

prof. dr hab. Renata Gadzala-Kopciuch  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Wydział Chemii  
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky  
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

## Recenzja

pracy doktorskiej Pana mgra Krzysztofa Aleksandra Bielca  
pt. *Formation of chemical complexes at subnanomolar concentration scale*  
wykonanej w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

### *Ocena wyboru tematyki badawczej*

Recenzowana rozprawa doktorska, realizowana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Roberta Holysta, została wykonana w Zespole Fizykochemii Miękkiej Materii w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Tematyka pracy jest ściśle związana z problematyką badań prowadzonych przez grupę promotora (w ramach projektu MAESTRO NCN) i najogólniej ujmując, dotyczy analizy reakcji biochemicznych na poziomie pojedynczych biocząsteczek przy zastosowaniu metod spektroskopowych do ich badania. Doktorant podjął się wyznaczenia stałej równowagi ( $K$ ) niekowalencyjnych kompleksów wybierając hybrydyzację komplementarnych oligonukleotydów DNA. W wyniku tych badań została zaproponowana metodyka oparta na zjawisku fluorescencji, pozwalająca na zrozumienie natury procesów biochemicznych leżących u podstaw między innymi skutecznego, celowanego leczenia farmakologicznego, którego opracowanie jest czasochłonne i złożone. Położenie nacisku na wspomniane powyżej badania podstawowe przyczyniają się do rozwoju technologicznego umożliwiającego opracowanie innych, nowych metod i terapii. Założenie z jakiego wyszedł Pan mgr Krzysztof Bielec, że wszystkie oddziaływania sprowadzają się do prostych typów reakcji, które mogą pomóc w wyjaśnieniu działania nowych farmaceutyków, jest w pełni uzasadnione. Ponadto, podejście to umożliwi wyjaśnienie łączenia się leku np. z białkami w wyniku reakcji biochemicznych przebiegających w organizmach żywych (poznanie szlaków metabolicznych). Dlatego też można stwierdzić, że tematyka badawcza prezentowana w recenzowanej rozprawie doktorskiej jest aktualna i ważna z naukowego punktu widzenia.

### *Ocena merytoryczna rozprawy*

Recenzowana rozprawa napisana jest w języku angielskim i obejmuje łącznie 89 stron nie wliczając w to strony tytułowej, zestawienia dorobku naukowego Doktoranta, spisu treści, streszczenia w języku angielskim i polskim (każde ze streszczeń po 1,5 strony). Zilustrowana jest 32 rysunkami i zawiera jedną tabelę. Niestety, Autor niezbyt

jasno sprecyzował nadrzędny cel pracy, gdzie powinien wykazać się umiejętnością jasnego określenia problemu, odpowiedniego sformułowania tego problemu oraz pytań badawczych i hipotez.

Praca posiada klasyczny układ i podzielona została na następujące rozdziały:

- wprowadzenie połączone z częścią literaturową (23 strony),
- część doświadczalna:
  - materiały i metody (7 stron),
  - wyniki i ich dyskusja (41 stron),
  - podsumowanie i wnioski (4 strony).

Rozprawę kończy spis literatury, który obejmuje 169 pozycji (powinno być 168, ponieważ dwukrotnie zacytowana jest publikacja 50 i 83). Zestawienie literatury jest zrobione rzetelnie, w szczególności ujęto najnowsze doniesienia naukowe.

Celem recenzowanej rozprawy było opracowanie molekularnej analizy jasności jako nowatorskiego podejścia do wyznaczania stałej równowagi tworzenia niekowalencyjnych kompleksów. Cel badawczy został sformułowany bardzo ogólnikowo, jednak dotyczy oryginalnego podejścia do tematu badawczego, który nie był wcześniej opisany w literaturze naukowej. Do osiągnięcia tak szeroko zakreślonego celu pracy Doktorant musiał wykazać się znajomością oraz bardzo dobrą umiejętnością stosowania metod badawczych - głównie spektroskopii fluorescencyjnej.

We wprowadzeniu do rozprawy (rozdział 1.1) Pan mgr Krzysztof Bielec przedstawił podstawowe informacje dotyczące określenia siły oddziaływań, które powinny prowadzić do dokładnego opisanie mechanizmów reakcji danej biocząsteczki oraz możliwości obserwowania jej wtórnych interakcji z innymi składnikami układu. Doktorant zwrócił w tym miejscu szczególną uwagę na liczbę tworzonych kompleksów i ich stabilność, co w konsekwencji prowadzić miało do stworzenia narzędzi do ilościowej i czasowej analizy reakcji obserwowanej bezpośrednio w różnych przedziałach komórkowych (badania *in vitro* i *in vivo*). Uzasadnił, że przeprowadzenie takiej analizy w nanomolowej skali stężeń jest ważne w projektowaniu nowych leków lub planowaniu celowanej terapii.

