



UNIVERSITY
OF WARSAW

Faculty of Physics
Institute of Experimental Physics

Warszawa, 02.09.2026

Dr hab. Joanna Kowalska
Uniwersytet Warszawski
Wydział Fizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej, Zakład Biofizyki
ul. Pasteura 5, 02-093 Warszawa
tel.: +48 22 55 43 774
e-mail: jkowalska@fuw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Kucharskiej
pt. „Complex formation of small ligands with nucleic acids”

Oddziaływania małych cząsteczek z kwasami nukleinowymi stanowią ważny obszar badań na pograniczu chemii fizycznej, biofizyki i biologii molekularnej. Zrozumienie mechanizmów tworzenia takich kompleksów ma znaczenie zarówno dla opisu podstawowych procesów molekularnych, jak i dla rozwoju metod analitycznych oraz związków o potencjalnym zastosowaniu biologicznym i terapeutycznym. Tematyce tej poświęcona jest rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Kucharskiej pt. „Complex formation of small ligands with nucleic acids”, wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Roberta Hołysta jako promotora i dr. Tomasza Kalwarczyka jako promotora pomocniczego, w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk.

Rozprawa liczy 219 stron i ma strukturę typową dla eksperymentalnej pracy doktorskiej. Obejmuje obszerny wstęp literaturowy, rozdział poświęcony materiałom i metodom, część wynikową połączoną z dyskusją, podsumowanie, bibliografię oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca jest na ogół starannie zredagowana i bogato ilustrowana. Schematy, wykresy i tabele w większości ułatwiają śledzenie toku badań. Zwraca jednak uwagę dość duża liczba tabel prezentujących szczegółowe lub surowe dane eksperymentalne. W mojej opinii część z nich nie jest konieczna w głównym tekście i z powodzeniem mogłaby zostać przeniesiona do aneksu, co poprawiłoby czytelność rozprawy. Ponadto w kilku miejscach zamiast właściwych odnośników bibliograficznych pozostawiono znaki zapytania, co jest drobnym, lecz zauważalnym niedociągnięciem redakcyjnym.

Przedmiotem mojej oceny są w szczególności następujące elementy rozprawy: a) ogólna wiedza Autorki w dyscyplinie, b) umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz c) oryginalność i wartość naukowa podjętego problemu badawczego.



UNIVERSITY
OF WARSAW

Faculty of Physics
Institute of Experimental Physics

Część literaturowa rozprawy jest obszerna i dobrze koresponduje z tematyką badań własnych. Autorka omawia strukturę i właściwości DNA oraz różnych klas RNA, mechanizmy oddziaływania małych ligandów z kwasami nukleinowymi, ze szczególnym uwzględnieniem interkalacji, a następnie właściwości barwników cyjaninowych YO-PRO-1 i YOYO-1 oraz antracyklin. Sporo miejsca poświęcono również metodom fluorescencyjnym wykorzystywanym w dalszej części pracy, w tym spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS), analizie jasności molekularnej i fotobłaknięciu. Wprowadzenie stanowi dobre przygotowanie do lektury części eksperymentalnej i pokazuje, że Autorka posiada szeroką wiedzę w zakresie fizykochemii kwasów nukleinowych i metod fluorescencyjnych.

Opis materiałów i metod jest zasadniczo wystarczający do zrozumienia przebiegu doświadczeń. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie kilku uzupełniających się technik eksperymentalnych oraz własnych procedur analizy danych. W niektórych miejscach opis metodologiczny pozostaje jednak zbyt ogólny, szczególnie tam, gdzie interpretacja ilościowa zależy od przyjętych założeń modelowych. Dotyczy to zwłaszcza oszacowania liczby kompleksów znajdujących się w objętości konfokalnej i wyznaczania frakcji kompleksów niefluorescencyjnych. W takich przypadkach bardziej szczegółowe uzasadnienie przyjętych parametrów i ograniczeń modelu ułatwiłoby ocenę niepewności wyników.

