



UNIWERSYTET  
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Prof. dr hab. Wojciech Dzwolak  
[wdzwolak@chem.uw.edu.pl](mailto:wdzwolak@chem.uw.edu.pl)

Wydział Chemii  
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 10 maja 2021

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Krzysztofa Bielca „*Formation of chemical complexes at subnanomolar concentration scale*” powstałej pod kierunkiem prof. dr. hab. Roberta Hołysta w Instytucie Chemii Fizycznej PAN w ramach Międzynarodowych Studiów Doktoranckich.

Racjonalny, fizykochemiczny opis mechanizmów działania organelli komórkowych i biegnących w nich przemian musi uwzględniać ekstremalne zatłoczenie makromolekularne i chemiczną heterogenność żywej komórki. Czynniki te w oczywisty sposób komplikują śledzenie dynamicznych procesów fizjologicznych, zwłaszcza tych inicjowanych przez substancje chemiczne (szeroko rozumiane – w tym również białka i kwasy nukleinowe) w bardzo niskich stężeniach (nM i sub-nM). Problematyka ta jest również ściśle powiązana z kwestią granic stosowalności modeli fizykochemicznych wypracowanych dla typowych warunków doświadczalnych *ex vivo* przy przechodzeniu do warunków *in vivo*. Inspirowane tym zagadnieniem badania przyczyniają się do powstania precyzyjniejszego opisu działania maszyneryi komórkowej, jakiego dostarczają nam m.in. metody biofizyki molekularnej. Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr. Krzysztofa Bielca „*Formation of chemical complexes at subnanomolar concentration scale*” skupiają się na interesującym problemie wpływu ekstremalnego rozcieńczenia modelowych biomakromolekularnych „ligandów” (komplementarnych nici syntetycznego ssDNA) na przebieg ich asocjacji w „kompleks” (czyli hybrydyzację i utworzenie dsDNA) oraz wpływie na ten proces m.in. zatłoczenia makromolekularnego.

Napisana w języku angielskim rozprawa liczy sobie 101 stron i jest ilustrowana precyzyjnie przygotowanymi rysunkami i tabelami. Formalna struktura pracy jest poprawna, a jej czytanie, zwłaszcza części prezentującej oryginalne wyniki badawcze Autora sprawia przyjemność - głównie za sprawą krytycznej i inteligentnie prowadzonej dyskusji przedstawianych na bieżąco rezultatów. Przy całej pieczołowitości przygotowania rozprawy, tu i ówdzie wdarły się do niej drobne błędy i niezdarności językowe (np. „*Streszczenie*” – s. ix; „*much more excellent knowledge*” – s. 1; „exciting orbit” – s. 7) oraz oczywiste pomyłki („H” to entalpia, a nie „free enthalpy” – s. 4; zakrzywienie w dół, raczej niż „punkt przegięcia” świadczyć będzie o fotowybieleniu – Ryc. 2.2, s. 27). Podobnie, formalna definicja stałej trwałości kompleksu wymagałaby odwołania się do pojęcia *aktywności* asocjujących molekuł (r. 1.2, s. 5). Sądzę również, że wprowadzanie tych podstawowych w końcu pojęć jest zbyteczne, podobnie jak komentarz do diagramu Jabłońskiego (s. 7), zamiast których warto byłoby podać wartość  $R_0$  dla FRET pomiędzy wykorzystanymi w pracy fluoroforami (para akceptor-donor), której to wartości nie mogłem się w pracy doszukać. Z kolei, dla danych przedstawionych na Ryc. 3.17 brak informacji o typie DNA, dla którego te pomiary przeprowadzono. Te drobne uwagi krytyczne wynikają jedynie z mojego recenzenckiego obowiązku. Wstęp pracy doskonale spełnia swoją rolę zarówno jako wprowadzenia w metodologię badań, jak i zaprezentowania ich kontekstu biologicznego.