Kolejny rozdział (1.2) części literaturowej dotyczy omówienia technik wyznaczania stałej równowagi ( $K$ ), do której wykorzystuje się techniki analityczne oparte na zjawisku fluorescencji. W miarę szczegółowo opisane zostało przez Doktoranta zjawisko fluorescencji oraz możliwość wykorzystania mikroskopii fluorescencyjnej w prowadzonych badaniach. Szczególną uwagę Pan mgr Krzysztof Bielec zwrócił na opracowywanie nowych, syntetycznych i naturalnie występujących fluoroforów o znanych profilach wzbudzenia i emisji, co ma istotne znaczenie w przypadku próbek biologicznych, a zwłaszcza w przypadku różnicowania składników budujących komórki (tj.: białka, receptory komórkowe, itp.). Rozwinięcie tych zagadnień Doktorant

przeprowadził w dwóch podrozdziałach, gdzie skupił się nad wykorzystaniem do badań spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS) oraz rezonansowego transferu energii (FRET).

Rozdział 1.3 to w znacznej części wiedza książkowa dotycząca budowy i hybrydyzacji DNA, podobnie jak kolejny rozdział (1.4) poświęcony interakcjom w zatłoczonym środowisku. Jednak należy uznać, że podstawy te są cenne i niezbędne w interpretacji uzyskanych wyników, a także sprawiają, że prowadzona dyskusja ma logiczny ciąg. Pod względem merytorycznym, ta część pracy podkreśla umiejętność Doktoranta do wyczerpującego, a zarazem krytycznego przedstawienia stanu wiedzy na temat problemu będącego przedmiotem badań własnych.

Z kolejnych rozdziałów wynika, że badania zostały prawidłowo przeprowadzane i opisane. Doktorant szczegółowo opisał metodykę (rozdział 2) dotyczącą przeprowadzonych eksperymentów i zaplanował serię pomiarów szybkości zliczania fotonów dla znakowanych oligonukleotydów (rys. 2.2) w celu określenia mocy lasera. W tym miejscu zabrakło wyjaśnienia, dlaczego dla znakowanego oligonukleotydu ATTO488 powyżej mocy 60  $\mu$ W wyznaczono zależność liniową pomimo stwierdzenia „*detectors start to saturates (nonlinear response)*”.

W trzecim, najbardziej obszernym rozdziale Pan mgr Krzysztof Bielec przedstawił wyniki swoich badań i ich interpretację. Trudno w tym miejscu polemizować z jakością otrzymanych i omówionych wyników, które przeszły pozytywnie wnikliwą weryfikację recenzentów podczas ich publikowania. Podrozdział 3.1 Doktorant poświęcił analizie powstawania kompleksu biochemicznego, obserwacji np. ponownego wiązania oraz wyznaczeniu jego stałej równowagi w subnanomolarnej skali stężeń. Do tych badań zaproponował hybrydyzację komplementarnych nici oligonukleotydowych jako modelu tworzenia kompleksu biochemicznego. Wyniki tych badań znalazły uznanie recenzentów i ukazały się w artykule opublikowanym w *Physical Chemistry Chemical Physics* (2019). Wyniki te wykazały, że kinetyka wiązania i dysocjacji oligonukleotydów DNA jest nieoczekiwanie wolna w warunkach niskiej siły jonowej. W konsekwencji może to prowadzić do wzmocnienia oddziaływań elektrostatycznych i wyjaśnienia interakcji oddziaływań, które rządzą procesami wiązania i odłączania DNA. Kolejny eksperyment Doktoranta to badania mające na celu opracowanie schematu wzbudzania z przelotem impulsowym, który umożliwił niezależne monitorowanie stężenia nici znakowanej akceptorem. Ta część rozprawy doktorskiej znalazła już wcześniej uznanie, bowiem została opublikowana w postaci artykułu w *Journal of Physical Chemistry B* (2020). Ostatni z podrozdziałów to wyniki badań związane z monitorowaniem wpływu zatłoczonego środowiska na hybrydyzację komplementarnych nici w ściśle określonych warunkach biochemicznych, gdzie Doktorant określił wartości stałej równowagi przy różnych stężeniach czynników tj.: glicerol, glikol etylenowy, Ficoll, PEG i dekstran. Wyniki tych badań uważam za bardzo cenne (choć jeszcze niepublikowane), gdyż mogą mieć kluczowe znaczenie

dla dalszej analizy reakcji biochemicznych organizmów w środowisku silnie zasolonym lub z mniejszym dostępem do wody.

