



Warszawa, dn. 7.04.2015

Prof. dr hab. Sławomir Filipek,  
Wydział Chemii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych,  
Uniwersytet Warszawski, Warszawa.  
E-mail: sfilipek@chem.uw.edu.pl

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej mgr. inż. Elżbiety Walczak, pt.**

**„Wpływ modyfikacji strukturalnych w 11-*cis*-retinalu na przebieg procesu fotoizomeryzacji w rodopsynie”**

Rodopsyna należy do rodziny receptorów błonowych nazywanych skrótowo GPCR tj. receptorów sprzężonych z białkami G (G-protein-coupled receptors). Jednak w przeciwieństwie do innych receptorów, które są aktywowane związkami chemicznymi, peptydami lub nawet białkami, rodopsyna jest aktywowana kwantami światła co umożliwia nam widzenie. Przebieg procesów widzenia, a w szczególności aktywacja rodopsyny, są badane już od XIX wieku, kiedy to odkryto funkcję tego białka. Tym niemniej wiele szczegółów tych procesów odkryto dopiero w ostatnich latach, bowiem wymagało to krystalizacji rodopsyny i/lub obliczeń kwantowych o wysokim stopniu złożoności.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska dotyczy właśnie badań teoretycznych/kwantowych nad aktywacją rodopsyny. Praca ma charakter klasycznej rozprawy i obejmuje 141 stron. Wprowadzenie liczy 20 stron, opis Metod obliczeniowych 18 stron, Wyniki wraz z podsumowaniem po każdym rozdziale 74 strony, zaś sumaryczne Podsumowanie i wnioski 5 stron. Bibliografia zawiera 300 pozycji. Rozprawa nie zawiera niestety wykazu skrótów.

We Wprowadzeniu Autorka przedstawia ogólną charakterystykę mechanizmów zachodzących w procesie widzenia, w szczególności poszczególne etapy aktywacji rodopsyny oraz role innych białek w tworzeniu kaskady sygnałowej, bowiem proces przekazywania sygnału do białka G i następnie do enzymu transducyny jest wzmacniany kilkaset razy na każdym etapie. Autorka dodaje m.in. że rodopsyna jest białkiem bardzo ruchliwym dzięki czemu może stymulować aktywację wielu cząsteczek białka G. Ostatnio stwierdzono jednak, że rodopsyna może także występować we frakcji oligomerycznej. Nie musi to jednak



zmniejszać szybkości przekazywania sygnału bowiem białko G jest bardziej ruchliwe niż rodopsyna, jako że jest tylko zakotwiczone w błonie komórkowej za pomocą modyfikacji hydrofobowych. Oligomeryzacja rodopsyny wprowadza dodatkowy stopień komplikacji w wyjaśnieniu procesów widzenia i jak stwierdza Autorka rola oligomeryzacji tego białka jest wciąż nieznana. We Wprowadzeniu omówiona jest także struktura rodopsyny, bowiem białko to było skryształizowane wiele razy, począwszy od 2000 roku, w różnych stanach aktywacyjnych. W szczególności Autorka omawia strukturę retinalu będącego chromoforem w tym białku oraz bardzo szczegółowo opisuje, ze względu na specyfikę pracy, proces fotoizomeryzacji retinalu i poszczególne ścieżki reakcji tego procesu. Omówione są także struktury modyfikowanych chromoforów badanych w niniejszej pracy. Na str. 10 Autorka napisała, że w rodopsynie występuje tylko jeden z czterech możliwych enancjomerów retinalu. Szkoda, że nie pokazano struktury 3D tego enancjomeru a tylko schemat numeracji atomów w tym związku.

Praca jest napisana znakomicie pod względem językowym. Występują bardzo nieliczne błędy ortograficzne czy interpunkcyjne. Zauważyłem natomiast kilka nieprawidłowych wyrazów: str. 14 ostyganie → stygnięcie; str. 77 balansując → (tutaj) równoważąc; str. 106 prerekwizyt → warunek.

