

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Inż. Krystiana Gałęckiego pt.: Badanie mechanizmu fosforescencji tryptofanu w kontekście monitorowania struktury i dynamiki białek

Poniższa recenzja jest kolejną, napisaną po otrzymaniu materiałów uzupełniających i nowej wersji wprowadzenia. Ze względu na to, że praca jest oparta na cyklu pięciu prac opublikowanych w *Spectrochimica Acta*, uwagi dotyczące zawartości tych prac zostały przepisane *in extenso* z poprzedniej recenzji.

Pomiary (stacjonarne i czasowo-rozdzielcze) luminescencji molekuł wprowadzonych do układu lub będących ich naturalnymi składnikami, stanowią pożyteczne narzędzie analityczne do identyfikacji związków, określania właściwości mikrootoczenia cząsteczki luminezującej. Ważnym elementem zastosowań jest wyznaczanie kinetyki procesów konkurujących z luminescencją. W tym przypadku możliwości badania są ograniczone do tych procesów, których stałe szybkości są porównywalne ze stałymi szybkości luminescencji. Szybkie procesy o stałych szybkości rzędu 10^8 s^{-1} takie jak: reakcje w stanie wzbudzonym czy obroty brownowskie bada się od dawna dokonując pomiarów natężenia oraz zaniku w czasie fluorescencji, te wolniejsze o kilka rzędów mogą być w zasadzie analizowane w oparciu o pomiary fosforescencji. W tym ostatnim przypadku jest jednak problem, a mianowicie uzyskanie fosforescencji w układach ciekłych w temperaturze pokojowej jest niełatwe. Z tego też powodu, prac wykorzystujących fosforescencję w stosunku do tych, które wykorzystują fluorescencję jest dużo mniej.

Spośród sond luminescencyjnych bardzo ważnymi są molekuły luminezujące, będące składnikami badanego układu. W badaniach białek szczególną rolę odgrywa tryptofan, jeden z aromatycznych aminokwasów. Właśnie fosforescencja tryptofanu i związki jej parametrów ze sztywnością struktury białek są przedmiotem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. Uważam, że temat został wybrany bardzo trafnie, a badania w tym zakresie są niezwykle potrzebne.

Praca doktorska mgr. inż. K. Gałęckiego została skonstruowana w oparciu o punkt 2 art.13 Ustawy o stopniach naukowym i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z dnia 14 marca 2003 r. z późn. zmianami). Składa się z liczącego 24 strony wprowadzenia, oraz pięciu publikacji. Wprowadzenie zawiera w sobie spis treści, streszczenie w języku polskim i języku angielskim, zarysowany ogólny wstęp, cel i wyniki pracy oraz pięć trzy – dwu stronicowych opisów rezultatów uzyskanych w poszczególnych publikacjach. Opracowanie kończy jednostronicowe podsumowanie oraz licząca 22 pozycje, literatura. W odróżnieniu od pierwotnej wersji, lektura obecnego wprowadzenia pozwala sobie wyrobić pogląd co było przedmiotem dysertacji bez szczegółowego analizowania załączonych publikacji. Świadczy również, że doktorant w wystarczającym stopniu opanował sztukę prezentacji wyników pracy naukowej. Po drugie wprowadzenie jest napisane w pierwszej osobie, co w połączeniu ze szczegółowymi oświadczeniami współautorów ułatwia dokonanie oceny indywidualnego wkładu doktoranta.

Publikacje, wchodzące w zakres rozprawy zostały pomieszczone w czasopiśmie *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy (IF>2)* i tam poddane specjalistycznym recenzjom.

Według mojej oceny publikacje wchodzące w zakres rozprawy stanowią, zgodnie z wymogami Ustawy, zbiór spójny tematycznie. Wielokrotnie, recenzując prace habilitacyjne, miałem do czynienia ze zbiorem prac „spójnych tematycznie”. Chce podkreślić, że obecny zestaw jest wzorcowo spójny i logicznie przedstawia eksperymenty mające uzasadnić przyjętą tezę o związku parametrów opisujących luminescencję ze sztywnością białek. Publikacje zawierają spory, unikalny materiał, który inspirowa do alternatywnych interpretacji i – moim zdaniem – będzie zaczął bardzo ożywionej dyskusji naukowej.

W pracy nr 1 autorzy mierzyli czasy zaniku fluorescencji i fosforescencji: indolu, tryptofanu, związku modelowego NATA w obecności różnych stężeń wygaszacza (jonów jodu). W pomysłowy sposób określili kolejne parametry kinetyczne określające szybkości procesów luminescencyjnych, wygaszania oraz wydajności tworzenia stanów trypletowych. Z obowiązku recenzenckiego wskazałbym na trzy sprawy:

- a. Brak jest informacji czy zaniki luminescencji miały charakter jednowykładniczy. Założenie o tym było chyba milcząco przyjmowane w dalszych rozważaniach (równanie Sterna Volmera itd.).
- b. Dobrze by było gdyby na wykresach Sterna-Volmera zostały umieszczone niepewności wyznaczenia czasów zaniku.
- c. Rys. 9 ilustrujący pomysłowy sposób wyznaczenia szybkości wygaszania stanu trypletowego przez stan podstawowy ma źle opisane oś odciętych, a dopasowanie linią prostą wyników dla NATA jest chyba dużym uproszczeniem.

