



**Prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska, prof. zw. PW**

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, tel.: 022-234-5657; fax: 022-234-5631, E-mail: ejmal@ch.pw.edu.pl

---

Warszawa 2019-05-28

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Angeliki Świtalskiej**

pt. *„Fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe oparte na strukturze G-kwadrupleksu, ich charakterystyka i oddziaływanie z monowarstwą Langmuira”*

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Angeliki Świtalskiej zatytułowana *„Fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe oparte na strukturze kwadrupleksu, ich charakterystyka i oddziaływanie z monowarstwą Langmuira”* została wykonana Pracowni Chemii Bioanalitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tematyka pracy wpisuje się w obszar aktualnych zainteresowań badawczych promotora prof. dr hab. Bernarda Juskowiaka i dotyczy opracowania nowoczesnych narzędzi analitycznych, jakimi są sondy fluorescencyjne.

Zapotrzebowanie na różnego typu biosensory i zainteresowanie nimi jako narzędziami diagnostycznymi wciąż dynamicznie rośnie. Zgodnie z prognozą opracowaną przez Global Market Insights, Inc, jeszcze przed 2024 r. rynek biosensorów ma osiągnąć wartość około 29,6 mld dolarów, podczas gdy jeszcze 2 lata temu szacowano go na 14,8 mld dolarów. Należy podkreślić, że badania nad biosensorymi oraz testami biosensorynymi prowadzą renomowane uczelnie i instytucje badawcze na całym świecie, o czym świadczy aktualna liczba publikacji na ten temat. Powyższe argumenty są wystarczająco zachęcające aby podejmować prace badawcze i konstrukcyjne związane z opracowaniem nowych układów biosensorynych oraz optymalizacją już istniejących biosensorów. Jednakże należy pamiętać, że od doniesień literaturowych dotyczących biosensorów na setki analizów

do zastosowania ich jako narzędzi diagnostycznych, czy też oferty handlowej na potrzeby kontroli procesów w przemyśle biotechnologicznym i spożywczym jest daleka i trudna droga. Opracowanie biosensorów o pożądanym parametrach pracy nie należy do prostych zadań i wymaga połączenia wiedzy oraz doświadczenia badaczy reprezentujących różne dyscypliny. Moim zdaniem tematyka recenzowanej pracy znakomicie wpisuje się w powyższy obraz i świadczy o jej aktualności.

### **Strona redakcyjna**

Niniejsza rozprawa ma klasyczny układ składający się z jedenastu ponumerowanych (często jednostronicowych części). Wśród nich zasadniczymi dla ocenianej pracy są rozdziały 1-16 podzielone pomiędzy: III. *Część literaturowa* (rozd. 1-6), V. *Część eksperymentalna* (rozdziały 7-10) oraz VI. *Wyniki i dyskusja* (rozd. 11-16). Poprzedzają je: przydatny *Wykaz skrótów i symboli* (cz. I) i krótki *Wstęp* (cz. II). Manuskrypt zamykają: *Podsumowanie* (cz. VII), *Spis publikacji* doktorantki (cz. VIII), *Streszczenia* w języku polskim (cz. IX) i angielskim (cz. IX) oraz spis cytowanej literatury (cz. XI). Całość została przedstawiona na aż 328 stronach tekstu ilustrowanego licznymi rysunkami (127) i tabelami (15).

W tym miejscu należy podkreślić starania autorki o ładną szatę graficzną pracy. Jednakże w kilku miejscach zbyt małe rozmiary wykresów i zdjęć utrudniają czytelnikowi ich właściwe odczytanie i analizę. Odnośnie błędów edytorskich, skrótów myślowych, anglicyzmów oraz niepotrzebnych powieleń tekstu - w pracy jest sporo fragmentów, które wymagałyby dalszej korekty – jednak biorąc pod uwagę objętość dysertacji są one trudne do całkowitego wyeliminowania.

### **Wartość merytoryczna i użytkowa**

We wstępie doktorantka zarysowuje motywy, które zdecydowały o podjęciu badań opisanych w przedłożonej dysertacji i uzasadnia ich istotę zarówno z punktu widzenia badań podstawowych, jak i praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników.

