

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

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

Pana mgr. inż. Adama Krzysztofa Kowalskiego

pt. *Hybridization reactions in aqueous systems: Towards automated measurements*

wykonanej w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem promotora Pana prof. dr. hab. Roberta Hołysta oraz promotora pomocniczego Pana dr. inż. Grzegorza Bubaka w ramach Warszawskiej Szkoły Doktorskiej Nauk Przyrodniczych i Biomedycznych przy Instytucie Chemii Fizycznej PAN.

### *Ocena wyboru tematyki badawczej*

Tematyka rozprawy doktorskiej podejmuje istotny i aktualny problem naukowy, jakim są reakcje hybrydyzacji kwasów nukleinowych w zmiennych warunkach środowiskowych. Szczególny nacisk położono na analizę wpływu takich parametrów jak siła jonowa, pH, zatłoczenie molekularne oraz oddziaływania elektrostatyczne na kinetykę i termodynamikę tworzenia dupleksów DNA. Zagadnienie to ma charakter wyraźnie interdyscyplinarny, łącząc podejścia charakterystyczne dla chemii fizycznej, biofizyki, biologii molekularnej oraz inżynierii biomedycznej. Jednocześnie omawiany temat ma istotny potencjał aplikacyjny, ponieważ wyniki badań znajdują bezpośrednie zastosowanie w projektowaniu nowoczesnych narzędzi diagnostycznych i terapeutycznych, takich jak mikromacierze DNA, biosensory czy terapie genowe.

Pan mgr inż. Adam Kowalski, wybierając temat rozprawy, wykazał się bardzo dobrą znajomością literatury przedmiotu oraz zdolnością do wskazania zagadnień badawczych, które wymagają dalszej, pogłębionej analizy. Trafnie zauważył brak spójnych modeli teoretycznych opisujących wpływ zatłoczenia molekularnego oraz warunków jonowych na przebieg reakcji hybrydyzacji kwasów nukleinowych. W odpowiedzi na tę lukę zaproponował innowacyjne podejście badawcze, obejmujące dwa modele teoretyczne: pierwszy dotyczący przyspieszenia asocjacji DNA-DNA w obecności przeciwnie naładowanych cząsteczek, drugi - opisujący złożone efekty zatłoczenia molekularnego z uwzględnieniem oddziaływań elektrostatycznych oraz sił wyczerpania.

W pełni uzasadnione było zatem zaproponowanie przez Doktoranta zaawansowanych technik fluorescencyjnych, takich jak transfer energii rezonansu Förstera (FRET), spektroskopia korelacyjna fluorescencji (FCS) oraz analizy jasności molekularnej (MBA), które umożliwiły precyzyjne śledzenie równowagi reakcji hybrydyzacji nawet na poziomie pojedynczych cząsteczek. Istotnym uzupełnieniem przyjętej strategii badawczej była konstrukcja mikroprzepływowej platformy analitycznej, pozwalającej na automatyzację procesu przygotowania próbek oraz przeprowadzania pomiarów w warunkach wysokiej powtarzalności i efektywności.

Podsumowując, podjęta przez Pana mgr. inż. Adama Kowalskiego tematyka badawcza jest nie tylko aktualna i zgodna z kierunkami współczesnej nauki, lecz również istotna z punktu widzenia rozwoju badań podstawowych oraz ich zastosowań w diagnostyce molekularnej, biologii systemowej i biotechnologii.

### *Ocena formalna i merytoryczna rozprawy doktorskiej*

Recenzowana rozprawa doktorska obejmuje 82 strony maszynopisu i zawiera 26 rysunków oraz 1 tabelę. Elementy graficzne, w tym rysunki, schematy oraz wykresy przedstawiające zależności, zostały przygotowane starannie, przejrzyste i w przeważającej większości obrazują wyniki badań własnych przeprowadzonych przez Doktoranta. Ich jakość techniczna oraz czytelność zasługują na uznanie, stanowiąc istotne uzupełnienie treści merytorycznej pracy. Bibliografia rozprawy liczy 117 pozycji, co należy uznać za liczbę adekwatną do zakresu i charakteru opracowania. Obejmuje ona zarówno aktualne publikacje naukowe z ostatnich dwóch dekad, jak i klasyczne pozycje stanowiące fundamenty w danej dziedzinie badawczej. Doktorant wykazał się umiejętnością selektywnego i krytycznego doboru literatury, odzwierciedlającego zarówno szeroką orientację w temacie, jak i zdolność do identyfikowania prac o największym znaczeniu dla przedmiotu badań.