Podsumowując tę część recenzji stwierdzam, że otrzymane wyniki są pozytywne i istotne naukowo.

Do najważniejszych osiągnięć omawianej rozprawy doktorskiej zaliczam:

- opracowanie molekularnej analizy jasności jako techniki pomocnej w wyznaczeniu stałej równowagi tworzenia kompleksu, gdzie w przypadku analizy jasności wykorzystano jedno podłoże fluorescencyjne zamiast dwóch (jak w przypadku FRET) – wyznaczenie stałej równowagi przy stężeniach nanomolowych i subnanomolarnych (dla zmian jasności cząsteczek nawet do 5%),
- potwierdzenie, że kinetyka wiązania i dysocjacji oligonukleotydów DNA jest bardzo wolna przy stężeniach subnanomolarnych oraz w warunkach niskiej siły jonowej,
- określenie stałej równowagi wybranych kompleksów przy niskich stężeniach substratu (od 80 pM do 30 nM) na podstawie liczby emitowanych fotonów (jasność molekularna) wynikających z różnicy pomiędzy substratem znakowanym i nieznakowanym fluoroforem,
- weryfikacja uzyskanych wyników z zastosowaniem przenoszenia energii rezonansu Förstera (FRET).

Oceniana rozprawa doktorska, ogólnie ujmując, napisana jest poprawnym językiem, jednak można w niej zauważyć skutki pewnego pośpiechu przy jej redagowaniu w postaci literówek („*autocrrelation*” - str. 13; „*autocorrrelation*” - str. 14; „*posses*” - str. 15; „*concentration*” - str. 66, „*DNA backbone*” - str. 70, itd.), czy zwroty np.: „*schematical approach*” (str. 54). Ten pośpiech można również zauważyć w streszczeniu w języku polskim („*rozprawa doktorska rozprawa*”, „*zżwanna*”, „*określić K dla przy*”, „*eksperymentalne czynniki*”, „*crowdery molekularne*”). Na rysunku 3.5b jest niepoprawna legenda. Powyższe błędy nie podważają wartości merytorycznej rozprawy i nie wpływają na moją pozytywną ocenę tej pracy.

W mojej opinii Pan mgr Krzysztof Bielec dał się poznać jako naukowiec posiadający dużą wiedzę i umiejętności nie tylko w zakresie chemii fizycznej, ale i biochemii. Na podkreślenie zasługuje całkowity dorobek naukowy Doktoranta – sześć artykułów w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Report* o łącznym współczynniku oddziaływania 29,420 (IF prac wchodzących w przygotowaną rozprawę doktorską to 6,287) i jednego patentu krajowego.

#### *Wniosek końcowy*

Rozprawa doktorska Pana mgra Krzysztofa Bielca jest oryginalnym opracowaniem naukowym. Uzyskane wyniki badań wzbogacają wiedzę z zakresu chemii fizycznej, która może zostać wykorzystana w biologii a zwłaszcza w przypadku opisu procesów

biochemicznych. Recenzowana rozprawa zawiera elementy nowości naukowej, a wymienione powyżej uwagi nie umniejszają mojej pozytywnej oceny recenzowanej pracy.

Pan mgr Krzysztof Bielec wykazał się zdolnością prowadzenia wnikliwych studiów literaturowych, umiejętnością planowania i wykonywania eksperymentów, interpretowania otrzymanych wyników badań, krytycznej oceny faktów oraz formułowania wniosków. W moim przekonaniu Doktorant jest dojrzałym naukowcem w pełni przygotowanym do samodzielnego prowadzenia badań.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Krzysztofa Bielca pt. *Formation of chemical complexes at subnanomolar concentration scale* spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim (art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz. U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Instytutu Fizyki Chemicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie Pana mgra Krzysztofa Bielca do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

R. Gąbka - Kopicuch

Toruń, dnia 18 maja 2021 r.