



POLITECHNIKA ŁÓDZKA
INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska,
tel: 42-631-32-61; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Wychowaniec
pt. „Multi-analyte fluorescent small molecule probes for investigation of biologically relevant local microenvironment”

Magister Anna Wychowaniec swoją pracę doktorską zatytułowaną „Multi-analyte fluorescent small molecule probes for investigation of biologically relevant local microenvironment” wykonała w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod opieką dr hab. Jacka Kolanowskiego oraz dr inż. Michała Jakubczyka, pełniącego funkcję promotora pomocniczego.

Tematyka badawcza podjęta w rozprawie dotyczy opracowania nowych sond fluorescencyjnych wrażliwych na zmiany pH oraz polarności/lepkości medium rozpuszczającego. Poszukując nowych sond fluorescencyjnych zwraca się uwagę na ich: selektywność - sondy są projektowane tak, aby reagować specyficznym na określone cząsteczki lub procesy biologiczne, czułość - nawet niewielkie zmiany w środowisku mogą prowadzić do zmian w intensywności lub widmie emisji fluorescencji, różnorodność - znanych jest obecnie szeroki wybór sond fluorescencyjnych, różniących się właściwościami spektralnymi i zdolnością do wiązania różnych biomolekuł. Sondy fluorescencyjne znajdują zastosowanie w obrazowaniu komórkowym, w tym: lokalizacji białek, monitorowaniu procesów komórkowych, badaniu interakcji białko-białko, w badaniach biochemicznych, w tym: badanie kinetyki reakcji enzymatycznych oraz badanie struktury białek. Ciekawym jest zastosowanie sond fluorescencyjnych w inżynierii genetycznej, a w szczególności oznaczanie ekspresji genów i śledzenie losów rekombinowanych DNA.

Ponadto coraz częściej sondy fluorescencyjne stosowane są w diagnostyce medycznej, w wykrywaniu chorób, ocenie stanu zdrowia pacjenta oraz diagnostyce *in vivo*. Sondy fluorescencyjne są niezwykle wszechstronnymi narzędziami, które znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach nauki. Ich zdolność do wykrywania i wizualizacji różnych procesów biologicznych na poziomie molekularnym sprawia, że są nieocenione w badaniach podstawowych i stosowanych.

Tak więc bez wątplenia, praca doktorska mgr Anny Wychowaniec, wpisuje się w intensywnie rozwijany dział nauki i jest aktualna. Rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim.

Praca posiada wielopoziomową strukturę dostosowaną do osiągnięcia założonego celu badań. Celem głównym pracy było opracowanie sond do zastosowań wewnątrzkomórkowych wrażliwych na zmiany w mikrośrodowisku komórkowym i na zmiany pH (sondy dwu- lub wieloanalitowych) oraz wykazanie możliwości kowalencyjnego przyłączenia opracowanej sondy do docelowego białka bez konieczności modyfikacji genetycznej.

Tak ambitny i złożony cel pracy mógł być osiągnięty poprzez realizację wielu celów szczegółowych, obejmujących: 1. Syntezę i walidację sondy wrażliwej na środowisko i pH opartej na 4-sulfonamidzie 2,1,3-benzoksadiazolu (SBD) jako fluoroforze; 2. Synteza i walidacja sondy wrażliwej na środowisko i pH opartej na rdzeniu naftalimidowym; 3. Zaprojektowanie i utworzenie narzędzia do kowalencyjnego znakowania docelowego białka za pomocą sondy wrażliwej na środowisko i reagującej na zmiany pH.

Recenzowana praca liczy 227 stron. Układ pracy jest klasyczny i obejmuje streszczenie, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie, będące częścią literaturową, cel pracy, część eksperymentalną, wyniki i dyskusje, podsumowanie i wpływ uzyskanych wyników na rozwój nauki, wykaz literatury cytowanej oraz dane uzupełniające. W moim przekonaniu spis treści nie jest czytelny. Główne rozdziały: wstęp, część teoretyczna, część eksperymentalna, wyniki i dyskusja powinny być lepiej widoczne w spisie treści. W pracy zabrakło wykazu dorobku naukowego Doktorantki.

