

Prof. dr hab. MARIUSZ MAKOWSKI
KIEROWNIK

Gdańsk, 28.01.2021 r.

Szanowny Pan
Dr hab. inż. Robert Góra, profesor uczelni
Przewodniczący Komisji ds. Stopni Naukowych
w Dyscyplinie Nauki Chemiczne
Politechniki Wrocławskiej

Szanowny Panie Przewodniczący,

w załączeniu przesyłam recenzję rozprawy doktorskiej mgr. Dawida Grabarka pt. *„Modelowanie i charakterystyka absorpcji jedno- i dwufotonowej w wybranych zielonych i żółtych białkach fluorescencyjnych metodami chemii teoretycznej (ang. Moedling and characterization of one- and two-photon absorption for chosen green and yellow fluorescent proteins with theoretical chemistry methods)”,* wykonanej pod opieką prof. dr. hab. Tadeusza Andruniowa z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.

Z poważaniem,

Mariusz Makowski

**Recenzja**rozprawy doktorskiej **magistra Dawida Grabarka**

zatytułowanej:

„Modelowanie i charakterystyka absorpcji jedno- i dwufotonowej w wybranych zielonych i żółtych białkach fluorescencyjnych metodami chemii teoretycznej (ang. Moedling and characterization of one- and two-photon absorption for chosen green and yellow fluorescent proteins with theoretical chemistry methods).”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr. Dawida Grabarka została wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Tadeusza Andruniówa w Katedrze Inżynierii i Modelowania Materiałów Zaawansowanych Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Rozprawa została napisana w języku angielskim i stanowi obszerne ponad 200 stronicowe opracowanie. W pracy stosowana jest duża liczba skrótów odnoszących się do nazw używanych w tekście, które zostały zdefiniowane na początkowych stronach dysertacji. Na ostatnich trzech stronach dokumentu znajduje się informacja o dorobku naukowym Kandydata do stopnia doktora. Praca została napisana starannie pod względem językowym. Treści są przedstawione w sposób klarowny, z bardzo starannymi szatami: graficzną oraz edytorską. Oczywiście w tego rodzaju rozprawach nie można było uniknąć pewnego rodzaju nieścisłości i drobnych błędów. Jest ich jednak niewiele i nie wpływają na całkowitą ocenę pracy. Generalnie, jasny sposób przedstawienia problemu oraz zbiór rozdziałów układających się w logiczną całość, dowodzą dużej dojrzałości Autora ocenianej dysertacji.

Układ rozprawy jest typowy dla tego rodzaju opracowań i składa się z siedmiu rozdziałów, zatytułowanych odpowiednio w języku angielskim: **(1) Introduction** (34 strony); **(2) Objectives** (ponad 1 strona); **(3) Methodology** (16 stron); **(4) XCFs benchmark and gas-phase OPA and TPA spectra of chromophores** (30 stron); **(5) Fluorescent protein models choice** (25 stron); **(6) Impact of the chromophore's protein environment on OPA and TPA spectra** (29 stron); **(7) Summary and outlook** (2 strony). Dodatkowo do części wynikowej pracy zostały załączone: *Supporting Information* (33 strony), *Bibliography* (25 stron, 267 pozycji) oraz *Scientific output* (3 strony). Na początku rozprawy

Doktorant umieścił jednostronicowe wprowadzenie do tematyki podjętych badań (*Foreword*) oraz wykaz skrótów i wielkości fizycznych używanych w pracy (*Glossary of abbreviations and symbols* – 5 stron). Odrębny dokument stanowi jednostronicowe streszczenie pracy po polsku. Tytuł rozprawy odpowiada jej treści i zawartym w niej wynikom badań.