Układ pracy ma charakter klasyczny z wyraźnym podziałem na część przeglądową (literaturową) oraz część eksperymentalną. Dominującą objętościowo częścią rozprawy jest przegląd literatury, który stanowi około 53% całości opracowania. Rozkład ten wydaje się uzasadniony, biorąc pod uwagę złożoność i interdyscyplinarność omawianego zagadnienia oraz konieczność wprowadzenia czytelnika w kontekst prowadzonych badań. Rozprawa została napisana w języku angielskim. Styl wypowiedzi jest spójny, poprawny i dostosowany do wymogów stawianych rozprawom doktorskim. Całość opracowania sprawia wrażenie starannie przygotowanej i przemyślanej, zarówno pod względem merytorycznym, jak i formalnym.

W rozprawie doktorskiej zabrakło mi precyzyjnego sformułowania celu, który jak można wnioskować, po zaplanowanych badaniach i uzyskanych w wyniku ich realizacji wyników, było zbadanie procesu hybrydyzacji kwasów nukleinowych w środowisku wodnym poprzez analizę wpływu czynników środowiskowych (obecność katalizatora, siła jonowa oraz zatłoczenie makrocząsteczkowe) na parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji asocjacji DNA. Za dodatkowy cel pracy uważam opracowanie i wdrożenie półautomatycznej platformy mikroprzepływowej, umożliwiającej precyzyjne i wydajne pomiary hybrydyzacji, stanowiącej narzędzie do wysokoprzepustowej analizy oddziaływań biomolekularnych.

Część literaturową Doktorant podzielił na sześć rozdziałów. W pierwszym z nich (rozdz. 1.1 i 1.2) przedstawił podstawy dotyczące struktury oraz zastosowań kwasów nukleinowych, a także omówił mechanizmy oddziaływań międzycząsteczkowych, ze szczególnym uwzględnieniem zjawiska zatłoczenia molekularnego i jego wpływu na przebieg tych interakcji. Jest to bardzo istotne zagadnienie, gdyż cząsteczki te odgrywają kluczową rolę w przechowywaniu, przesyłaniu i wykorzystaniu informacji genetycznej.

W dalszej części pracy (rozdz. 1.3) przedstawiono podstawy chemii fizycznej, umożliwiające określenie siły oddziaływań kwasów nukleinowych w stanie równowagi oraz szybkości ich asocjacji. Pan mgr inż. Adam Kowalski szczegółowo omówił te zagadnienia, opierając się na zasadach termodynamiki, które pozwalają ocenić energetyczną korzystność reakcji oraz definiują warunki równowagi chemicznej. W sposób wyczerpujący zaprezentował również zagadnienia związane z kinetyką reakcji, podkreślając, że każda reakcja wymaga indywidualnej charakterystyki, możliwej do uzyskania przy zastosowaniu zaawansowanych metod pomiarowych, w szczególności technik fluorescencyjnych, pozwalających na precyzyjną analizę oddziaływań molekularnych.

W sposób płynny Doktorant przeszedł do omówienia zjawiska fluorescencji (rozdz. 1.4), które stanowi podstawowe narzędzie wykorzystywane w monitorowaniu procesów hybrydyzacji DNA-DNA. W przystępny, a zarazem wyczerpujący sposób przedstawił zagadnienia niezbędne do zrozumienia podstaw spektroskopii fluorescencyjnej oraz mikroskopii, będących nieodzownymi technikami we współczesnych badaniach biomolekularnych. Ich zastosowanie umożliwia m.in. wizualizację struktur wewnątrzkomórkowych, analizę oddziaływań biocząsteczek oraz obserwację dynamicznych procesów zachodzących w czasie rzeczywistym.