Część wynikowa obejmuje kilka grup doświadczeń. W pierwszej z nich Autorka analizuje tworzenie kompleksów YO-PRO-1 i YOYO-1 z DNA oraz wyznacza parametry opisujące oddziaływanie tych barwników z kwasami nukleinowymi. Wyniki wskazują na odmienny charakter oddziaływania monomerycznego YO-PRO-1 i dimerycznego YOYO-1, a dla YOYO-1 rozważane są dwa mechanizmy związane z mono- i bisinterkalacją. Badania wykonywano w różnych temperaturach, co pozwalało także ocenić wpływ temperatury na właściwości fluorescencyjne i wiązanie. W tej części pracy badano również oddziaływanie YO-PRO-1 z tRNA, dla którego Autorka również wyznaczyła stałą równowagi oraz parametry fluorescencyjne kompleksu.

Kolejna część pracy dotyczy oddziaływania z DNA czterech antracyklin: doksorubicyny, daunorubicyny, idarubicyny i epirubicyny. Autorka porównuje wartości stałych równowagi oraz jasności molekularnej i analizuje wpływ temperatury na tworzenie kompleksów. Następnie wykorzystuje monitorowanie fotobłaknięcia immobilizowanych kompleksów DNA-YO-PRO-1 do oszacowania udziału kompleksów niewnoszących wkładu do rejestrowanej fluorescencji. Ostatnia część doświadczeń jest poświęcona identyfikacji potencjalnych komórkowych celów YO-PRO-1 i wskazuje, że istotnymi celami barwnika mogą być komórkowe RNA, w szczególności tRNA i rRNA oraz struktury związane z rybosomami.



UNIVERSITY
OF WARSAW

Faculty of Physics
Institute of Experimental Physics

Przedstawione badania pokazują, że Autorka opanowała zaawansowane metody fluorescencyjne i potrafi wykorzystywać je do ilościowej analizy złożonych układów biologicznych. Jednocześnie część eksperymentalna pozostawia u mnie pewien niedosyt. Zakres poruszanych zagadnień jest szeroki, lecz poszczególne wątki zostały rozwinięte z różną szczegółowością i nie zawsze składają się na w pełni spójną historię badawczą. Z każdej zastosowanej metody wynikają interesujące obserwacje, jednak w kilku miejscach naturalne eksperymenty uzupełniające pozwoliłyby znacznie lepiej połączyć poszczególne części rozprawy. Przykładowo, skoro doświadczenia dotyczące lokalizacji i identyfikacji celów komórkowych wskazują na istotną rolę rRNA i struktur rybosomalnych, ilościowe porównanie powinowactwa YO-PRO-1 do takich celów z wartościami uzyskanymi dla DNA i tRNA stanowiłoby bardzo wartościowe dopełnienie pracy. Brak takiego porównania nie podważa uzyskanych wyników, ale ogranicza możliwość zbudowania z nich bardziej całościowego obrazu selektywności badanego barwnika.

Kilka zagadnień poruszonych w rozprawie wzbudziło moje zainteresowanie i chciałabym poprosić Autorkę o ich wyjaśnienie podczas publicznej obrony:

- 1) Na stronie 109 Autorka opisuje pomiary prowadzone w 36°C w kontekście „thermal stress”. Temperatura 36°C jest zbliżona do fizjologicznej temperatury organizmu człowieka i sama w sobie nie może być uznana za warunek stresowy dla układów biologicznych. Proszę o wyjaśnienie, w jakim znaczeniu Autorka używa tego określenia i jaki stan odniesienia przyjmuje.
- 2) W kilku doświadczeniach dotyczących wyznaczania stałych równowagi krzywe miareczkowania, szczególnie ta kluczowa przedstawiona na Fig. 33 (oddziaływanie z tRNA), nie osiągają wyraźnego plateau; zakres stężeń wydaje się również nie obejmować w wystarczającym stopniu obszaru odpowiadającego wartości K_d wynikającej z dopasowania. Na ile wiarygodne jest wyznaczanie stałej równowagi w sytuacji, gdy pomiar nie obejmuje zakresu wysycenia? Czy nie było możliwości przeprowadzenia tego eksperymentu przy wyższych stężeniach tRNA? Proszę omówić ograniczenia takiego dopasowania oraz, jeśli problemem jest dostępność liganda w odpowiednio wysokich stężeniach/ilościach, proszę zaproponować alternatywne metody, którymi można wyznaczyć tę stałą z większą dokładnością, ale przy zachowaniu oszczędnego gospodarowania materiałem.
- 3) W doświadczeniach dotyczących identyfikacji celów YO-PRO-1 Autorka nie zaobserwowała oddziaływania barwnika ze spinką DNA i tłumaczy ten wynik krótkim czasem życia jej regionów dwuniciowych. W rozprawie podano sekwencję zastosowanego oligonukleotydu, nie przedstawiono jednak przewidywanej struktury spinki ani danych dotyczących jej stabilności. Proszę o przedstawienie przewidywanej struktury drugorzędowej tej sekwencji oraz oszacowanie