Wyizolowanie z meduzy *Aequorea victoria* białka GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*) przez Osamu Shimomurę w 1962 roku, było odkryciem ciekawym, które zapoczątkowało rozwój badań nad biochemicznymi mechanizmami luminescencji oraz wprowadziło nową jakość do biologii molekularnej. O tym jak było to ważne odkrycie świadczy fakt przyznania Nagrody Nobla w 2008 roku O. Shimomurze za opis zjawiska oraz dwóm innym badaczom, Martinowi Chalfiemu i Rogerowi Tsienowi, za badania nad białkiem GFP. Te stosunkowo niewielkie białko, składające się z 238 reszt aminokwasowych o drugorzędowej strukturze jedenastu β -katek ułożonych w przestrzeni na kształt baryłki zostało do dnia dzisiejszego wielokrotnie zmodyfikowane chemicznie. Badania te miały na celu m.in. zwiększenie jego trwałości, wydajności kwantowej oraz zastosowania w szerszym zakresie promieniowania elektromagnetycznego. Prowadzono też liczne badania wpływu różnego rodzaju czynników fizykochemicznych na właściwości fluorescencyjne GFP. Białka świecące ze względu na swoją niską toksyczność dla organizmu zwierzęcego, dużą stabilność struktury oraz stosunkowo łatwą możliwość wprowadzenia molekuly do wnętrza komórki pozwalają na znakowanie oraz śledzenie wielu procesów i zmian komórkowych, obserwowanie ekspresji genów, rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych oraz zmian w komórkach nerwowych. Są to tylko niektóre ważne zastosowania tej grupy białek. Do dnia dzisiejszego prowadzone są badania nad białkami fluorescencyjnymi, mające na celu znalezienie takich warunków, aby można było zwiększyć ich stosowalność.

Zaproponowane przez mgr. Dawida Grabarkę badania doskonale wpisują się w powyższy trend. Mgr Dawid Grabarek podjął się teoretycznych studiów nad wpływem środowiska chromoforowego fluorescencyjnych białek na ich jedno- i dwufotonowe widma absorpcyjne. Zawarta w rozprawie przedmowa przybliży czytelnikowi rozprawy cel oraz koncepcję planowanych w pracy badań. Doktorant zakłada przeprowadzenie przy użyciu metod obliczeniowych studiów w trzech etapach, które pozwolą ustalić wpływ zmiany otoczenia chromoforów obecnych w białkach fluorescencyjnych (FP) na ich jedno- (OPA) i dwufotonowe (TPA) widma absorpcyjne. Istotą podjętych badań jest zrozumienie molekularnych mechanizmów działania chromoforów decydujących o intensywności absorpcji dwufotonowej w różnych białkach fluorescencyjnych. Autor prezentuje użyte metody obliczeniowe (XCF; TDDFT) do znalezienia korelacji pomiędzy widmami FPs otrzymanymi technikami OPA i TPA, jak również wpływu budowy chromoforu i jego chemicznego otoczenia na te widma.

Część wprowadzająca pracy (*Introduction*) została poświęcona przeglądowi doniesień literaturowych, ściśle związanych z tematyką proponowanych przez Doktoranta badań. Opis rozpoczyna się od przedstawienia historii odkrycia białka GFP, następnie pojawiają się informacje o jego fizykochemicznych właściwościach, budowie, zastosowaniach, modyfikacjach oraz eksperymentalnych i obliczeniowych technikach używanych w badaniach procesów jedno- i dwufotonowej absorpcji. Ta część jest napisana bardzo przejrzysto, z drobnymi tylko nieprecyzyjnymi określeniami jak podawanie „pH=9.00” (strona 17 *Introduction*), zamiast „pH 9.00”. Jest to zresztą konsekwentnie powtarzane na kolejnych stronicach dysertacji.

Cele rozprawy zostały jasno sprecyzowane i zawarte syntetycznie w 6 punktach. Autor planuje w trakcie realizacji pracy wykorzystanie metod obliczeniowych do analizy wpływu budowy chromoforów FP (obecność sprzężonych wiązań, miejsc protonowania, długości łańcucha polipeptydowego i konformacja) na widma absorpcyjne OPA i TPA. Następnie, Doktorant zamierza otrzymane wyniki porównać i poddać analizie korelacyjnej. Założone cele obejmują znalezienie najbardziej optymalnego podejścia, spośród powszechnie dostępnych metod obliczeniowych (XCF, CC2, TDDFT/B3LYP, TDDFT/CAM-B3LYP, QM/MM), za pomocą którego zaplanowano określenie wpływu na widma OPA i TPA, tworzących się z chromoforem FP wiązań wodorowych oraz obecności elektrostatycznych ładunków punktowych indukowanych przez chromofor powodujących zmianę jego geometrii.

Mgr Dawid Grabarek w rozdziale *Methodology* pisze, iż prowadzone przez niego badania nie mają na celu rozwijania metod chemii kwantowej, a tylko wykorzystanie już istniejących narzędzi do prowadzenia określonych badań. W tej części rozprawy dokonany został przez Autora przegląd metod obliczeniowych użytych do osiągnięcia założonych badawczych celów. Wskazane zostały również ich wady i zalety oraz możliwości zastosowania do badania widm OPA i TPA.