Bardzo szczegółowe omówienie nowoczesnych technik badawczych zawarte w rozdziale 1.5, obejmujące między innymi mikroskopię konfokalną i fluorescencyjną, spektroskopię korelacji fluorescencji (FCS), metodę transferu energii rezonansu Förstera (FRET) oraz analizę jasności molekularnej (MBA), stanowi istotny fundament teoretyczny dla dalszej części pracy. Pozwala ono nie tylko na interpretację wyników, lecz również na projektowanie doświadczeń umożliwiających śledzenie ruchu biocząsteczek, analizowanie oddziaływań molekularnych, badanie szlaków metabolicznych i zmian strukturalnych w komórkach.

W ostatnim rozdziale części literaturowej (rozdz. 1.6) Pan mgr inż. Adam Kowalski przedstawił koncepcję platformy mikroprzepływowej jako nowoczesnego podejścia integrującego przygotowanie próbki, reakcję oraz detekcję w ramach jednego, zminiaturyzowanego układu. Podkreślił unikalne zalety tej technologii, takie jak zwiększenie wydajności pomiarów, znaczne ograniczenie zużycia odczynników oraz możliwość automatyzacji procesu badawczego. Równocześnie zwrócił uwagę na istotne wyzwania związane z miniaturyzacją, w tym trudności w zapewnieniu powtarzalności oraz konieczność integracji komponentów płynnych, optycznych i elektronicznych w sposób spójny i stabilny.

Część literaturową rozprawy należy uznać za kompletną, spójną i merytorycznie dobrze zaprojektowaną. Stanowi ona nie tylko solidne tło teoretyczne dla realizacji części eksperymentalnej, lecz także podstawę dla interpretacji uzyskanych wyników oraz dalszego rozwoju metodologicznego badań.

Przechodząc do oceny części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej można zauważyć, że Pan mgr inż. Adam Kowalski zaplanował i przepowiedział badania stosując zaawansowane techniki FRET i FCS oraz MBA. Dobór tych metod świadczy o wysokim

poziomie kompetencji badawczej oraz umiejętności analizy danych o dużej złożoności. Szczególnie cenne jest zastosowanie metod umożliwiających śledzenie procesów hybrydyzacji w czasie rzeczywistym i na poziomie pojedynczych cząsteczek, co stanowi mocną stronę zaproponowanych badań. W rozdziale 3.1 Doktorant podjął się ustalenia kinetyki asocjacji oligonukleotydów DNA w środowisku wodnym, jonowym oraz z udziałem katalizatora. Przedstawiono również model opisujący przyspieszenie reakcji pomiędzy podobnie naładowanymi nićmi DNA przez przeciwnie naładowane cząsteczki w roztworze. Doktorant wykazuje doskonałą orientację w aktualnym stanie wiedzy, poprawnie zidentyfikował istotne obszary badawcze oraz zaproponował ich oryginalne rozwiązania. Kluczowym wkładem naukowym jest opracowanie dwóch modeli teoretycznych opisujących mechanizmy reakcji hybrydyzacji DNA w warunkach oddziałujących na nie czynników środowiskowych. Pierwszy model opisuje zjawisko przyspieszenia asocjacji pomiędzy jednoimiennie naładowanymi cząsteczkami DNA w obecności przeciwnie naładowanych cząsteczek, działających jako katalizatory. Drugi z kolei analizuje wpływ zatłoczenia molekularnego na stan równowagi reakcji hybrydyzacji, oddziaływań elektrostatycznych oraz efektów ograniczenia przestrzennego. Modele te nie tylko wnoszą wartość poznawczą, ale mogą także mieć zastosowanie praktyczne przy projektowaniu systemów detekcji o wysokiej czułości w warunkach *in vivo*.