UNIVERSITY
OF WARSAW

Faculty of Physics
Institute of Experimental Physics

stabilności części dwuniciowej, np. poprzez oszacowanie ΔG i temperatury topnienia. Czy takie dane rzeczywiście wspierają zaproponowane wyjaśnienie braku oddziaływania z YO-PRO-1?

- 4) Wyznaczanie frakcji kompleksów niefluorescencyjnych opiera się na porównaniu liczby kompleksów obserwowanych eksperymentalnie z liczbą teoretycznie oczekiwaną w objętości konfokalnej. Obliczenie tej drugiej wartości wymaga szeregu założeń dotyczących m.in. geometrii układu, liczby par zasad znajdujących się w objętości wzbudzenia oraz liczby miejsc wiązania YO-PRO-1. Czy część rozbieżności między wartością teoretyczną a eksperymentalną może wynikać z niedokładności tych założeń, a nie z obecności rzeczywiście niefluorescencyjnej populacji kompleksów? Proszę wskazać podstawę literaturową lub eksperymentalną najważniejszych parametrów modelu oraz omówić ich wpływ na końcowy wynik.
- 5) Na stronie 6 Autorka wskazuje obecność grupy 2'-hydroksylowej jako jedną z podstawowych chemicznych różnic między RNA i DNA, wpływającą na reaktywność i strukturę RNA. Proszę rozwinąć ten temat: z czego na poziomie mechanistycznym wynika zwiększona reaktywność RNA i w jaki sposób się ona przejawia? Czy obecność grupy 2'-OH może również, bezpośrednio lub pośrednio wpływać na oddziaływanie RNA z barwnikami interkalującymi?
- 6) Badania komórkowe sugerują, że ważnymi celami YO-PRO-1 są tRNA, rRNA i struktury rybosomalne. Dla tRNA wyznaczono ilościowo stałą równowagi wiązania, natomiast analogicznych danych dla rRNA lub rybosomów nie przedstawiono. Czy Autorka spodziewa się istotnych różnic powinowactwa YO-PRO-1 do DNA, tRNA i rRNA? Jakie cechy strukturalne tych kwasów nukleinowych mogłyby determinować ewentualną selektywność barwnika?

Dorobek publikacyjny Autorki związany z rozprawą obejmuje trzy prace opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych, w tym jedną pracę, w której jest pierwszą autorką, dotyczącą mechanizmów interkalacji YOYO-1 do DNA (czasopismo *Molecules*). Ponadto Autorka jest współautorką jednej publikacji dotyczącej badania oddziaływań białek na poziomie pojedynczych cząsteczek. Dorobek ten oceniam jako bardzo dobry, odpowiedni dla osoby ubiegającej się o stopień doktora i potwierdzający jej udział w realizacji badań naukowych związanych z tematyką rozprawy.

Podsumowując, rozprawa mgr inż. Karoliny Kucharskiej przedstawia wartościowe wyniki dotyczące oddziaływania małych ligandów fluorescencyjnych i antracyklin z kwasami nukleinowymi oraz wykorzystania metod fluorescencyjnych do ilościowej charakterystyki tych procesów. Praca dokumentuje dobrą znajomość literatury przedmiotu, opanowanie zaawansowanego warsztatu eksperymentalnego i zdolność do samodzielnej analizy danych. Mimo wskazanych powyżej uwag, dotyczących przede wszystkim niepełnego powiązania poszczególnych wątków eksperymentalnych,



UNIVERSITY
OF WARSAW

Faculty of Physics
Institute of Experimental Physics

ograniczeń części analiz ilościowych oraz kilku braków redakcyjnych, uważam, że rozprawa wnosi istotny wkład w rozwój dziedziny i spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Kucharskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z poważaniem,

Joanna Kowalska