Część literaturowa stanowi wprowadzenie do zagadnień poruszanych przez doktorantkę w trakcie realizacji badań. Zadanie to nie było łatwe, biorąc pod uwagę liczbę doniesień literaturowych kryjących się za tytułami rozdziałów tej części: kwasy nukleinowe, G-kwadruplesy, telomery, aptamery, (w tym ich struktura, funkcje

biologiczne i chemiczne oraz zastosowania), biosensory i sondy fluorescencyjne, nanoklastry srebra (metody syntezy i zastosowania), czy też techniki Langmuir-Blodgett'a (otrzymywania warstw, ich charakteryzacji i zastosowania jako modelu błony komórkowej). Uważam, że doktorantka dokonała rozsądnego wyboru pozycji literaturowych i przedstawiła bardzo wartościowe, przemyślane i dobrze udokumentowane (536 odnośników literaturowych) opracowanie, świadczące o dobrej znajomości tematu i odpowiednim przygotowaniu do planowania i realizacji zadań badawczych przed nią stojących. Za szczególnie przydatne uważam szczegółowe omówienie G-kwadrupeksów – ich struktury, topologii, oddziaływania z kationami metali i innymi ligandami, jak również technik badawczych służących analizie G-kwadrupeksów oraz bardziej złożonych sekwencji, w ramach których mogą być tworzone struktury G-kwadrupeksowe. W tej części zabrakło mi natomiast rozdziału omawiającego dostępne narzędzia analityczne (w tym także różnego typu sensory) umożliwiające oznaczanie jonów potasu w płynach zewnątrz i wewnątrzkomórkowych i/lub materiale biologicznym.

Cel pracy i kolejne etapy jego realizacji zostały sformułowane jasno i precyzyjnie. Doktorantka obiecuje (cytuje): „*opracowanie nowatorskiego sensora do monitorowania jonów potasu przy powierzchni błony komórkowej*”. Aby ten cel osiągnąć doktorantka zaprojektowała sondy, w których wykorzystwała oligonukleotydy o określonej liczbie i sekwencji zasad modyfikowane hydrofobowymi cząsteczkami cholesterolu, jak również różnego typu barwnikami fluorescencyjnymi i wykonała ich charakterystyki spektralne. Kolejnym etapem było sprawdzenie efektywności działania zaprojektowanych sond fluorescencyjnych w połączeniu z modelem błony komórkowej. W celu zbadania oddziaływań sond z jonami potasu (docelowy analit) i jonami sodu oraz roli ugrupowania hydrofobowego, doktorantka wykonała serię badań dla monowarstwy bromku dioktylodimetylo-amoniowego (DODAB) otrzymanej na subfazie wodnej zawierającej opracowane sondy nukleotydowe. W kolejnym etapie prac doktorantka zastosowała monowarstwy DODAB przy rejestracji widm fluorescencyjnych ilustrujących układ sonda-monowarstwa na granicy faz woda powietrze i ewaluacji efektów optycznych testowanych znaczników.

W części eksperymentalnej doktorantka zestawiała charakterystyki odczynników stosowanych w badaniach i przepisy wykonawcze, przedstawiła listę aparatury pomiarowej i poszczególne procedury pomiarowe. W tej części odnaleźć można

także informacje, które badania/pomiary wykonywane były w innych laboratoriach niż macierzyste doktorantki. Nasuwa się tylko pytanie: czy doktorantka miała możliwość uczestniczenia w tych badaniach, czy były to badania zlecone do wykonania, a doktorantka otrzymała wyniki wraz z ich interpretacją?

