



## Single-molecule fluorescence detection in molecular biology

Submitted by **Tomas Fessl**

“Oponentský posudek disertační práce”

Before going into details one has to state that the PhD thesis „**Single-molecule fluorescence detection in molecular biology**” written by T. Fessl is based on 3 original papers published in international journals and two research reports. According to the original publications shown in the PhD work, T. Fessl acts as the first author in 2 original papers. When going through those two papers, it becomes evident that T. Fessl has considerably contributed to those papers. Thus those two papers can be considered as the core of this PhD work.

The first paper “Depth of focus extended microscope configuration for imaging of incorporated groups of molecules, DNA constructs and clusters inside bacterial cells” is a technical one. In this paper T. Fessl presents the implementation of an all-optical and a real time technique of extension in the depth of focus that may be incorporated in any high NA microscope system. Specifically, it is demonstrated how after the integration of special optical element in high NA 100x objective lens of a single molecule imaging microscope system, the depth of focus is significantly improved while maintaining the same lateral resolution in imaging applications of incorporated groups of molecules, DNA constructs and clusters inside bacterial cells. It is evident that by that project T. Fessl entered in the early stage of his PhD work the field of fluorescence microscopy and his experimental skills led to the solution of a specific experimental problem, which was worth of being published.

The second core paper “Towards characterization of DNA structure under physiological conditions *in vivo* at the single-molecule level using single-pair FRET” was published in a journal with a high impact factor. In this work the fluorescence lifetimes of five DNA duplexes of a length of 8–16 bp terminally labeled with ATTO680 and ATTO680/ATTO740 fluorophores in free solution and in living *E. coli* cells were investigated. By that means the dependencies of FRET efficiencies on variable length inside living bacterial cells versus corresponding modulation *in vitro* were compared. Interestingly the absolute FRET efficiencies values strongly differ. These experiments were used to estimate the precision for the interprobe distance determination from FRET efficiency values acquired *in vivo* and in diluted buffers, with an medium encouraging outcome (~31% *in vivo*). Moreover, the data was used to discriminate between A-DNA and B-DNA conformations: “Statistical comparison between the experimental and model PDFs clearly indicated better agreement of in-cell spFRET experimental data with B-DNA compared to the A-DNA model”.

As I consider this paper as crucial, I do have 3 questions:

- 1) Figure 2: Step 3—“Fluorescence lifetimes from the constructs labeled with the donor (ATTO680) and from the constructs labeled with the complete FRET pair (ATTO680 and ATTO740) were acquired and used for calculation of the FRET efficiencies ( $E_{\text{FRET}}$ ).” Here original data TCSPC data (method not really specified in the text) is shown and about 50 counts (!) were collected in the maximum. What

is the intrinsic precision in the determination of the lifetime having such a poor photon counting statistics? To what extent is that precision already responsible for the 31% precision of the entire multi-step approach?

- 2) Figure 2: C: “A representative photon-trace from DNA construct labeled with the donor (ATTO680) inside *E. coli* cell showing single step photobleaching. The trace demonstrates that the fluorescence signal comes from single molecule” As the labeled DNA should be located in the nucleus and was excited by TIRF illumination, there might also have been cases when one found two labeled DNA in the focus. Did one then find the two step bleaching pattern? This experiment is important to prove that validity of the given interpretation of the bleaching pattern.
- 3) “As for the spectral properties of fluorophores, it is, unfortunately, experimentally impossible to acquire  $Q_0$  and  $J$  in the context of an intact living cell due to technical difficulties with recording the absorbance spectra and quantum yield of individual molecules. Therefore, to account for altered spectral properties of fluorophores in a cellular environment, we acquired the extinction coefficient of the acceptor, the fluorescence quantum yield of the donor, the orientation factor and the overlap integral of the FRET pair using a bulk amount of DNA mixed with the crude lysate from bacterial cells. Quantitative agreement between the fluorophore emission spectra and lifetimes recorded both *in vivo* and in the crude bacterial lysate indicated that the fluorophores’ spectral properties in the crude bacterial lysate were similar to those in intact living cells”. As the structural interpretation of the *in vivo* single molecule FRET data is fully based on these experiments, it would be the natural step “in between buffer and cells” do perform bulk lifetime experiments in the crude lysate. From statistical point of view those experiments would be closer to the “*in vitro*” experiments, and as argued above the DNA environment would be very similar to the *in vivo* situation. Did T. Fessl do those experiments, and what was the outcome? If not, why did he not do those experiments?

When reviewing the scientific value of this PhD work and the contribution of T. Fessl to this work, the remaining three results listed in the PhD thesis have to be considered as less important: The PCCP paper is exclusively a computational one. It appears that the “so-called” *in silico* experiments were performed by the colleagues Kabelac and Lankas. The results three and four were not yet really published. Here just one comment to chapter 4: Figure 2 and figure 4 indicate that the quality of the original data was rather poor, which might not really help when trying to publish this part.