Autor rozprawy przedstawia, jako swoje główne osiągnięcie, stworzenie nowego podejścia eksperymentalnego do wyznaczenia stałej trwałości (K) biomakromolekularnych kompleksów opartego o analizę *jasności molekularnej* (MB). Podejście to pozwala m.in. na określanie K przy bardzo niskich stężeniach komponentów kompleksu, z których tylko jeden musi być wyznakowany fluoroforem (w przeciwieństwie do klasycznej metody Förstera rezonansowego transferu energii – FRET). Poza FRET-em, mikroskopią konfokalną i spektroskopią korelacji fluorescencji (FCS), w badaniach wykorzystana została seria syntetycznych jednoniciowych fragmentów DNA (*ssDNA*) o różnych długościach (10, 13 i 20 par zasad (bp)) wyznakowanych (bądź nie) fluoroforami na końcach 3' lub 5' tak, by móc walidować uzyskane wyniki za pomocą konwencjonalnego FRET-u. Pula fragmentów *ssDNA* została starannie dobrana pod kątem przeprowadzenia niezbędnych eksperymentów

kontrolnych. W początkowej fazie swoich badań (rozdział 3.1.) Autor wyznacza pozorną stałą równowagi hybrydyzacji 2 komplementarnych nici DNA wykorzystując głównie FCS / FRET; rezultaty jasno wskazują na bardzo wolno ustalającą się równowagę hybrydyzacji w zakresie niskich stężeń. Rozdział 3.2. poświęcony jest przedstawieniu metody wyznaczania  $K$  przez pomiary jasności molekularnej i jej walidacji metodą FRET. Jednym z ciekawszych wyników przedstawionych w tym rozdziale jest wykazanie znaczącego wkładu oddziaływań pomiędzy donorem i akceptorem FRET (prawdopodobnie  $\pi$ -stackingowych) do swobodnej energii hybrydyzacji wyznakowanych nimi fragmentów DNA. W ostatnim, trzecim podrozdziale prezentującym wyniki własne (3.3.) metoda analizy jasności molekularnej jest wykorzystana do badania wpływu zatłoczenia molekularnego na stabilność dupleksów DNA.

„*Formation of chemical complexes at subnanomolar concentration scale*” ma w sobie bogactwo inteligentnie zaprojektowanych, skrupulatnie przeprowadzonych i krytycznie przedyskutowanych eksperymentów, których szczegółowe relacjonowanie nie jest jednak moim zadaniem. Główne wyniki zostały opublikowane w dwóch artykułach w bardzo dobrych czasopismach (*J. Phys. Chem. B* i *PCCP*), podczas gdy trzeci artykuł jest wysłany do recenzji. Wszystko to wskazuje, że mój odbiór pracy jako wnoszącej nową istotną wartość do chemii fizycznej biomakromolekuł nie jest odosobniony.

W tym miejscu chciałbym przejść do bardziej szczegółowych, merytorycznych uwag:

1. Jeżeli „rebinding” określamy jako anomalię (s. 33), to może warto jest w rygorystyczny sposób zdefiniować ten termin w kontraście do zwykłej, równowagowej „re-asocjacji”.
2. Wyznaczone w oparciu o FCS promienie hydrodynamiczne *ssDNA* o liczbie par zasad 10, 13, 22 wynoszą odpowiednio: 1.4, 1.6, 2.0 nm, a po hybrydyzacji: 1.4, 1.7, i 2.0 nm (s. 34-35). Czy te praktycznie niezauważalne zmiany pozwalają na wyciąganie wniosków co do zmian fluktuacji łańcucha głównego DNA w wyniku hybrydyzacji. Innymi słowy: czy pewien wzrost  $R_h$  wywołany przyłączeniem komplementarnego łańcucha mógłby być kompensowany przemiana

konformacyjną coil → helisa typu B prowadzącą do silniejszego upakowania *dsDNA*?

