak i przygotowane wprowadzenie świadczą o dużej znajomości zagadnień z zakresu tematu pracy.

Mimo różnych technik i metod badawczych stosowanych dla realizacji postawionych celów badawczych, większość zadań z nich wynikających Autorka zrealizowała samodzielnie. O występującej współpracy i jej zakresie Doktorantka informuje na odpowiedniej stronie dysertacji.

Podsumowując, niewątpliwymi walorami recenzowanej dysertacji są:

- aktualny i ważny temat,
- dokładne opracowanie metodologiczne,
- wielotorowość podjętych działań eksperymentalnych,
- opracowanie wyników pomiarów, prowadzące do stwierdzenia rzeczywistej wartości mierzonych wielkości,
- przejrzysta i spójna forma pracy, przyjazna dla czytelnika.

Ocena strony redakcyjnej pracy

Rolą recenzenta jest ocena rozprawy pod względem merytorycznym, formalnym, poprawności redakcyjnej i językowej, można rzec poszukiwanie uchybień w pracy co w przypadku rozprawy mgr Wychowaniec jest trudne. Świadczy to o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Indywidualną sprawą każdej osoby przygotowującej dysertację doktorską jest sposób jej przygotowania i forma prezentacji osiągniętych rezultatów badań. Pani mgr Wychowaniec w bardzo interesujący sposób zaprezentowała wyniki swojej pracy badawczej. Strona graficzna pracy jest wysoka, jakość i czytelność 121 rysunków, 40 widm i 9 tabel – bardzo dobra, przez co ułatwiają czytelnikowi zaznajomienie się z szeroką gamą przedstawionych informacji. Godny podkreślenia jest wkład pracy, potrzebny do przygotowania ostatecznej wersji rozprawy.

Recenzent znalazł kilka drobnych usterek redakcyjnych, które mają charakter drugorzędny i w niczym nie wpływają na wartość naukową pracy, a które z obowiązku łącznie z innymi uwagami zostały przedstawione poniżej:

- w celach pracy zabrakło postawienia hipotez badawczych, które winny zostać udowodnione w trakcie prowadzenia prac badawczych,
- przedstawione w pracy równania reakcji powinny posiadać numery, zgodne z kolejnością pojawiania się ich w tekście,
- szkoda, że Autorka nie ponumerowała widm ^1H , ^{13}C NMR i HRMS-ESI, co znacznie ułatwiłoby czytanie manuskryptu,
- str. 74 nie zamieszczono położenia sygnałów obecnych w widmie ^1H NMR związku 13, jak czyniono wcześniej,
- dlaczego w opisie rysunku 44 $\lambda_{\text{wzb}}=435$ nm, skoro wcześniej przedstawiono, że maksymalna absorpcja występuje przy długości fali równej 420nm?
- str. 97 Tabela 2, z danych w niej zamieszczonych wynika, że $\Delta\lambda=1440$ cm^{-1} , w tekście Doktorantka podaje 1439 cm^{-1} ; podobna uwaga dotyczy str. 99 i Tabeli 3 gdzie podano odpowiednio 1920 i 1921 cm^{-1} oraz str. 129 i Tabeli 6 (1048 i 1049 cm^{-1}),
- str. 98 Tabela 3, dlaczego w przypadku CPB (pH=4) $\lambda_{\text{wzb}}=420$ nm, skoro we wcześniejszych etapach stosowano $\lambda_{\text{wzb}}=435$ nm?
- str 105, z czego wynikają odmienne wartości λ_{wzb} i λ_{em} roztworów przygotowanych w acetonitrylu, buforze HEPES i wodzie z tymi przedstawionymi w Tabeli 3? Podobna uwaga dotyczy str. 135 i Tabeli 7,
- str. 111, nie wyjaśniono skrótu ROI,
- str. 124, z rysunku 68 można wnosić, że SOLpH2 może mieć również pasmo absorpcyjne poniżej 300 nm, czy jest tak faktycznie?,
- str 125, zastanawiające są wartości ϵ SOLpH2 przedstawione w Tabeli 5; z rysunku 69 wynika, że sonda osiąga maksymalną absorpcję przy około 400 nm a w tabeli odpowiada jej najniższa wartość ϵ ; proszę o komentarz,
- rysunek 72, brak opisu osi,
- Tabela 9, błędna wartość ϵ_{405} dla sondy SOLpH2 w roztworze o pH=7,5
- zgodnie z opisem rysunku 98, brakuje w rozprawie jednego rysunku.

Z całości przedstawionego materiału stwierdzam, że projekt badawczy został przemyślany, rozsądnie zaplanowany i konsekwentnie zrealizowany. Z satysfakcją oświadczam, że praca zawiera szereg ciekawych wyników osiągniętych na podstawie rzetelnych badań, które noszą znamiona nowości naukowej.

Mam pełne przekonanie, że wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej dowodzą dojrzałości Kandydatki do prowadzenia dalszej działalności naukowej. Autorka umiejętnie posługuje się różnymi technikami badawczymi, dobrze je wykorzystuje, potrafi wyniki badań interpretować w oparciu o dane literaturowe i o zaawansowaną wiedzę podstawową. Dyskusja wyników z przeprowadzonych badań jest logiczna a wnioski z nich płynące są dobrze udokumentowane.



W świetle powyższego stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz.1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 28/2024/Internet z dnia 20 marca 2024 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pani mgr Anny Wychowaniec do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Jednocześnie wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.