

Prof. dr hab. Joanna Sadlej
Wydział Matematyczno-Przyrodniczy
Instytut Nauk Chemicznych
Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego
ul. Wójcickiego 1/3
01-938 Warszawa

Warszawa, 01.02.2012

Recenzja

*rozprawy doktorskiej mgr Dawida Grabarka
pt. „Modelling and characterization of one- and two-photon absorption for
chosen green and yellow fluorescent proteins with theoretical chemistry methods”*

Białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein, GFP*) jest naturalnie występującym białkiem wykazującym zieloną fluorescencję przy ekspozycji na światło z zakresu niebieskiego do ultrafioletu. Charakteryzuje się strukturą tzw. β -beczułki. We wnętrzu w fluoroforze znajdują się trzy aminokwasy seryna, tyrozyna, glicyna (tripeptyda Ser65 -Tyr66 – gly67), które w otaczającym je środowisku ulegają cyklizacji i dehydratacji, co prowadzi do powstania fluoryzującego układu sprzężonych wiązań podwójnych. Białko znajduje zastosowanie w biologii molekularnej komórki. Sprawdza się jako tzw. molekula reporterowa, służąca do badania np. aktywności promotorów lub wydajności różnych procesów w komórkach. Wkrótce po odkryciu białko GFP zostało zmodyfikowane na wiele sposobów poprzez wprowadzanie mutacji, co ułatwiło i rozszerzyło jego wykorzystanie. Powstały w ten sposób białka świecące na niebiesko (*blue, BFP*), cyjanowo (*cyan, CFP*), żółto (*yellow, YFP*). W odróżnieniu od innych białek wykazujących fluorescencję nie wymaga ono kofaktorów, jako aktywatorów, ani towarzyszących białek oraz ATP. Do wzbudzenia jego fluorescencji wymagane jest jedynie światło mieszczące się w odpowiednim zakresie absorpcji. Przedmiotem pracy doktorskiej pana mgr Grabarka są białko „zielone” oraz „żółte”.

Przedstawiona mojej ocenie rozprawa doktorska reprezentuje jeden z kolejnych etapów konsekwentnej realizacji badań w dziedzinie fotobiochemii/fotobiologii, których celem jest badanie układów o znaczeniu biologicznym przy pomocy zaawansowanych metod chemii kwantowej i metod klasycznej dynamiki molekularnej. Rozprawa doktorska pana mgr Dawida Grabarka reprezentuje jeden z kolejnych etapów konsekwentnej realizacji badań

struktury i właściwości spektroskopowych takich molekuł prowadzonych od szeregu lat pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Andruniowa.

Generalnie przedstawione podejście obejmuje badanie zależności pomiędzy strukturą tych związków oraz środowiskiem, a ich aktywnością. Celem nadrzędnym pracy była próba przedstawienia pogłębionego opisy zarówno chromoforów białek fluorescencji jak i ich otoczenia/środowiska w celu tworzenia w przyszłości nowych białek o bardziej wyspecjalizowanych właściwościach w dalszych etapach badań tej grupy związków.

W teoretycznym opisie wpływu ośrodka na fizyczne i chemiczne właściwości molekuł najtrudniejszym i zarazem najbardziej istotnym problemem jest wybór odpowiedniego modelu. Duże pod tym względem nadzieje stwarzają obecnie metody chemii kwantowej oraz symulacje metodami dynamiki molekularnej. Do tej klasy problemów zaliczyć należy badania, przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej. Dlatego też w pełni doceniam celowość prac podejmowanych w tym zakresie i jednocześnie uważam za w pełni uzasadniony podstawowy cel Autora rozprawy. Nie ulega wątpliwości, iż temat jest bardzo aktualny, rozważania nader potrzebne, mieszczące się w ramach współczesnego nurtu badania substancji o znaczeniu biologicznym, a także badań o oddziaływaniach międzymolekularnych.

Jako główną cechę wskazującą optymalne właściwości układów badanych, czyli swoisty analizator/sygnalizator, Autor wybrał elektronowe widma jedno (OPA) – i dwufotonowe (TPA), co jest oczywiste ze względu na właściwości tych białek. Zarówno wybór modelu białek (czyli chromofora i jego otoczenia) wraz z wyborem modelu opisu ich środowiska, jak również wybór metod do obliczania wybranych parametrów widm wymaga podjęcia decyzji. Jako parametry tych widm Autor wybrał energię wzbudzeń elektronowych (ΔE), siłę (moc oscylatora, f) poszczególnych przejść oraz przekroje czynne dwufotonowej absorpcji $\sigma(\text{TPA})$, ponieważ te parametry molekularne nadają się najbardziej do oceny właściwości fluoryzujących związków. Należy pamiętać, iż ostatni z nich jest subtelnym, nieliniowym parametrem wyższego rzędu, czyli wymagającym nader starannego wyboru metody obliczeń kwantowo-chemicznych.