Otrzymane przez Doktoranta wyniki i ich dyskusja to kolejne trzy rozdziały, odpowiednio 4-6, recenzowanej rozprawy doktorskiej. W rozdziale 4 przedstawione zostały wyniki obliczeń dla procesów OPA oraz TPA, dla fragmentów chromoforowych białek fluorescencyjnych w fazie gazowej (bez obecności białka). Autor zaczyna od porównania wydajności różnego rodzaju funkcjonałów (dobrych w oparciu o udział energii wymiennej Hartree Focka (HF) w wyrażeniu na energię korelacyjno-wymienną) oraz baz funkcyjnych w odtwarzaniu zmian energii wzbudzenia (ΔE), przekroju dwufotonowej absorpcji (σ^{TPA}) oraz siły oscylatora (f) dla 8 reprezentatywnych chromoforów (5 układów obojętnych oraz 3 anionowych) wyznaczonych przy zastosowaniu metody sprzężonych klastrów (CC2). Funkcjonał CAM-B3LYP okazuje się być najlepszy do odtwarzania energii wzbudzenia CC2 obojętnych chromoforów. Dla układów anionowych w tej kwestii spisują się lepiej B3LYP oraz B1LYP.

W dalszej części tego rozdziału Doktorant opisuje zależności pomiędzy widmami TPA a strukturą różnego rodzaju chromoforów (w liczbie 22), obecnych w białkach fluoroscencyjnych. Układy zostały podzielone na 4 grupy w oparciu o strukturę i obecność ładunku. Autor wykazuje, że dla przejścia pomiędzy singletowym stanem podstawowym a pierwszym wzbudzonym stanem singletowym, σ^{TPA} jest proporcjonalne do kwadratu zmiany momentu dipolowego spowodowanego przejściem elektronowym ($\sigma^{TPA} \sim (\Delta\mu)^2$), co jest zgodne z dwustanowym modelem TPA. Dla wzbudzeń do wyższych stanów nie udało się znaleźć podobnego deskryptora korelującego z wartością σ^{TPA} . Doktorant wykazał znaczący wzrost intensywności TPA w jednej z grup badanych związków B, zawierających układy anionowe ze zwiększającym się stopniowo udziałem sprzężonych wiązań podwójnych w końcowej strukturze, który wytłumaczył obecnością leżących relatywnie nisko stanów wzbudzonych S_1 w anionach oraz obecnością sprzężonych wiązań podwójnych. Z tych samych powodów zaobserwował on też relatywnie niską TPA dla układów z grupy C, zawierającej obojętne chromofory, w których sprzężenie poszczególnych części molekuly zostało przerwane obecnością wiązań pojedynczych.

W kolejnym rozdziale (5) zostały przedstawione wyniki obliczeń OPA oraz TPA chromoforów z uwzględnieniem środowiska białkowego (w postaci białek zielonej oraz żółtej fluorescencji). Doktorant opisuje w tym miejscu badania optymalnego rozmiaru podukładu traktowanego metodami QM w celu wyznaczenia OPA oraz TPA. Doktorant wykazał, że pasmo OPA może być przesunięte w kierunku większych długości fali nawet do 0,15 eV, po samym tylko uwzględnieniu białkowego środowiska za pomocą osadzenia elektrostatycznego (EE) i traktowaniu samego chromoforu metodami QM. Wyniki otrzymane przez Autora wskazują również na wpływ obecności wiązań wodorowych pomiędzy chromoforem a otoczeniem, na zwiększenie wydajności OPA. Z drugiej strony oddziaływania hydrofobowe okazały się prowadzić do przesunięcia długości fali odpowiadającej czerwonemu światłu oraz gaszenia OPA. Doktorant konkluduje, że w celu otrzymania wartościowych w sensie jakościowym wyników, należy potraktować odpowiednio 220-250 lub około 80-100 atomów metodami QM, w zależności od tego czy na pozostałą część badanego układu zastosuje się EE czy osadzenie polaryzacyjne (PE). Na koniec Autor proponuje procedurę, którą w praktyce stosuje do badań opisywanych w kolejnym rozdziale. Głównym założeniem procedury przy zastosowaniu EE jest uwzględnienie w warstwie QM cząsteczek poszczególnych aminokwasów oraz wody w promieniu 0,30-0,35nm (w zależności od badanego białka). Zastosowanie PE prowadzi (nawet dla układów z dużą liczbą atomów potraktowanych QM) do otrzymania widm OPA oraz TPA praktycznie identycznych do tych otrzymanych dla samych chromoforów. Doktorant zapewnia wyczerpujący opis procedury doboru podukładu traktowanego

metodami QM do poprawnego wyznaczenia zarówno OPA jak i TPA białek fluorescencyjnych. Nasuwa się w tym miejscu pytanie, czy proponowany przez Doktoranta promień 3-3.5 Å od chromoforu (powyżej), sprawdziłby się również w odtwarzaniu widm dla innych białek niż rozpatrywane, np. CFP czy RFP? Czy może w tym przypadku należałoby przeprowadzić tę samą analizę, która została wykonana dla GFP i YFP?

