



WYDZIAŁ  
BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA



Uniwersytet  
ŁÓDZKI

UNIWERSYTET ŁÓDZKI

Katedra Biofizyki Ogólnej

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, Polska, tel. +48 42 635 44 74, fax +48 42 635 44 74

e-mail: [marbrys@biol.uni.lodz.pl](mailto:marbrys@biol.uni.lodz.pl)

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Krystiana Gałęckiego  
„Badanie mechanizmu fosforescencji tryptofanu w kontekście monitorowania struktury  
i dynamiki białek”**

Promotor pracy: prof. dr hab. Stanisław Wysocki  
Promotor pomocniczy: dr inż. Agnieszka Kowalska-Baron

Praca doktorska mgr inż. Krystiana Gałęckiego jest próbą powiązania parametrów uzyskiwanych metodą zaniku fosforescencji reszt tryptofanowych białek, takich jak czas życia fosforescencji i stałe szybkości procesów depopulacji stanów wzbudzonych, z elastycznością struktury białka. Fosforescencja białek pozwala na monitorowanie stosunkowo wolnych ruchów fragmentów tych biomolekuł, niemożliwych do badania innymi metodami i jest znakomitą uzupełnieniem metod fluorescencyjnych opisujących znacznie szybsze ruchy molekularne. Stosowanie metod fosforencyjnych do badania białek jest niełatwe z kilku powodów, w tym dosyć skomplikowanego przygotowania próbek oraz konieczności zastosowania unikatowej aparatury, posiadanej przez niewiele laboratoriów.

Mgr inż. Krystian Gałęcki zrealizował swoje zamierzenia badawcze dzieląc je na kilka etapów, przechodząc od badań stosunkowo prostych układów do układów coraz bardziej złożonych. Na pracę doktorską składa się cykl pięciu oryginalnych artykułów, opublikowanych w dobrym czasopiśmie z listy Journal Citation Reports – *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* o współczynniku oddziaływania IF=2.163. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w latach 2012 – 2014. Cykłowi pięciu publikacji towarzyszy krótki opis badań zawierający postawione sobie przez Doktoranta cele

badawcze oraz uzyskane wyniki. Do tego opracowania mam drobną uwagę krytyczną. Zawiera ono mianowicie liczne niedoskonałości językowe, w tym najczęściej „literówki”, które powinny być być usunięte podczas czytania maszynopisu.

Pierwszy etap badań, którego wyniki opisano w artykule „*Photophysics of indole, tryptophan and N-acetyl-L-tryptophanamide (NATA): Heavy atom effect*”, dotyczył wyznaczenia czasów życia fosforescencji, wydajności kwantowej i stałych szybkości przejścia międzysystemowego singlet-tryplet oraz stałych gaszenia wzbudzonych stanów singletowych i trypletowych przez ciężki atom wprowadzony do układu. Uzyskane wyniki, poza czasem życia fosforescencji, znacząco odbiegały od danych literaturowych, co zostało dogłębnie przedyskutowane przez Doktoranta w publikacji.

Kontynuacją tych badań była próba rozstrzygnięcia istniejących w literaturze wątpliwości, czy czas życia fosforescencji roztworów wodnych indolu i jego pochodnych zależy od temperatury i który z możliwych procesów jest za to odpowiedzialny. Teoretyczne tło swoich rozważań i konfrontację uzyskanych wyników z danymi literaturowymi Doktorant zawarł w drugiej pracy cyklu: „*Temperature study of indole, tryptophan and N-acetyl-L-tryptophanamide (NATA) triplet-state quenching by iodide in aqueous solution*”. Pokazał, że ze wzrostem temperatury następuje silna dezaktywacja stanów trypletowych pochodnych indolowych i zasugerował, że w zależności od tego, czy w układzie jest obecny - czy nie - ciężki atom (KI) - „wzmacniacz” przejścia międzysystemowego singlet-tryplet - mechanizm depopulacji trypletowych stanów wzbudzonych przebiega inaczej. Potwierdził też zależność czasu życia stanu trypletowego indolu od lepkości otaczającego środowiska, co ma kluczowe znaczenie dla zastosowania metody RTP do badania białek.