Zanim przejdę do omawiania merytorycznego poszczególnych części rozprawy, z kronikarskiej porządności wspomnę, iż rozprawa napisana jest w j. angielskim, na 200 stronach, z czego 50 stron dotyczący opisu białek zielonej i żółtej fluorescencji oraz stosowanych technik badawczych, a pozostałe strony zajmuje omówienie wyników własnych i wnioski; spis literatury zawiera 267 pozycji. Tekst czyta się z wielką przyjemnością.

Rozprawa napisana jest zwięźle, logicznie, z zaznaczonymi celami i sposobem postępowania. Spięta jest końcowymi wnioskami, z wyraźnym nawiązaniem do celów wymienionych w fragmencie początkowym rozprawy. Istotną zaletą tekstu pracy, a zarazem zasługą Autora, jest umiejętne rozdzielenie własnego dorobku od materiału teoretycznego. Materiał przedstawiony w dysertacji jest opublikowany w 4 publikacjach i przedstawiany był na konferencjach.

Część pierwsza rozprawy (Rozdziały I, II i III) poświęcona jest omówieniu podstawowych informacji na temat białek fluoryzujących oraz przedstawieniu współczesnej wiedzy na ich temat w punktu widzenia doświadczeń oraz dokonanych obliczeń przy pomocy chemii kwantowej (rozdział I). Z tego przeglądu Autor w logiczny sposób przedstawia zadania sformułowane pod adresem swojej rozprawy doktorskiej (rozdział II). Rozdział III przedstawia w zwięzły sposób metodykę badań metodami chemii kwantowej i przy pomocy symulacji metodą mechaniki klasycznej. Powyższy przegląd napisany jest niezwykle elegancko, zwięźle, a zarazem ciekawie, świadczy o dobrym zrozumieniu przez Autora stosowanych metod. W pracy, również w tej jej części, znajduje się bardzo wiele odnośników do bieżącej literatury na temat badanych białek, a także odnośników do publikacji o metodach obliczeniowych, co wskazuje na szeroką wiedzę Autora w przestrzeni prowadzonych badań własnych. Podoba mi się króciutki rozdział II (str.35), w którym Doktorant formułuje cztery „objectives”, czyli zadania postawione sobie, co ułatwia czytanie części omawiającej wyniki własne poprzez powołanie się na odpowiednie zadania na str.35.

Część druga rozprawy zawiera opis wyników własnych Autora. Przechodzę do jej omówienia. Prowadzone jest ono według schematu odsłaniania poszczególnych warstw, badanego układu, poczynając od warstw oddalonych od środka, jeśli za środek (jądro) układu uznać chromofor.

Powyżej wspominałam o konieczności podjęcia przez Autora decyzji w paru kwestiach. Dwie pierwsze kwestie dotyczą wyboru metody obliczeń i zdefiniowania modelu układu. W sprawie optymalnego wyboru metody obliczeń parametrów spektroskopowych wspomnianych powyżej (ΔE , f , $\sigma(\text{PA})$) zaprezentowane zostały obliczenia parametrów spektroskopowych chromoforów w postaci neutralnych i anionowych w gazie gazowej w ramach metody czasowo-zależnej metody funkcjonałów gęstości TD-DFT/CAM-B3LYP (i także mniej rozbudowanych funkcjonałów) oraz metody sprzężonych klasterów CC2 wykorzystując bazy funkcyjne Dunninga. Badanie wkładu części wymiennej funkcjonału do omawianych parametrów stanowi także wartościowy opis.

Po ustaleniu spraw metodycznych zaczynają się kręgi rozprawy związane z wyborem modelu układu. Tych warstw (kregów) jest parę:

1. Autor postawił pytania: jak zmieniają się parametry widm OPA i TPA w zależności od struktury chromoforu, badając aż 22 chromofory w fazie gazowej należące do 4 głównych grup. Zanotował zależność wartości energii przejścia elektronowego do kwadratu zmiany momentu dipolowego pod wpływem wzbudzenia, podczas gdy przekrój czynny dwufotonowej absorpcji nie wykazuje takiej zależności. Sprawa nieco się zmienia w przypadku wzbudzeń do wyższych stanów wzbudzonych.
2. Po wyborze metody obliczeń zdefiniowanie modelu układu jest najistotniejszym punktem. Jako jednostka centralna zostały wybrane trzy białka fluorescencyjne (neutralne, anionowe i „citrine”) zanurzone w otoczeniu, z którym możliwe są oddziaływania typu elektrostatycznego, a także środowisko/otoczenie zdolne do polaryzacji. Otoczenie opisane zostało przy pomocy dynamiki molekularnej CP2K. Układ jest super-kompleksem, w którym białko-środowisko oddziałuje z dozwolonymi włączonymi oddziaływaniami hydrofilowymi i hydrofobowymi aminokwasów. Ciekawym wnioskiem z tej części badań jest obserwacja, iż w przypadku otoczenia polaryzowalnego parametry widm elektronowych nie zależą od rozmiarów i składu tego środowiska.
3. Pozostała jeszcze jedna możliwość do zbadania, opisana w &7. W tej, ostatniej części rozprawy Autor zaproponował zmianę modelu samych białek, aby zaobserwować wpływ wyboru białek chromoforowych na widma i śledzić czynniki, sprzyjające wzrostowi intensywności widm OPA i TPA.