Przegląd literaturowy nazwany przez Doktorantkę „Introduction” obejmuje podrozdziały dotyczące: mikrośrodowiska wewnątrzkomórkowego, zastosowania zjawiska fluorescencji w obrazowaniu, znaczników fluorescencyjnych oraz strategii wewnątrzkomórkowego znakowania fluoroforami.

Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymana jest spójność dzięki starannemu doborowi referowanych publikacji i konsekwentnemu podporządkowaniu wszystkich części składowych nadrzędnemu celowi pracy. Generalnie, pozwala więc to na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy. Nie bardzo rozumiem, dlaczego w podrozdziale 1.1 dotyczącym mikrośrodowiska wewnątrzkomórkowego opisana została anhydraza węglanowa. Z przypadku tego podrozdziału, Doktorantka wiele faktów potraktowała bardzo ogólnikowo. Proszę o dokładniejsze omówienie reakcji katalizowanych przez ten enzym (Rys 1). Ponadto na tym rysunku niewłaściwie przedstawiony jest zapis strzałkowy, zastosowana strzałka jest tzw.

„strzałką mezymeryczną” stosowaną przy rysowaniu struktur granicznych. Doktorantce niestety nie udało się uniknąć błędów w tej części pracy. Przykładowo w rozdziale 1.3.4. dotyczącym znaczników fluorescencyjnych wrażliwych na zmianę pH, Doktorantka na Rysunkach 16, 17, 18 nie uwzględniła możliwości protonowania grup aminowych w obniżonym pH. Bez wątpienia imponująca jest liczba odnośników literaturowych zawartych w rozdziale Introduction (aż 321 pozycji).

Kolejny główny rozdział przedstawia cel pracy, który został przygotowany poprawnie. Szkoda, że Doktorantka nie przedstawiła struktur planowanych do otrzymania związków, co ułatwiłoby śledzenie tekstu. Co prawda na Rysunku 32 przedstawione zostały etapy projektu i główne cele badań, ale w moim przekonaniu fragment przedstawiający projektowanie, syntezę i charakteryzację nowych wskaźników jest przedstawiony bardzo pobieżnie w sposób zbyt obrazkowy, po pierwsze tak narysowane struktury nie przedstawiają planowanych finalnych związków, płytka TLC wskazuje, że proces analizy związków lub ich rozdzielania będzie bardzo łatwy. Rysunek jest ładny, ale nie niesie właściwej treści. Proszę o dokładniejsze omówienie wykonywanych analiz finalnych związków jak i metod ich oczyszczania w trakcie obrony.

Kolejny rozdział główny „Część eksperymentalna” zawiera opisy metod badawczych. Część ta opisana jest dokładnie, co pozwala na odtworzenie uzyskanych wyników. Na pochwałę zasługuje bardzo dokładna charakterystyka otrzymanych związków.

Najbardziej rozbudowana część pracy to rozdział szósty „Wyniki i dyskusja” Rozdział liczy 84 strony.

Pierwszy etap prac badawczych dotyczył zaprojektowania, syntezy i walidacji dwóch fluorogenicznych związków wrażliwych na zmiany parametrów fizycznych oraz przekształcenie jednej z nich w sondę charakteryzującą się powinowactwem do ludzkiej anhidrazy węglanowej II (hCAII). Synteza związków SOLpH1 i SOLpH2 oparta była na znanych metodach syntetycznych a ich struktury potwierdzono metodami ^1H NMR, ^{13}C NMR i HRMS. Związki były tak zaprojektowane, aby posiadały właściwości fluorogeniczne oraz były wrażliwe na zmiany pH i/lub zmiany polarności. Obie cząsteczki posiadają w strukturze pierścień piperazynowy. Przy wysokim pH sondy nie powinny emitować fluorescencji lub fluoryzować mało wydajnie z powodu wygaszania, natomiast w niskim pH, atom azotu ulega protonowaniu, co wpływa na wzrost fluorescencji. Doktorantka zbadała właściwości fluorescencyjne związków oraz ich wrażliwość na polarność i lepkość w obecności biologicznie istotnych analitów. Wydajność kwantowa fluorescencji, współczynnik ekstynkcji, jasność zostały wyznaczone dla obydwu związków przy pH 4,0 i 7,5.