Po Wprowadzeniu Autorka precyzuje cele pracy, którymi są: (1) określenie dokładności stosowanych metod kwantowych do obliczeń fotochemicznych w fazie gazowej oraz w białku; (2) analiza konformacyjna retinalu z pierścieniem 8-członowym w kieszeni wiążącej ligand w rodopsynie; oraz (3) określenie wpływu modyfikacji strukturalnych retinalu (9 związków) na pierwszy etap fotoizomeryzacji.

Stosownie do tych celów Wyniki są podzielone na cztery rozdziały: dwa rozdziały na badanie pochodnych retinalu w (1) fazie gazowej oraz (2) w białku; jak również dwa rozdziały poświęcone wpływowi modyfikacji retinalu na proces fotoizomeryzacji: (3) metylacji i demetylacji, oraz (4) rozerwania pierścienia  $\beta$ -jononu. Wyniki zawarte w tych rozdziałach zostały opublikowane w dwu pracach w *Journal of Chemical Theory and Computation* w 2013 i 2014 roku. Dwie pozostałe prace będące podstawą doktoratu są w formie manuskryptu oraz artykułu w recenzji. Część wyników została także opublikowana w formie rozdziału w książce w 2012 roku. Metody stosowane w rozprawie doktorskiej są omówione bardzo starannie. Ocenione są także rodzaje i wielkość błędów jakie mogą się pojawić w obliczeniach. Przedstawiony jest także ogólny schemat profilu energetycznego na



powierzchni energii potencjalnej stanu podstawowego i wzbudzonego oraz analogiczny schemat dla pochodnych retinalu.

W pierwszym rozdziale Wyników Autorka przedstawiła charakterystykę geometrii równowagowych retinali bez pierścienia  $\beta$ -jononowego oraz przeanalizowała wyniki uzyskane z kolejnych metod kwantowo-chemicznych o zmniejszającej się dokładności: CASPT2, CASSCF, MP2 i DFT. Autorka zauważyła, że optymalizacja geometrii w mniejszej bazie funkcyjnej może prowadzić do całkowicie błędnych struktur geometrycznych. Natomiast użycie najmniej dokładnej metody DFT z funkcjonałem B3LYP prowadziło do poprawnych geometrii ze względu na kasowanie się błędów obliczeniowych. W związku z tym do badania geometrii w stanie podstawowym użyto m.in. kombinacji metod CASPT2//B3LYP.

W kolejnym rozdziale wyników przedstawiono charakterystyki geometrii równowagowych modyfikowanych retinali w stanie podstawowym rodopsyny (tym razem już z pierścieniem  $\beta$ -jononowym). Obliczenia wykonano metodą QM/MM dla struktury krystalicznej rodopsyny 1U19. W badanych układach część QM zawierała badany związek oraz jedną grupę  $\text{CH}_2$  Lys296, natomiast reszta białka była opisywana przez pole siłowe Amber94. Przeanalizowano m.in. wpływ przeciwjonu (Glu113), który stabilizuje dodatni ładunek zasady Schiffa chromoforu, oraz innych aminokwasów w miejscu wiążącym na własności spektroskopowe pochodnych retinalu.

Metody QM/MM użyto także w następnym rozdziale wyników do zbadania ścieżki reakcji fotoizomeryzacji retinalu i jego czterech metylowanych lub demetylowanych pochodnych: 13-dm, 9-dm, 10-m, oraz 10-m-13-dm. Przeanalizowano mechanizm zwany asynchronicznym wałem korbowym dla zmiany sąsiednich kątów dwuściennych łańcucha retinalu. Ten mechanizm pozwala na wykorzystanie minimalnej przestrzeni w kieszeni białkowej podczas izomeryzacji cis-trans retinalu. Obliczono także zmagazynowaną energię fotonową w batorodopsynie - pierwszym stabilnym aktywnym stanie rodopsyny. Jest ona proporcjonalna do wygięcia łańcucha polienowego chromoforu. Porównując z wynikami doświadczalnymi zauważono także, że wartość tej zmagazynowanej energii jest proporcjonalna do aktywności transdukcijnej pochodnych rodopsyny.