Na uwagę zasługuje również identyfikacja ograniczeń stosowanych metod eksperymentalnych (m.in. czasochłonność, konieczność stosowania znaczników fluorescencyjnych, niska przepustowość), co świadczy o krytycznym podejściu badawczym Doktoranta. W odpowiedzi na te ograniczenia Pan mgr inż. Adam Kowalski opracował nowoczesną platformę mikroprzepływową, która znacząco usprawnia procedurę eksperymentalną. System ten pozwala na automatyzację przygotowania próbek i pomiarów, co skutkuje skróceniem czasu pomiarów, znacznym obniżeniem zużycia odczynników oraz poprawą precyzji wyników. Zaproponowane rozwiązanie wykorzystuje objętości rzędu nanolitra, umożliwiając wykonanie pomiarów w czasie rzeczywistym poprzez MBA/FRET i FCS. W rezultacie, całkowity czas pracy operatora wymagany dla pojedynczego pomiaru znacząco został skrócony. Poza wydajnością, podejście to oferuje korzyści ekonomiczne i środowiskowe dzięki zminimalizowaniu zużycia odczynników oraz obniżeniu kosztów związanych z materiałami i odpadami laboratoryjnymi.

W rozprawie doktorskiej przedstawiono szereg istotnych osiągnięć naukowych w zakresie poszerzenia wiedzy dotyczącej mechanizmów hybrydyzacji kwasów nukleinowych w warunkach zatłoczenia molekularnego i zmiennych parametrów środowiskowych. Do najważniejszych rezultatów jakie uzyskał Pan mgr inż. Adam Kowalski należy zaliczyć:

- wykazanie nieliniowego wpływu zatłoczenia molekularnego na równowagę hybrydyzacji DNA, gdzie Doktorant wykazał, że wraz ze wzrostem stężenia cząsteczek zatłaczających dochodzi do początkowego zwiększenia stałej równowagi ( $K$ ), co jest efektem przewagi sił sprzyjających tworzeniu dupleksów,
- opracowanie dwóch modeli teoretycznych - pierwszy opisujący przyspieszenie reakcji pomiędzy jednoimiennie naładowanymi cząsteczkami w obecności przeciwnie

naładowanych katalizatorów w środowisku wodnym; drugi model - umożliwiający analizę wpływu zatłoczenia molekularnego na równowagę hybrydyzacji DNA, uwzględniając współdziałanie sił wyczerpania, oddziaływań elektrostatycznych i destabilizacji wynikającej z ograniczeń przestrzennych (model ten może stanowić praktyczne narzędzie do optymalizacji warunków reakcji *in vitro*),

- zaprojektowanie i wdrożenie zintegrowanej platformy mikroprzepływowej – opracowany został innowacyjny system, który automatyzuje kluczowe etapy pomiaru stałych równowagi metodami MBA/FRET i FCS. Dzięki zastosowaniu nanolitrowych objętości i zintegrowanych modułów przygotowania próbki. Platforma znacząco skraca czas eksperymentu, zmniejsza zużycie odczynników, eliminuje potrzebę stosowania jednorazowych płytek wielodółkowych oraz poprawia powtarzalność i wiarygodność pomiarów,
- wskazanie potencjału aplikacyjnego platformy - zaprezentowane rozwiązanie stanowi istotny krok w kierunku zautomatyzowanych eksperymentów badawczych z mechanizmem sprzężenia zwrotnego, znajdujących zastosowanie w diagnostyce, biologii systemowej i odkrywaniu leków. Opracowana platforma umożliwia precyzyjne, wysokoprzepustowe analizy oddziaływań biomolekularnych przy minimalnym zużyciu zasobów i ograniczonym nakładzie pracy eksperymentatora.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że przedłożona rozprawa doktorska oparta jest na konsekwentnie realizowanym podejściu badawczym, obejmującym zarówno część skoncentrowaną na projektowaniu poszczególnych badań oraz część analityczną, dotyczącą ich charakterystyki strukturalnej oraz określenia właściwości fizykochemicznych. Tak kompleksowe ujęcie problemu należy uznać za szczególnie wartościowe, gdyż świadczy o rozwiniętym warsztacie naukowym i systematycznym doskonaleniu umiejętności badawczych Doktoranta. W tym kontekście warto również zaznaczyć bardzo szeroki i zróżnicowany wachlarz technik instrumentalnych zastosowanych przez Doktoranta, który w mojej ocenie budzi duże uznanie.