The thesis is written in good English and is logically structured. In the introductory part the thesis gives a very good overview on single molecule fluorescence techniques, which I enjoyed reading. Overall the thesis certainly fulfills the Czech standards for obtaining a PhD. Thus I do absolutely have no doubts that this PhD thesis should be accepted by the PhD examination board. For the case T. Fessl will successfully defend his thesis, she should be awarded with the title PhD.



Prague, 07.02.2013

Prof. Dr. Martin Hof, DSc.

# Posudek oponenta na dizertační práci

**Autor práce:** Mgr. Tomáš Fessler

**Název práce:** Single-molecule fluorescence detection  
in molecular biology

**Oponent a jeho  
pracoviště:** Mgr. Ctirad Hofr, Ph.D.  
Molekulární komplexy chromatinu  
CEITEC a Přírodovědecká fakulta  
Masarykova univerzita

## Komentáře a dotazy oponenta

Dizertační práce je zaměřena na popis principu a demonstrace užití technik založených na detekci fluorescence jednotlivých molekul při experimentech v molekulární biologii.

**V teoretické části** práce jsou precizním a zároveň hutným způsobem shrnuty metody nejprve v historickém kontextu jejich vývoje, dále z hlediska jejich využití a nakonec je čtenář seznámen se způsoby přípravy vzorků pro měření. Mohu konstatovat, že teoretická část sama o sobě může dobře posloužit jako vynikající studijní materiál pro všechny, kdo se chtějí dozvědět důležité základy fluorescenčních metod zaměřených na detekci jednotlivých molekul.

**Výsledková část** práce obsahuje celkem pět studií; jednu konstrukčně vývojovou, jednu teoretickou studii za použití molekulové dynamiky a tři experimentální studie využívající fluorescenční přístupy k popisu důležitých biologických procesů a mechanismů. Velmi jsem ocenil právě široký záběr studovaných problémů, který ukazuje, že se pan Mgr. Tomáš Fessler během doktorského studia seznámil s různými přístupy, které bude moci v budoucnu kombinovat.

**Závěry studií** jsou přehledně shrnuty na konci práce ve formě přibližně půlstránkových sdělení.

Celé uspořádání práce je logické a dobře promyšlené. Dělení práce na jednotlivé oddíly odpovídá zvyklostem prezentace vědeckých výsledků. Práce je svojí odbornou úrovní a profesionálním zpracováním zcela srovnatelná s disertačními pracemi pocházejícími z renomovaných zahraničních univerzit.

**Celkově tuto dizertační práci s potěšením doporučuji k obhajobě.**

V rámci diskuse bych rád požádal pana Mgr. Tomáše Fessla o vyjádření se k následujícím dotazům a podnětům.

### **Dotazy a podněty k diskusi**

1. Vysvětlete prosím pojem „Molar absorptivity“ na str. 34 a uveďte případné české názvy stejné veličiny. Navrhněte, jak byste určil hodnotu „Molar absorptivity“ v případě zcela neznámého fluoroforu.
2. Která z metod uvedených v přehledu na obrázku 8 na straně 32 je podle Vás nejspolehlivější v prostředí živých buněk?
3. Jak by bylo možné na základě molekulové dynamiky určit a následně experimentálně ověřit jaká poměrná část fluoroforů je zhašena vlivem interakcí fluoroforu s nukleotidy v případě kovalentně vázané molekuly fluoroforu k DNA?
4. Vysvětlete, jakým způsobem byla v případě FRET experimentů prováděna korekce na zhášení a přímou excitaci akceptoru.
5. Navrhněte podmínky a experimentální uspořádání, které by vedlo ke zvýšení přesnosti stanovení vzdálenosti za použití spFRET v živých buňkách.
6. Mohl byste prosím v rámci prezentace obhajoby práce zmínit, jaký byl Váš příspěvek v případě jednotlivých studií? Stačí krátce jednou větou.

V Brně dne 7.2.2013



Mgr. Ctirad Hofr, Ph.D.



### Oponentský posudek disertační práce Mgr. Tomáše Fessla

Předložená disertační práce Tomáše Fessla je nazvána „*Single-molecule fluorescence detection in molecular biology*“ a má formu souboru 5 článků (resp. 3 článků v impaktovaných časopisech a 2 nepublikovaných reportů) s přehledným úvodem a krátkým závěrem – komentářem k článkům. Práce vznikla na Jihočeské univerzitě (pod vedením prof. F. Váchy a dr. F. Adamce) a na Univerzitě v Leedsu.

Téma práce představuje velmi aktuální problematiku, která se v posledních 15 letech postupně rozvinula v široký obor s velkou perspektivou do budoucna. Tomáš Fessl začal už během magisterského studia pracovat v laboratoři F. Váchy, kde pomáhal dále rozvíjet základní aparaturu pro fluorescenční zobrazování a spektroskopii jednotlivých molekul tak, aby se dala aplikovat na problémy molekulární biologie. Jak je vidět z této disertační práce, podařilo se mu nakonec některé techniky SMFD, zejména spFRET (single-pair Fluorescence Resonant Energy Transfer) a FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), zvládnout prakticky i po stránce teoretické a výpočetní interpretace.