Doktorantka przeprowadziła również eksperymenty kolokalizacji z trackerami mitochondriów i lizosomów dla dwóch linii komórkowych (zdrowej HEK293T i nowotworowej A549). Doktorantka wykazała, że związki SOLpH1 i SOLpH2 charakteryzują się właściwościami wrażliwości na pH. Obserwowano wzrost emisji przy pH 14-krotny wzrost dla SOLpH1 i 13-krotny wzrost dla SOLpH2 przy zmianie pH. Obliczone pK_a wynosiły odpowiednio 6.4 (SOLpH1) i 6.5 (SOLpH2), co czyni je użytecznymi w badaniach *in cellulo*. Eksperymenty kolokalizacyjne nie wykazały preferencji sond do lokalizacji w mitochondriach lub lizosomach. Ostatnim etapem badań były prace związane z wewnątrzkomórkową detekcją pH w komorach HEK293T. Związek SOLpH1 został dobudowany do związku o udokumentowanym powinowactwie do anhidrazy węglanowej dając finalnie pochodną SOLpH1-Tos. SOLpH1-Tos inkubowano z hCAII i następnie poddano trawieniu trypsyną, a uzyskane peptydy poddano analizie celem znalezienia miejsc modyfikacji (znakowania).

Związek SOLpH1-Tos składa się z krótkiego łącznika wywodzącego się z glikolu etylenowego, reaktywnej grupy tosylovej i odwracalnego inhibitora hCAII, benzenosulfonamidu. Eksperyment znakowania *in vitro* ludzkiej anhidrazy węglanowej II za pomocą sondy SOLpH1-Tos zakończył się sukcesem, a analiza uzyskanych danych potwierdziła reakcję zachodzącą między SOLpH1-Tos a aminokwasem znajdującym się w pobliżu miejsca aktywnego enzymu (histrydyna His64).

Na docenienie zasługuje szata graficzna rozprawy doktorskiej. Imponujący jest również zbiór cytowanych odnośników literaturowych obejmujący 437 pozycji.

Podsumowując, wysoko oceniam wybór ambitnego tematu badań, w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami prac o charakterze podstawowym jak i potencjale aplikacyjnym. Wysoce pozytywnie oceniam zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, oraz trudny i interdyscyplinarny charakter wykonanych prac eksperymentalnych. Na szczególne uznanie zasługuje biegłość wykorzystywania różnorodnych metod syntetycznych oraz sprawność w posługiwaniu się złożonymi, współczesnymi technikami, które to Doktorantka potrafiła zaimplementować w badaniach.

Niestety dorobek publikacyjny mgr Anny Wychowaniec jest dość skromny. Składa się z 1 publikacji *Postępy Biochemii*, 2023, https://doi.org/10.18388/pb.2021_538. (70 punktów - Ministerialna lista czasopism punktowanych 2023 i 2024). Doktorantka jest pierwszym współautorem w tej jednej publikacji stanowiącej podstawę recenzowanej pracy doktorskiej.

Dodatkowo Doktorantka jest również współautorem 6 komunikatów prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

W trakcie obrony pracy doktorskiej, prosilibym Doktorantkę o omówienie planów publikacyjnych uzyskanych w badaniach wyników, ze szczególnym uwzględnieniem wskazania stopnia zaangażowania Doktorantki w przygotowywane publikacje.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone 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 2-18 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 wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Anny Wychowaniec do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska



Łódź, 08. 11. 2024