



KATEDRA  
BIOFIZYKI

Lublin, 19 października 2023 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki  
Katedra Biofizyki  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Hoang-Bujnowicz  
pt. „Wpływ indukowanego stresu komórkowego na dynamikę chromatyny  
i białka 53BP1 badany fluorescencyjną spektroskopią korelacyjną”**

Dynamiczny rozwój zaawansowanych technik badawczych, którego jesteśmy świadkami, przyniósł nam możliwości obrazowania pojedynczych molekuł oraz badania procesów w nich zachodzących. Podejście takie, do niedawna pozostające w sferze literatury science-fiction, leży na przeciwległym biegunie w stosunku do klasycznych badań przyrodniczych opierających się na efektach statystycznych zespołów cząsteczek, charakteryzowanych ich liczbą rzędu wielkości stałej Avogadro. Można odnieść wrażenie, iż w naszej ewolucji metod badawczych przeskoczyliśmy z jednego ekstremum do drugiego, pozostawiając niejako nie wykorzystany wysoce interesujący obszar badawczy charakteryzowany stosunkowo nielicznymi grupami obiektów jaki stanowią na przykład makromolekuły. Wydaje się, iż technika fluorescencyjnej spektroskopii korelacyjnej (FCS), stosowana w pracy doktorskiej pani

mgr Agnieszki Hoang-Bujnowicz „zagospodarowuje” ten właśnie zakres. Uwzględniając ponadto fakt, iż projekt doktorski dotyczy istotnych z naukowego punktu widzenia uszkodzeń materiału genetycznego w jądrze komórkowym, przedmiotową rozprawę postrzegam nie tylko jako interesującą, ale również wysoce ważną oraz aktualną.

Praca doktorska wykonana została w Zakładzie Biofizyki Komórki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem pana prof. dra hab. Jerzego Dobruckiego. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 189 stronach standardowego maszynopisu. Rozdział 1. oraz 2. stanowią streszczenia opracowane w języku polskim oraz angielskim, czyniące zadość wymaganiom formalnym w tym względzie. Rozdział 3 pt. „Wstęp” zredagowany został na zasadzie przeglądu literaturowego, w oparciu o podstrukturę pięciu podrozdziałów, z których każdy wprowadza czytelnika w zagadnienia istotne z punktu widzenia przeprowadzonych badań. Są to problemy dotyczące, między innymi, uszkodzeń i naprawy DNA, struktury chromatyny, podstaw fizycznych oraz opisu formalnego procesu dyfuzji oraz metod badania mobilności pojedynczych biomolekuł (w szczególności technikę FCS). W tym miejscu swojej analizy chciałbym szczególnie zwrócić uwagę na klarowność tekstu i precyzję przedstawionych opisów odwołujących się do równań matematycznych, w sposób systematyczny wyprowadzanych i prezentowanych czytelnikowi! Cele pracy doktorskiej, zarówno te strategiczne jak i cząstkowe, sformułowane zostały w ramach rozdziału 4. pt. „Cele pracy”. Wart podkreślenia jest fakt, iż punktem wyjścia oraz osnową projektu doktorskiego była weryfikacja interesującej hipotezy badawczej dotyczącej kondensacji białek odpowiedzi na stres związany z foto-uszkodzeniem nici DNA. Chociaż przeprowadzone w ramach realizacji projektu doktorskiego badania nie potwierdziły tych przypuszczeń stały się źródłem bardzo wielu zaskakujących, przez to cennych informacji, w myśl zasady, iż najciekawszymi wynikami badań naukowych są te, których nie możemy przewidzieć bez ponoszenia trudu eksperymentowania. Prezentację części doświadczalnej rozprawy poprzedza zwykle rozdział zatytułowany



„Materiały i metody”. W zgodzie z tym schematem postąpiła również mgr Agnieszka Hoang-Bujnowicz redagując rozdział 5. W moim odbiorze, rozdział ten jest, jednakże opracowaniem o wiele bardziej pełnym niż zestawienie szczegółów dotyczących zastosowanych materiałów oraz ustawień aparaturowych. Uwaga ta dotyczy w szczególności przeprowadzonych pomiarów FCS, które poprzedzone zostały odpowiednimi procedurami kalibracyjnymi w układach modelowych oraz żywych komórkach, wymagały dopasowania analitycznych postaci funkcji autokorelacji oraz obejmowały symulacje stochastyczne. Zasadniczą część rozprawy stanowi rozdział 6. pt. „Wyniki”. Rozdział ten zredagowany został w oparciu o podstrukturę odpowiadającą poszczególnym zadaniom badawczym projektu doktorskiego, obejmującym między innymi: poszukiwanie metod uwzględnienia w analizach procesu wybielania fluoroforów oraz ich przechodzenie w stan „ciemny”, badania mobilności białek 53BP1 w miejscu uszkodzenia oraz ocenę możliwości badania ruchu włókien chromatyny z zastosowaniem techniki FCS. Uzyskane wyniki zostały poddane wieloaspektowej analizie oraz dyskusji w ramach rozdziału 7. pt. „Dyskusja”. Wnioski z uzyskanych wyników przeprowadzonych badań, ich analizy oraz przeprowadzonej dyskusji sformułowane zostały i zestawione w ramach rozdziału 8. pt. „Podsumowanie”. W mojej ocenie, wśród szczególnej rangi rezultatów pracy doktorskiej pani mgr Agnieszki Hoang-Bujnowicz znajdują się następujące:

1. Opracowanie oraz walidacja podstaw metodologicznych do analizy porównawczej dynamiki ruchów znakowanych fluorescencyjnie molekuł w różnych kompartmentach komórkowych, w szczególności w środowisku cytoplazmatycznym oraz jądrowym.
2. Postawienie interesującej hipotezy dotyczącej „superdyfuzji” histonu łącznikowego mogącej być efektem jego wymiany na chromatynie.

3. Ukazanie złożoności procesów naprawczych w obrębie ognisk uszkodzenia materiału genetycznego przejawiającej się, między innymi, ruchliwością włókien oraz białek naprawczych.

Analizowana rozprawa doktorska jest również, w mojej ocenie, opracowaniem przygotowanym z dbałością o warstwę językową oraz szatę graficzną. W oparciu o lekturę pracy, mógłbym zaproponować Doktorantce dosłownie pojedyncze korekty/modyfikacje. Oto ich krótka lista:

1. Str. 14., 2. wiersz od dołu: proponuję „wykrywania” w miejsce „wykrywaniu”
2. Str. 18., 12. wiersz od dołu: „zachodzącym” zamiast „zachodzących”
3. Str. 25., 2. wiersz od góry: proponuję „co odpowiada odcinkowi DNA około...” w miejsce „co odpowiada około odcinkowi DNA...”
4. Str. 69., 2. wiersz od góry: „miernika fotodiodowego” zamiast „miernika photodiodowego”
5. Str. 98., 6. wiersz od góry: „superspacja” na kilka wierszy pojawiła się prawdopodobnie przypadkowo
6. Str. 105., 4. wiersz od góry: zamiast „czy, że” proponuję użycie bądź „czy” bądź „że”
7. Str. 120., wiersze 14.-15. od dołu: odnoszę wrażenie, iż zdanie nie ma podmiotu
8. Str. 126., 6. wiersz od góry: proponuję „brakowi” w miejsce „brak”.

Tak obszerne i nacechowane podejściem nowatorskim opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską pani mgr Agnieszki Hoang-Bujnowicz, wnosi wiele cennych informacji, otwiera nowe obszary badań ożywiając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być, następujące pytania:

1. Bardzo wysoko oceniam przeprowadzoną w rozprawie dyskusję dotyczącą „stanów ciemnych” fluoroforów oraz sposoby uwzględnienia ich



w przeprowadzonych analizach FCS. Zastanawiam się, czy w procesie walidacji wprowadzonych rozwiązań można by, na przykład przeprowadzić eksperymenty w układach modelowych z białkami znakowanymi fluoroforami różniącymi się diametralnie wydajnością przejść międzysystemowych prowadzących do formowania stanów trypletowych: na przykład fluoresceiną (ISC ~2 %) bądź porfirynami (ISC > 30 %)? Ciekaw jestem jakie jest zdanie doktorantki na ten temat?

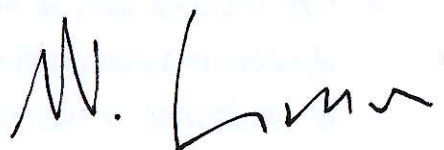
2. Ciekaw jestem czy białka fluorescencyjne stosowane do znakowania badanych struktur w przeprowadzonych badaniach FCS, charakteryzujące się znaczną masą cząsteczkową, mogą mieć wpływ na dynamikę badanych procesów?
  
3. Czy możliwe jest, iż w obliczu indukowanych światłem uszkodzeń DNA stresowi oksydacyjnemu ulegają również powierzchnie białek? Mogłoby się to przejawiać w utlenianiu/modyfikacji wybranych grup białek, włączając 53BP1, wpływając na formowanie struktur wyższych rzędów. Spodziewać się można, iż oligomeryzacja zdecydowanie mogłoby się przekładać na efekty obserwowane z zastosowaniem techniki FCS. Ciekaw jestem zdania Doktorantki na ten temat.

### *Konkluzja*

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Agnieszka Hoang-Bujnowicz przedstawiła rozprawę doktorską opartą na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych prac koncepcyjnych oraz eksperymentalnych. Prac wymagających erudycji w zakresie biologii komórkowej oraz

znacznego doświadczenia w prowadzeniu badań w oparciu o zaawansowane techniki mikroskopii fluorescencyjnej.

Moim zdaniem, przedstawiona przez panią mgr Agnieszkę Hoang-Bujnowicz rozprawa doktorska zawiera rozwiązania ważnych oraz aktualnych problemów naukowych, wnosi do nauki światowej znaczący postęp, spełniając tym samym wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich, czyniąc zadość warunkom określonym w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz. Ustaw z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164 poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pani mgr Agnieszki Hoang-Bujnowicz do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Lema". The signature is written in a cursive, somewhat stylized script.