W pracy nr 2 autorzy kontynuują badanie związków z pracy nr 1. W sprytny sposób separują wpływ temperatury na zanik trypletu w wyniku procesów wewnątrzcząsteczkowych od wpływu temperatury na szybkość procesów dwumolekularnych (wygaszanie dynamiczne). Autorzy konstruują wykresy Arrheniusa. Problem jaki się – moim zdaniem pojawia – polega na tym, że stosownie do wzoru (2), wykresowane jest faktycznie: $\ln(1/\tau_{ph}^0) = \ln(k_0 + A \exp(-E_0/RT))$. Dla małego zakresu temperatur będzie to zawsze linia prosta natomiast efektywne wartości odcięcia i nachylenia będą się zmieniały w zależności od (nieznanej) wartości k_0 . Rozwiązanie zagadki powodu krzywizny wykresów Arrheniusa wystarczyłoby – moim zdaniem na solidną pracę doktorską.

W pracy nr 3 wprowadzone zostają dwa dodatkowe indole podstawione grupą karboksylową: jeden w pozycji 2, drugi w pozycji 5. Tym razem pomiarom fosforescencji wygaszanej jonami jodu towarzyszą obliczenia widm IR (*in vacuo*), które zostały porównane z wynikami doświadczalnymi IR badanych związków w stanie stałym. Interesujące jest że stała szybkości dwumolekularnej reakcji wygaszania stanu singletowego badanych związków jonami jodu wynosi 10^9 - $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, tak jak to mniej więcej wynika z równania Smoluchowskiego podczas gdy wygaszanie stanu trypletowego tych samych cząsteczek zachodzi ze stałą szybkości rzędu $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

W pracy nr 4 rozszerzono badania na polipeptydy: alaninę (A) związaną z tryptofanem (W) w postaci AW, WA i AWA. W tej pracy po raz pierwszy pojawia się informacja, że zaniki fluorescencji są co najmniej dwuwykładnicze. Zinterpretowano to jako wynik istnienia dwóch form jonowych w stanie podstawowym. Czasy zaników fosforescencji przyjęto jako jednowykładnicze co nie dziwi, bo - przy stosunku sygnału do szumu jaki daje się uzyskać w pomiarach fosforencyjnych - nie można odrzucić modelu jednowykładniczego. Dla celów wykresów Sterna Volmera zdefiniowano średnie czasy gaśnięcia fluorescencji i korzystając z metodologii opracowanej w pracach 1-2 wyznaczono parametry

wygaszania. Ciekawe byłyby eksperymenty, też na oddzielnej pracy doktorskiej, w których oddzielnie byłyby analizowane składowe zaniki fluorescencji.

W ostatniej pracy (nr 5) dołączono do badań 7 białek zawierających jeden tryptofan. Stwierdzono tu korelację pomiędzy czasem gaśnięcia fosforescencji a położeniem tryptofanu na powierzchni (otoczenie hydrofilowe – krótki czas) oraz wewnątrz białka (otoczenie hydrofobowe- długi czas gaśnięcia). Te wyniki porównano z czynnikiem B określającym sztywność łańcucha białkowego i – zgodnie z oczekiwaniami – okazało się, że długi czas gaśnięcia fosforescencji (położenie wewnątrz białka) koreluje z małym B (bardziej sztywna struktura) i odwrotnie.

Forma rozprawy przyjęta przez doktoranta powoduje, że ciężar recenzji przesuwa się, niestety, w kierunku wykazania jego indywidualnego wkładu w publikacjach wchodzących w skład rozprawy. Artykuły te mają charakter wieloautorski (odpowiednio 4, 3, 3, 6, 3 autorów). We wszystkich pracach pierwszym autorem jest promotor pomocniczy pracy - dr inż. Agnieszka Kowalska-Baron, a ostatnim promotor- prof. Stanisław Wysocki. Doktorant w pierwszym artykule znajduje się na 3. , a w pozostałych na 2. miejscu. W dokumentacji, którą otrzymałem za pierwszym razem znajdowały się oświadczenia trzech współautorów pracy nr 4 z Instytutu Chemii Organicznej PŁ. Czwarte oświadczenie pochodziło od pierwszej autorki wszystkich publikacji dr inż. Agnieszki Kowalskiej-Baron i brzmiało, że jej „*udział w publikacjach będących podstawą pracy doktorskiej mgr inż. Krystiana Gęsickiego, polegał na uzupełnieniu w jednej z publikacji obliczeniami kwantowo-mechanicznymi oraz widmami IR, udziale w interpretacji otrzymanych wyników i przygotowaniu publikacji*”.

Uzupełniona dokumentacja pozwoliła mi wyrobić sobie pogląd jaki był udział doktoranta w powstaniu cyklu publikacji przedłożonych jako element składowy dysertacji. Z bardzo szczegółowo wypełnionych oświadczeń doktoranta i pozostałych współautorów wynika, że udział doktoranta (szacowany na 63%) był decydujący w zakresie opracowania metodologii i wykonania eksperymentów, oraz przeważający w zakresie stawiania hipotez badawczych oraz interpretacji i dyskusji wyników. We wkładzie promotora pomocniczego (ocenianego na 20 do 27%) największą wagę miała aktywność przy przygotowywaniu publikacji oraz, w mniejszym stopniu, przy interpretacji i dyskusji wyników. Uczestnictwo promotora (wyszacowane na 13%) zaznaczyło się głównie w opracowaniu koncepcji projektu badawczego. W związku z powyższym uważam, że spełnione są warunki ustawowe, a mianowicie ustalony jest „*indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy [zbiorowej]*”.

W moim przekonaniu Krzysztof Gałęcki wykazał się wysokim kunsztem doświadczalnym, miał znaczący udział w stawianiu hipotez badawczych, interpretacji danych i wreszcie w przygotowaniu publikacji naukowych wchodzących w skład pracy doktorskiej. Przedstawiona praca spełnia warunki formalne i zwyczajowe stawiane dysertacjom. Dla tego z pełnym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego .

PRODZIEKAN

Prof. dr hab. Andrzej Kowalczyk