W jaki sposób można zmodyfikować strukturę obecnie znanych białek fluorescencyjnych, aby zwiększyć wydajność jego fluorescencji? Z badań ukierunkowanych w wymienionym aspekcie najbardziej interesujące wydają się dwa wnioski, dobrze poparte przedstawionymi wynikami badań Autora:

1. Rozwinięcie układu podwójnych wiązań w chromoforze białka przyczynia się do zwiększenia parametru przekroju czynnego dwufotonowej absorpcji,
2. Autor zanotował pozytywny wpływ obecności wiązań wodorowych pomiędzy atomem tlenu molekuly fenylu obecnej w chromoforze a odpowiednim akceptorem protonu w jego otoczeniu, co przyczynia się również do wzrostu przekroju czynnego dwufotonowej absorpcji, chyba najważniejszego parametru oceniającego niezwykle właściwości białek fluorescencyjnych.

Choć intuicyjnie powyższe dwa punkty wydają się zrozumiałe uważam, że otrzymanie powyższych rezultatów w ramach obliczeń kwantowych wraz z uwzględnieniem wpływów środowiska metodami dynamiki molekularnej jest dużym osiągnięciem Autora. Moim zdaniem, wyniki badań uzyskane przez Pana mgr Grabarkę poszerzają dotychczasową wiedzę w dziedzinie fluorescencyjnych białek. Autor wykazał się znajomością literatury przedmiotu, umiejętnością racjonalnego planowania i realizowania badań oraz zdolnością do formułowania wniosków. A zrozumienie wyżej omawianych mechanizmów pozwoli najpewniej w przyszłości na zaprojektowanie nowych związków.

Rozprawa doktorska napisana jest świetnie, czyta się ją z wielkim zainteresowaniem. Strona edytorska rozprawy jest poprawna, widać dbałość o jasność wywodów, materiał zebrany jest na wielu rysunkach. Każdy rozdział zaczyna się krótkim przedstawieniem problemu, a zakończony jest zwięzłym, krótkim podsumowaniem, co bardzo ułatwia czytanie rozprawy.

Podsumowanie: Przedstawioną przez mgr Dawida Grabarkę rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie. Praca ta jest bardzo dobrym przykładem badań teoretycznych przy pomocy metod chemii kwantowej i dynamiki molekularnej sprzężonych z danymi spektroskopowymi. Autor opracował dobór odpowiednich metod obliczeniowych, wykazując inwencję i dobrą znajomości ducha nowoczesnej spektroskopii i chemii kwantowej.

Wniosek końcowy: Otrzymana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wyróżniająco, moim zdaniem, warunki ustawowe i świadczy o bardzo dobrym opanowaniu metod chemii kwantowej i spektroskopii teoretycznej. Świadczy ona również o samodzielności Autora w stawianiu i rozwiązywaniu współczesnych problemów badawczych. Przeto wnoszę o dopuszczenie pana mgr Dawida Grabarkę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Sadlej

Zal. 1. Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Dawida Grabarkę pt. „Modelling and characterization of one- and two-photon absorption for chosen green and yellow fluorescent proteins with theoretical chemistry methods”

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej
mgr Dawida Grabarka
*pt. „Modelling and characterization of one- and two-photon absorption for
chosen green and yellow fluorescent proteins with theoretical chemistry methods”*

Moim zdaniem rozprawa doktorska pana mgr Dawida Grabarka zasługuje na wyróżnienie. Poniżej podsumuje odpowiedzi na pytanie, dlaczego?

Po pierwsze: podjęta została bardzo ciekawa i aktualna tematyka badawcza;

Po drugie: Autor postawił ciekawą hipotezę o wpływie środowiska i zmian w strukturze chemicznej chromoforu na właściwości spektroskopowe białek fluorescencyjnych;

Po trzecie: Autor zastosował w swoich badaniach współczesne metody chemii kwantowej i dynamiki molekularnej w celu obliczania parametrów jedno- i dwufotonowych przejść elektronowych;

Po czwarte - Autor zaproponował następujące zmiany w strukturach białek, aby otrzymać białka o lepszych parametrach spektroskopowych; one mają polegać na rozwinięciu układu podwójnych wiązań w chromoforze oraz/lub na zwiększeniu roli powstających w układach wiązań wodorowych. Stworzone modele i podejście metodyczne Autora pokazują siłę predykcyjną i zasługują na uznanie.

Po piąte: Autor wykazał dużą dojrzałość naukową w krytycznym analizowaniu swoich wyników; rozprawa doktorska Autora jest napisana w sposób bardzo dojrzały, kompetentny.

Po szóste: Autor jest współautorem 4 publikacji naukowych (dwóch autorów tylko !!!)

Joanna Sadlej