W ostatnim rozdziale (6) poświęconym omówieniu wyników własnych, mgr. Dawid Grabarek podjął się porównania widm OPA oraz TPA wybranych fluorescencyjnych białek różniących się sekwencją aminokwasową do określenia wpływu środowiska chromoforu na kształtowanie widm OPA oraz TPA, biorąc pod uwagę wiązania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne, geometrię chromoforu oraz pole elektryczne. W przypadku przejść $S_0 \rightarrow S_1$ dla GFPs, zarówno wiązania wodorowe jak i pole elektrostatyczne zwiększają wydajność TPA, podczas gdy wydajność OPA ulega zmniejszeniu. Ponadto Doktorant wykazał, że dla wspomnianych przejść intensywność OPA oraz TPA zależy od utworzonej przez układ sieci wiązań wodorowych. Tym samym wykazał, że dla każdego rodzaju przejść obecność, związanych do grupy fenolanowej poprzez wiązanie wodorowe aminokwasów oraz cząsteczek wody, prowadzi do zwiększenia TPA oraz OPA. Innym sposobem na zwiększanie TPA okazuje się być tworzenie oddziałującego z fenolanem układu z bardziej dodatnim ładunkiem.

Podsumowując, mgr Dawid Grabarek dokonał określenia metodyki badań w postaci dopasowania odpowiedniego funkcjonu do obliczeń kwantowo-chemicznych oraz analizy optymalnej liczby atomów traktowanych metodami QM w podejściu QM/MM MD, która pozwala na otrzymanie poprawnych rezultatów.

Supporting Information jest uzupełnieniem uzyskanych wyników badań, które pozwala na dokonanie głębszej analizy rezultatów. Pojawiają się też w tej części pracy m.in. szczegóły protokołu przeprowadzonych obliczeń dynamiki molekularnej (MD). Obliczenia te zostały przeprowadzone w polu siłowym ff99SBildn zaimplementowanym do pakietu AMBER. Czy obliczenia MD prowadzone były z wykorzystaniem pakietu Gaussian? W jaki sposób zostało sprawdzone, że 10 ns dynamiki jest wystarczające do tego typu obliczeń?

Pan mgr Dawid Grabarek jest współautorem 10 prac z listy JCR (dziewięciu opublikowanych i jednej w recenzji), 15 prezentacji konferencyjnych, w tym siedmiu wygłoszonych referatów. Wyniki badań wchodzące w skład rozprawy doktorskiej Kandydata zostały przedstawione w czterech dwuautorskich pracach w bardzo dobrych czasopismach o wysokich współczynnikach wpływu: *J. Chem. Theory Comput*, *Int. J. Quantum Chem.*. Praca została sfinansowana z grantu przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu Preludium 11, którego Doktorant był kierownikiem. Jest to bez wątpienia bardzo dobre osiągnięcie mgr. Dawida Grabarka, jak i promotora w osobie

prof. Tadeusza Andruniówa. Nie mam najmniejszych wątpliwości, iż w powstawaniu każdej z prac wkład Doktoranta był dominujący. W pracy zostało zacytowanych 267 pozycji literaturowych. Należy zwrócić tutaj uwagę na fakt, iż większość z nich, poza pracami fundamentalnymi, została opublikowana po 2000 roku. Dowodzi to aktualności prowadzonej przez Doktoranta tematyki badań.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Dawida Grabarka została napisana w języku angielskim. Jest to obszerne teoretyczne studium poświęcone modelowaniu i charakterystyce absorpcji jedno- i dwufotonowej wybranych fluorescencyjnych białek. Bardzo starannie przygotowana pod każdym względem praca, zawiera w sobie wymagane elementy nowości naukowej potwierdzone rzetelnymi wynikami badań. Przedłożona mi do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane ustawą o tytule i stopniach naukowych a także zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym, wnoszę do Rady Dyscypliny Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr. Dawida Grabarka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia.

Ze względu na wysoką wartość naukową oraz znaczący dorobek naukowy Kandydata, wnoszę również do Rady Dyscypliny Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o **wyróżnienie** rozprawy doktorskiej mgr. Dawida Grabarka.