Materiał przedstawiony przez doktorantkę w części „Wyniki i dyskusja” jest imponujący. Zarówno liczba zaprezentowanych wyników, jak i zastosowanych technik robi wrażenie. Jeżeli badania zostały zrealizowane w regulaminowym okresie studiów doktoranckich przez jedną osobą, to stoi za tym tytaniczna praca. Za najważniejsze osiągnięcie doktorantki uważam innowacyjne i eleganckie podejście do zaprojektowania struktury sondy czulej na jony potasu, przeznaczonej do monitorowania stężenia tych jonów w procesach zachodzących z udziałem składników błon komórkowych. Doktorantka połączyła tu wiedzę literaturową i bogate doświadczenia macierzystej grupy badawczej dotyczące zdolności tworzenia struktury przestrzennej (tzw. G-kwadrupeksu) w wyniku oddziaływania kwasów nukleinowych o wysokiej zawartości guaniny z jonami potasu. Mgr Świtalska w umiejętny sposób zaprojektowała i wykonała odpowiednią modyfikację nici oligonukleotydu (na końcach 5' i 3') znacznikami fluorescencji by móc rejestrować fakt powstania struktury G-kwadrupeksu. W tym celu wybrała i szczegółowo scharakteryzowała 4 typy związków: klasyczne barwniki FRET, cząsteczki pirenu (emisja escymetryczna), koniugaty pirenylodezoksyurydyny oraz nanoklastry srebra syntezowane na fragmentach nici bogatych w zasady cytozynowe. Wartym podkreślenia jest tu nowatorskie podejście doktorantki, która zaproponowała dowiązanie cząsteczek cholesterolu, naturalnego składnika błon komórkowych, do nici oligonukleotydu – dzięki czemu można oczekiwać „zakotwiczenia” uzyskanej sondy w strukturze błony komórkowej.

Badania zostały starannie zaplanowane i przeprowadzone. W większości przypadków postawione tezy zostały potwierdzone danymi uzyskanymi przy zastosowaniu szerokiej gamy właściwie dobranych technik pomiarowych (w tym: spektrofluorymetrii, spektrofotometrii, dichroizmu kołowego, transmisyjnej mikroskopii elektronowej i mikroskopii sił atomowych). Otrzymane sondy doktorantka badała wstępnie z wykorzystaniem układu modelowego błony komórkowej, a na zakończenie zaprezentowała badania na poziomie „*proof of concept*” poprzez przeprowadzenie analizy z użyciem komórek HeLa.

Po zapoznaniu się z wynikami i dyskusją uważam, że badania wykonane przez mgr Świtalską są wartościowe, wnoszące nowe informacje poszerzających wiedzę w zakresie konstrukcji biosensorów optycznych. Zaproponowane przez doktorantkę rozwiązanie można uznać za konkurencyjne w odniesieniu do obecnie istniejących metod oznaczania jonów potasu (analitu istotnego z punktu widzenia diagnostyki medycznej). W szczególności odnosi się to do możliwości zastosowania opracowanych sond w monitorowaniu transportu jonów przez membrany komórkowe.

Niemniej jednak, po lekturze manuskryptu nasuwają się pewne uwagi, pytania i wątpliwości. Kilka z nich zamieszczam poniżej:

- podstawowym celem badań było opracowanie sond oligonukleotydowych do fluorescencyjnego monitorowania stężenia jonów potasu. W pracy zabrakło mi porównania parametrów pracy (tj.: granica detekcji, zakres liniowej odpowiedzi, selektywność, czas odpowiedzi, czas życia, itp.) czujników/sond opracowanych przez doktorantkę z innymi znanymi już sensorami lub technikami pomiarowymi stosowanymi do oznaczania jonów potasu w próbkach biologicznych. Jakie są korzyści z zastosowania przebadanych sond w porównaniu z innymi technikami do detekcji jonów potasu (np. potencjometrycznymi);
- zastosowanie nanoklastrów srebra należy uznać za nowatorskie podejściem do znakowania sond oligonukleotydowych. Na str. 294 doktorantka napisała (cytuję): Końcowym etapem było monitorowanie jonów  $K^+$  przy powierzchni błony biologicznej (komórki HeLa) w oparciu o najbardziej obiecujące układy sonda/DODAB (Ch(FTBA-T, Ch(py-TBA-py)). Czy to oznacza, że sondy bazujące na nanoklastrów srebra (Tel22C12-AgNCs) są dużo gorsze?
- w pracy jest mowa o monitorowaniu jonów potasu. Jak długo opracowane sondy działały by sprawnie? Mam na myśli śledzenie/pomiar stężenia jonów potasu w czasie.