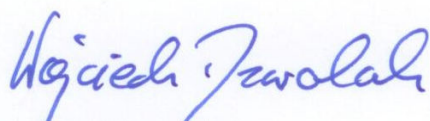
3. Kwestia związana w pewnym stopniu z poprzednim punktem oraz danymi i komentarzami przedstawionymi na s. 44-45 rozprawy. Autor wspomina, że wartość  $K$  rośnie wraz z liczbą bp., co jest intuicyjne. Wprawdzie pary GC i AT mają inny wkład do delG hybrydyzacji dupleksu, ale szczęśliwie w badanych w pracy sekwencjach % udział par GC jest stały (~50 %). Czy zatem można sprawdzić jak przyrost delG (manifestujący się zmianą  $K$ ) skaluje się z wydłużeniem łańcucha? Czy stosunek ( $\text{del}(\text{delG}) / \text{del}(\text{No. bp})$ ) jest stały?
4. Podążając tym tropem: czy zdaniem Autora fragmenty *dsDNA* o długości 10, 13, 20 bp mają podobne / te same konformacje (np. podwójne helisy typu B / A / Z ?). Danych takich mógłby dostarczyć dichroizm kołowy, w którym różne typy podwójnych helis DNA (jak i zdenaturowane DNA) manifestują się odmiennymi widmami. Wydaje się naturalne, że zdolność do tworzenia stabilnej podwójnej helisy będzie narastać z liczbą bp, a helisa taka mogłaby stanowić rodzaj pułapki kinetycznej opóźniającej osiągnięcie stanu równowagi dysocjacji *dsDNA* w wysokim rozcieńczeniu. Co Autor sądzi o możliwości istnienia różnych konformacji *dsDNA* w zależności od liczby bp?
5. Zastanawiam się nad znaczeniem fizjologicznym powolnego osiągania równowagi dysocjacji *dsDNA*. Być może nie jest ono duże, gdyż fizjologiczny „melting” DNA przebiega wg. wybitnie nierównowagowych scenariuszy (np. replikacji DNA). Czy wiadomo coś nt. naturalnych, komórkowych i niezależnych od ATP katalizatorów procesów hybrydyzacji/meltingu DNA?
6. Na s. 46 rozprawy czytamy: „...*the notion of MB, defined as the number of photons emitted per second per fluorophore molecule under given experimental conditions*”. A zatem nawet dla przypadku pojedynczego fluorofora (bez FRET) mamy fotony emitowane na drodze fluorescencji, potencjalnie fosforescencji, jak również te rozpraszane (elastycznie / „ramanowsko”). Niezależnie od rozsądnego założenia, że fotony pochodzące od fluorescencji mają dominujący wkład do mierzonej MB czy

Autor może podeprzeć to założenie bardziej ilościowymi szacunkami uwzględniającymi specyfikę swojego układu, warunki pomiarowe, etc.?

7. W dyskusji możliwych przyczyn niemonotonicznej zależności K od mocy jonowej (Rys. 3.18.) można rozważyć ewentualność przemiany konformacyjnej DNA w środowisku stężonych soli (Pohl, F. M.; Jovin, T. M. (1972). "*Salt-induced cooperative conformational change of a synthetic DNA: equilibrium and kinetic studies with poly(dG-dC)*". *J. Mol. Biol.* 67 (3): 375–396.) Proszę o ustosunkowanie się do tej kwestii.
8. Wpływ crowderów na stabilność DNA jest intrygujący (Rys. 3.21). Przedstawiony w pracy argument za wiązaniem kationów przez crowdery jest racjonalny, chociaż podobne zachowanie się w gliceryny i PEG 400 jest w tym kontekście zastanawiające. Czy swój udział w końcowym efekcie może mieć również kanoniczny efekt „excluded volume”?

Te komentarze odzwierciedlają jedynie entuzjazm recenzenta dla tematyki tych badań i samej rozprawy, którą oceniam wysoko. „*Formation of chemical complexes at subnanomolar concentration scale*” wnosi rzetelny i cenny wkład w rozwój metod biofizycznych umożliwiających identyfikowanie nowych i fascynujących procesów będących „fizykochemiczną częścią” fizjologii molekularnej.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana praca całkowicie spełnia warunki określone w art. 13 ustawy „O stopniach i tytule naukowym, oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. Nr. 65, poz. 595 z dnia 14 marca 2003 z późniejszymi zmianami) i wnoszę o dopuszczenie mgr. Krzysztofa Bielca do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/ Wojciech Dzwolak