W ostatnim rozdziale wyników zanalizowano dwa acykliczne pochodne retinalu, w których pierścień  $\beta$ -jononowy jest rozerwany oraz jeden konformer retinalu z wbudowanym pierścieniem 8-członowym. W wyniku przeprowadzonych obliczeń uzyskano pełne ścieżki fotoizomeryzacji w stanie wzbudzonego  $S_1$  chromoforu. Analiza wykazała, że nachylenie



profilu reakcji natywnego pigmentu jest takie samo jak pigmentów acyklicznych natomiast acykliczne batorodopsyny magazynują mniejszą ilość energii fotonowej co dobrze koreluje z wyznaczoną doświadczalnie obniżoną aktywnością transdukcijną.

Autorka stwierdza, że otrzymane wyniki mogą być wykorzystane np. do zaprojektowania nowych ligandów rodopsyny, pochodnych retinalu, do leczenia zwyrodnieniowych chorób siatkówki spowodowanych wadami genetycznymi.

Podsumowując, rozprawa jest zwarta i napisana poprawnym językiem naukowym. Zastosowano dużo różnorodnych i komplementarnych metod obliczeniowych w badaniu tak istotnego białka jakim jest rodopsyna. Wybór metod i krytyczna interpretacja uzyskanych wyników świadczą o dojrzałości naukowej Autorki. Z punktu widzenia recenzenta wymienię również pewne niedociągnięcia. Rozprawa zawiera bardzo wiele tabel i schematów przedstawiających bardzo szczegółowe dane. Takie dane powinny być raczej umieszczone w materiałach dodatkowych, gdyż znacznie utrudniają tok czytania i przesłaniają główne wnioski i osiągnięte wyniki. Brakuje natomiast rysunków strukturalnych. W całej pracy nie ma ani jednego rysunku pokazującego orbitale molekularne (HOMO i LUMO) na retinalu i jego pochodnych ani ich zmian w czasie izomeryzacji. Takie rysunki w bardzo poglądowy sposób ułatwiłyby zrozumienie zachodzących zmian i uchwycenie różnic w procesie izomeryzacji natywnego retinalu i jego pochodnych. Z tego samego powodu brakuje także rysunków powierzchni gęstości elektronowej dla analizowanych retinali a w szczególności zmapowanego potencjału elektrostatycznego na tych powierzchniach. Takie rysunki pomagają zrozumieć przedstawiane zagadnienia osobom niebędącym specjalistami w dziedzinie chemii kwantowej. W pracy stwierdzono, że dynamika retinalu ma duże znaczenie dla przebiegu procesu fotoizomeryzacji – brakuje natomiast pokazania przykładowych ruchów oscylacyjnych retinalu i jego pochodnych – szczególnie takich, które mogłyby przyspieszać bądź opóźniać izomeryzację.

Modele retinalu w fazie gazowej były liczone przy niezobojętnionym ładunku dodatnim chromoforu. Wydaje się, że wpływ tego efektu będzie niewielki na porównywanie metod obliczeniowych ale brakuje oceny błędu uzyskanych wyników. Na Rys. 5.3 przedstawiono trzy różne geometrie chromoforu locked-11.8 zoptymalizowane w matrycy białkowej. Brakuje informacji jakiej metody użyto do znalezienia tych konformacji bowiem nie stosowano dynamiki molekularnej a uzyskane struktury są dosyć różne. Sama minimalizacja energii układu chyba byłaby niewystarczająca.

Str. 83. Niezrozumiały opis: „grupy hydroksylowe reszt Glu122”.



Str. 102. Cytuję: „minima na powierzchni stanu  $S_1$  są na tyle płytkie, że aby je znaleźć zmniejszono krok” – z kontekstu zdania wynika, że chyba chodziło o wąskie minima.

Wyżej wymienione niedociągnięcia nie przesłaniają jednak znaczącej wartości naukowej dysertacji oraz znakomitego przygotowania doktorantki. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), dlatego przedkładam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr. inż. Elżbiety Walczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sławomir Filipek