Uwagi szczegółowe:

- przykładowo: rysunki 38, 41, a zwłaszcza 47, 86 są mało czytelne ze względu na fakt, że przedstawiono na nich zbyt wiele wykresów dla poszczególnych sond – może lepszym rozwiązaniem byłoby powiększenie ich i umieszczenie np. na 2 stronach?

- eksperymenty dotyczące właściwości spektralnych i stabilności dla wszystkich badanych układów były wykonywane według pewnego przyjętego schematu. Jaki był klucz wyboru obiektów badań w przypadku np. analiz techniką AFM czy też wyznaczania krzywych kalibracji tylko dla określonych sond?
- dla ułatwienia odczytania Rys. 7, 8 i 9 warto by było dodać objaśnienia odnośnie kolorów użytych dla poszczególnych nukleotydów;
- w tabelach 9, 13, 14 przy niektórych wynikach Doktorantka zaznaczyła, że wynik temperatury topnienia jest „niewiarygodny”. Do czego odnosi się to określenie? Wartości liczbowych czy też krotności pomiarów?
- na wykresie (rys. 120) nie pokazano odchylenia standardowego (lub jest tak małe, że aż niewidoczne), stąd pytanie o liczbę powtórzeń pomiarów wykonanych dla danego stężenia. Analogiczne pytanie w odniesieniu do pomiarów wykonano przy badaniu selektywności  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ ?
- co kryje się pod pojęciami: pompa efflux, kaseta TATA, proksymalne regiony, zasady interweniujące, biorecepcja?

Powyższe uwagi i komentarze mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają mojej oceny o recenzowanej pracy.

Dorobek publikacyjny mgr Angeliki Świtalskiej, biorąc pod uwagę etap jej rozwoju naukowego, oceniam jako znaczący. Obejmuje on współautorstwo 5 prac (w tym 4 w czasopiśmie z listy JCR). Co do innych form aktywności naukowej (postery, wystąpienia konferencyjne) – nie posiadam takiej wiedzy i trudno mi się wypowiedzieć. Na wyróżnienie zasługuje natomiast fakt zdobycia przez doktorantkę środków finansowych na realizację badań w ramach konkursu NCN Preludium (nr 2015/19/N/ST4/00407), a także uczestniczenie w realizacji grantu OPUS (nr 2011/01/B/ST4/01188).

**Podsumowując:**

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska zawiera szereg wartościowych wyników. W pracy eksperymentalnej doktorantka wykorzystwała wiele komplementarnych metod instrumentalnych. Uzyskane wyniki przedstawione są w rzetelny sposób, a uzyskane na ich podstawie wnioski są w pełni uzasadnione.

Warte podkreślenia są także następujące aspekty/elementy pracy:

- nowatorskie treści naukowe odnoszące się do umiejętnego wykorzystania posiadanej wiedzy w zakresie projektowania warstw receptorowych i systemów detekcji dla biosensorów/sond fluorescencyjnych;
- dojrzałość doktorantki w projektowaniu badań, w tym przemyślany dobór obiektów badań oraz narzędzi badawczych w celu potwierdzenia stawianych hipotez;
- zrozumienie konieczności łączenia wyników podstawowych prac badawczych z praktycznymi zastosowaniami, co zaowocowało opracowanie konstrukcji sond fluorescencyjnych o dużym potencjale aplikacyjnym;

Oceniając pozytywnie recenzowaną pracę stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Angeliki Świtalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc zaś pod uwagę wysoką jakość samej dysertacji, całkowitego dorobku naukowego, jak i to na jak wczesnym etapie kariery naukowej jest mgr Angelika Świtalska, uważam, że jej dotychczasowe osiągnięcia z zasługują na wyróżnienie.

Z poważaniem,