První část práce představuje 40-ti stránkový přehled oboru, který je poměrně kvalitní a podrobný (má 191 odkazů) a je přístupný i nepoučenému čtenáři. Totéž ovšem nemohu říci o souboru vlastních pěti prací. Tento soubor je sice opatřen dodatečným závěrem, ale o rozsahu pouze 2,5 strany, což vůbec nepostačuje. Představoval bych si, že zde bude nastíněn obecnější spojovací rámec a ideje spojující jinak poměrně heterogenní práce. Zde se nespécialista pravděpodobně ztratí. V odborných člancích, určených vědcům z oboru, totiž je, pochopitelně, řada „evidentních“ věcí vynechána. Proto by komentář k pracím měl tyto mezery doplnit a poskytnout klíč k pochopení geneze celé práce.

Při podrobnějším pohledu na jednotlivé přiložené články vyvstávají otázky z nichž některé by bylo dobré probrat během obhajoby.

1. První článek se týká ověření techniky, která umožňuje zvýšit hloubku ostrosti mikroskopického zobrazení (extended depth of focus – EDOF). Klíčovou komponentou je zde „fázový prvek“, který se umísťuje mezi objektiv a vzorek. Nikde, bohužel, není uvedeno jak přesně tento prvek vypadá (pravděpodobně jde o mezikruží, nebo několik soustředných mezikruží, jakých rozměrů a z jakých materiálů?), jak se ustavuje do správné polohy a kdo jej (fotolitograficky) vyrobil. Prosim tedy o doplnění a také komentář k otázce z jakého důvodu není tento prvek širěji využíván - tedy, jaké jsou jeho nevýhody? Zmíněna je určitá ztráta kontrastu, ale s poznámkou, že není závažná. Jinak, na první pohled, má použitý systém obrovské výhody oproti jiným technikám; zejména nevyžaduje žádné softwarové zpracování digitálního obrazu, takže je funkční i při pohledu okem skrze okulár.

2. Druhý článek se týká molekulární simulace interakce QSY 21 („zhášeč“) a Rhodaminu 6G (fluorescenční barvivo) s DNA, kde pro obě molekuly byly nalezeny dvě vazební konfigurace a řada dalších informací. Zde bych poprosil o komentář, jak výsledky těchto simulací přispěly k další experimentální práci na FRET.

3. Čtvrtý článek se týká sledování dynamiky tvorby kapsidy bakteriofágu MS2 pomocí fluorescenční korelační spektroskopie (FCS). FCS má různé použití, ale zde jde konkrétně o měření hydrodynamického poloměru objektů z difusních časů. Tato technika má mnoho výhod, především pracuje s nízkou koncentrací sledovaných objektů a principiálně funguje také *in vitro*. Nevýhodou je, že z naměřené autokorelační funkce je nutné hledané parametry získat navržením vhodného modelu. Zde byly testovány různé typy distribuce difusních časů (resp. velikostí kapsid). Ukázalo se, že dva stavy (počáteční a konečný) nestačí. Použití náročných numerických výpočtů umožnilo ukázat, že existuje jistý přechodný stav kapsidy. Můžete, prosím, uvést s jakou neurčitostí se dají určit hydrodynamické poloměry difundujících částic (kapsid) těmito postupy a jak se dá neurčitost minimalizovat?

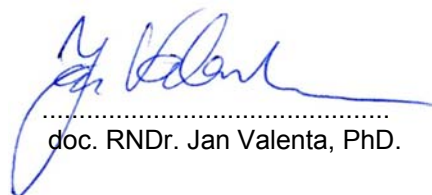
4. Nakonec bych poprosil o komentář k, trochu matoucímu, dvojímu významu zkratky FRET, někdy se za ní skrývá *Förster Resonance Energy Transfer* (v článku 2, 3), někdy je první slovo uváděno jako *Fluorescence* (poslední článek).

Přes jisté (výše uvedené) výtky je však práce velmi dobrá a reprezentuje dlouhodobé úsilí spojené se zvládnutím zcela nových technik. Doktorand neměl to štěstí, že by přišel do hotové laboratoře, zapnul několik přístrojů a výsledky by se hrnuly samy. Zde musel osvědčit vytrvalost a

(jak se v posudcích říká) „schopnost samostatné vědecké práce“. Nakonec, jako dobrou míru kvality můžeme také brát publikování 3 článků ve velmi respektovaných časopisech (nejlepší má IF přes 8) s náročným recenzním procesem. Přitom u dvou prací je T. Fessl prvním autorem a jednou třetím (škoda, že zbylé dva „reporty“ nebyly také publikovány). Vyjádření k autorskému podílu na publikacích, které mají více spoluautorů, je uvedeno a je pro mě distačující.

Závěrem mohu konstatovat, že práce T. Fessla, dle mého názoru, splňuje požadavky kladené na doktorské disertační práce a navrhuji její přijetí jako podklad pro udělení titulu Ph.D.

Dne 23. ledna 2013



.....  
doc. RNDr. Jan Valenta, PhD.