#### *Uwagi szczegółowe i podsumowanie*

Mimo że rozprawa wyróżnia się wysokim poziomem merytorycznym i została przygotowana z dużą starannością, w toku lektury pojawiły się zagadnienia, które mogą stanowić wartościowy punkt wyjścia do dalszej refleksji i dyskusji naukowej. Poniższe pytania mają charakter konstruktywnych sugestii i potencjalnych kierunków rozwinięcia - nie podważają one wartości naukowej pracy, lecz wskazują obszary, które można by doprecyzować, pogłębić interpretacyjnie lub rozwinąć w przyszłych badaniach:

- Jak można wyjaśnić redukcję frakcji związanego DNA przy wysokim stężeniu jonów? Czy efekt ten ma znaczenie biologiczne?
- Czy obserwowany efekt kompleksowania jonów przez cząsteczki zatłaczające (*crowders*) może być zależny od ich konkretnej budowy chemicznej? W jaki sposób zweryfikowano ten aspekt eksperymentalnie?
- W jaki sposób zatłoczenie molekularne wpływa na entropię i entalpię reakcji hybrydyzacji?



- Jak w przypadku zastosowania techniki transferu energii rezonansu Förstera (FRET) optymalizowano stosunek sygnału do szumu, mający kluczowe znaczenie dla dokładności uzyskiwanych pomiarów?
- W jaki sposób zmienność składu biologicznych matryc, takich jak osocze czy lizaty komórkowe, wpływa na wiarygodność reakcji hybrydyzacji oraz działanie opracowanej platformy mikroprzepływowej w kontekście potencjalnych zastosowań biomedycznych?

Zgłoszone pytania i sugestie nie mają wpływu na ogólną, jednoznacznie pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej. Praca prezentuje wysoki poziom naukowy, świadczący o dużej samodzielności badawczej Doktoranta oraz wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy z zakresu biofizyki i chemii fizycznej kwasów nukleinowych.

Reasumując, rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, czego potwierdzeniem są dwie publikacje w renomowanych czasopismach: *Nature Communications* (2022; Kowalski, A.K.; i in., *Effective screening of Coulomb repulsions in water accelerates reactions of like-charged compounds by orders of magnitude*) oraz *Journal of Physical Chemistry Letters* (2022; Bielec, K.; Kowalski, A.K.; Bubak, G.; Witkowska Nery E.; Holyst R., *Ion complexation explains orders of magnitude changes in the equilibrium constant of biochemical reactions in buffers crowded by nonionic compounds*). Prace te stanowią efekt realizacji projektu Preludium Bis nr 2020/39/O/ST4/00877 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki i wnoszą istotny wkład w rozwój wiedzy na temat hybrydyzacji kwasów nukleinowych w zmiennych warunkach środowiskowych. Doktorat zadeklarował, że powstają kolejne artykuły, co może być wynikiem realizacji kierowanego przez niego projektu Preludium finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki rozpoczęte w 2023 roku nt. *Reakcje biochemiczne w zatłoczonym środowisku: rozdzielenie wpływu oddziaływań wyczerpania i kompleksowania jonów na przykładzie hybrydyzacji DNA*.

### *Wniosek końcowy*

W mojej ocenie rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, a jej Autor w pełni zasługuje na nadanie stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie chemia. Wyrażam więc przekonanie, że recenzowana rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Adama Kowalskiego pt.: *Hybridization reactions in aqueous systems: Towards automated measurements* spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w oparciu o art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571, z późn. zm.) i wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym do publicznej obrony przedłożonej dysertacji.

*Renata Gadziś-Kopcińska*

Toruń, dnia 4 sierpnia 2025 r.