Kolejnym wyzwaniem podjętym przez Doktoranta było sprawdzenie wpływu podstawników w pierścieniu indolowym na właściwości fosforencyjne indolowego chromoforu. Do podjęcia tego zagadnienia sprowokował mgr inż. Gałęckiego brak danych literaturowych, jako że dotychczasowe badania dotyczyły wyłącznie wyjaśnienia wpływu podstawników na właściwości absorpcyjne i fluorescencyjne indolu. W tym celu Doktorant dokonał podstawienia grupy karboksylowej w pozycji 2 i 5 pierścienia indolu uzyskując dwie pochodne: kwas indolo-2-karboksylowy (I2C) i kwas indolo-5-karboksylowy (I5C). Następnie porównał m.in. właściwości fosforencyjne tych pochodnych z właściwościami związku macierzystego przeprowadzając bardzo szczegółową charakterystykę spektralną obu pochodnych badając kinetykę zaniku fosforescencji i fluorescencji, wpływ obecności ciężkiego atomu oraz wykonując widma ATR-FTIR. W ten sposób zbadał wpływ dokonanych podstawień na parametry fotofizyczne badanych związków mające kluczowe znaczenie dla procesu depopulacji trypletowych stanów wzbudzonych. Stwierdził, że

podstawienia nie miały wpływu na wydajność kwantową fosforescencji, ale w widmie wystąpiło przesunięcie maksimum w stronę fal dłuższych w stosunku do niemodyfikowanej cząsteczki indolu, co Doktorant tłumaczy możliwością tworzenia wiązań wodorowych między grupą C=O i grupą NH. Charakterystyka fotofizyczna badanych pochodnych indolowych w obecności ciężkiego atomu ( $I^-$ ) wykazała istnienie jednego zależnego od temperatury procesu powodującego dezaktywację trypletów na drodze bezpromienistej.

Czwarta praca opisuje właściwości fluorescencyjne i fosforencyjne jeszcze bardziej skomplikowanego układu, a mianowicie tryptofanu w otoczeniu reszt alaniny. Ala-Trp (dipeptyd) był pozyskany komercyjnie, zaś Trp-Ala oraz Ala-Trp-Ala (tripeptyd) zostały zsyntezowane w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej. Pozwoliło to na analizę wpływu reszt alaniny i wiązania peptydowego na właściwości fotofizyczne tryptofanu. Zbadano wpływ obecności reszt alaniny na wydajność kwantową i czas życia fosforescencji trypletów badanych peptydów i porównano je do wartości tych wielkości dla tryptofanu. Stwierdzono monoeksponencjalny zanik fosforescencji dla wszystkich badanych peptydów, co wskazuje na istnienie tylko jednej populacji stanów trypletowych chromoforu. Czas życia fosforescencji był najdłuższy dla peptydu Ala-Trp, najkrótszy dla Trp-Ala, a pośredni dla Trp i Ala-Trp-Ala, co wskazywało na zależność tego parametru od wewnętrznej struktury badanego peptydu i pozwoliło na oszacowanie sztywności bezpośredniego otoczenia tryptofanu. Wydajność kwantowa fosforescencji peptydu Ala-Trp-Ala była nieco niższa, a peptydu Ala-Trp dwukrotnie niższa niż tryptofanu. Maksimum widma fosforescencji było przesunięte w kierunku fal krótszych (Ala-Trp), a peptydu Trp-Ala w kierunku fal dłuższych. Peptyd Trp-Ala charakteryzował się największą wydajnością fosforescencji, co wskazywałoby na występowanie tego dipeptydu w formie anionowej w fizjologicznym pH.

Konsekwentnie, ostatnia praca dotyczyła badania najbardziej złożonych układów – białek posiadających jedną resztę tryptofanową, która dla różnych białek była ulokowana w różniących się stopniem dostępności regionach białka. Doktorant wybrał do badań całą gamę białek: azuryne, cyklofilinę A, fosfolipazę A<sub>2</sub>, rybonukleazę T<sub>1</sub>, albuminę ludzką (HSA), albuminę końską (ESA) i albuminę królika (RSA). Pozwoliło to na dokonanie analizy i udowodnienie związku pomiędzy czasem życia fosforescencji trypletów a ich lokalizacją w białku, strukturą drugorzędową tego obszaru oraz ich stopniem wyeksponowania do środowiska wodnego. Tym samym Doktorant potwierdził przydatność stosowania metody RTTP do badania struktury i dynamiki białek.

Podsumowując należy stwierdzić, że badania zostały bardzo logicznie zaplanowane i konsekwentnie zrealizowane, przez co stanowią zwarte i spójne rozwiązanie problemu naukowego opisane w pięciu publikacjach naukowych.

Biorąc pod uwagę ten cykl artykułów opublikowanych w recenzowanym czasopiśmie z listy JCR, uzyskane wyniki doświadczalne, sposób ich opracowania i przedyskutowania oraz oświadczenie Promotora o wysokim - 70% - wkładzie mgr inż. Krystiana Gałęckiego do tych publikacji uważam, że praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora. Zwracam się więc do Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej z wnioskiem o nadanie mgr inż. Krystianowi Gałęckiemu stopnia naukowego doktora i wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

**KIEROWNIK**  
**KATEDRY BIOFIZYKI OGÓLNEJ UE**  
*M. Bryszowska*  
**prof. zw. dr hab. Maria Bryszowska**