

Bydgoszcz 2015.03.16

Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Adama Pomorskiego pt. "Otrzymanie i charakterystyka barwników biarsenowych stosowanych do selektywnej modyfikacji białek" wykonanej w Pracowni Chemii Biologicznej Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem dr hab. Artura Krężła prof. U.Wr.

Przedstawiona rozprawa doktorska dotycząca syntezy i charakterystyki oraz aplikacji barwników biarsenowych została wykonana w grupie dr hab. Artura Krężła prof. U.Wr. specjalizującej się w badaniach z zakresu chemii biologicznej z użyciem metod fizykochemicznych.

Badania zjawisk jakie zachodzą w żywych komórkach wymagają znajomości lokalizacji poszczególnych białek w komórce, a także fluktuacji składu chemicznego (jakościowego i ilościowego) organelli komórkowych w stanie fizjologicznym i patologicznym. Do metod badawczych jakie są niezbędne w badaniach z zakresu biologii molekularnej należą m.in. *a)* nadprodukcja i izolacja białek, *b)* wizualizacja za pomocą wybarwiania, *c)* selektywne wybarwienie odpowiednimi substancjami wybranych białek komórkowych, *d)* przeprowadzenie selektywnych reakcji pozwalających na śledzenie zmian jakie w komórkach zachodzą w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Stąd badania te mają charakter interdyscyplinarny i wymagają wiedzy oraz doświadczenia osób z różnych dyscyplin.

Badania właściwości białek i ich funkcji są obecnie szybko rozwijającą się dziedziną badań nad składnikami materii żywej. W 1958 roku rozwiązano strukturę krystaliczną mioglobiny. Jednak, obecnie badania nie koncentrują się tylko nad strukturą makrocząsteczek lecz ich zmianami konformacyjnymi oraz oddziaływaniami z innymi białkami i ligandami. Pomimo, że arsenał metod badawczych jest znany i powszechnie stosowany każda z metod posiada pewne ograniczenia. Jedną z ciekawszych, a zarazem czułą techniką stosowaną w biologii molekularnej jest fluorescencja. Z uwagi na pewne ograniczenie również tej metody, które Autor opisuje w rozprawie we *wstępie* niezbędnym staje się poszukiwanie nowych barwników, które mogą być stosowane nie tylko do barwienia wybranych obiektów komórkowych, ale również do selektywnego łączenia cząsteczek barwnika z wybranym elementem strukturalnym badanego białka. Możliwe jest to do uzyskania przy zastosowaniu znakowania motywu czterocysteinowego barwnikami biarsenowymi, na którym Autor skupił się w swej pracy. Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe na temat selektywnego funkcjonalizowania białek tematyka rozprawy jest bardzo aktualna, a przedstawione wyniki już zostały zauważone - świadczą o tym cytowania opublikowanych prac.

Sam układ rozprawy jest klasyczny i składa się ze wstępu, jasno określonego celu pracy, opisu użytych materiałów, metod badawczych, wyników, ich dyskusji oraz spisu cytowanej literatury. Wstęp jest napisany kompetentnie i obejmuje m.in. bardzo podstawowe informacje leżące u podstaw metod badawczych (na przykład opis diagramu Jabłońskiego), krótką charakterystykę wybranych fluoroforów

organicznych oraz ich reaktywnych pochodnych, opis białek fluorescencyjnych oraz metod wprowadzania syntetycznych fluoroforów do znakowania białek. Następnie Autor opisuje dwupodstawione barwniki arsenowe oraz wyniki innych grup badawczych mówiące o łączeniu ich z motywem czterocysteinowym wraz z opisem metod ich syntezy. Tu pojawia się pierwszy błąd pojęciowy jaki Autor popełnia konsekwentnie w pracy (oprócz strony 57, 117, 118 i 151). Reakcja wprowadzenia rtęci (II) do związku fluorescencyjnego nie jest reakcją *przyłączenia* (strona 23) lecz *podstawienia elektrofilowego*. To samo tyczy się *przyłączenia krótkiego łańcucha alkilowego* (strona 67) i *przyłączenia 2,2'-dipikoliloaminy* (strona 68) - obie reakcje to *substytucja nukleofilowa*. Są to błędy często popełniane również przez studentów chemii. Dalszy opis barwników biarsenowych i ich aplikacji skupiony jest na: *a)* opisie różnych sekwencji aminokwasów w motywie czterocysteinowym oraz na optymalizacji odległości między parami cystein i jej wpływu na stosowalność odpowiednich barwników w badaniach, *b)* stosowaniu barwników biarsenowych w znakowaniu białek w komórkach zwierzęcych, bakteryjnych, drożdżowych, roślinnych czy wirusach, *c)* stosowaniu ich w badaniach zmian strukturalnych zachodzących w białkach (denaturacja, agregacja, zmiana konformacji). Wstęp zawiera również opis pomiarów pH za pomocą sond fluorescencyjnych, zastosowanie sond z możliwością odczytu przy dwóch długościach fali oraz rolę jonów cynku i metod jego oznaczania w komórce.

Cel pracy jest jasno określony, choć nieco odbiega (na korzyść) od samego tematu rozprawy. W części dotyczącej *materialów* Autor podaje rodzaje użytych związków, rozpuszczalników i materiałów pomocniczych z uwagą, że były one najwyższej możliwej czystości dostępnej w handlu (niestety bez podania tej czystości w treści pracy). Następnie wystarczająco szczegółowo opisano procedury syntezy samych związków fluoryzujących jak i ich modyfikacji rtęcią, transmetalacji oraz modyfikacji przy pomocy EDT. Na uwagę zasługuje sprawność z jaką Autor przeprowadził syntezy końcowych barwników pomimo, że ilości substratów użytych do reakcji były niewielkie (rzędu nawet poniżej 10 mg) - dowodzi to opanowania warsztatu syntetyka. To samo tyczy się opisów badań oddziaływań peptydów zawierających fragment czterocysteinowy z cząsteczką sensora dającą w wyniku reakcji kompleks fluorescencyjny. Ciekawym wynikiem jest zaobserwowanie konkurencyjności oddziaływania jonów cynku i barwnika biarsenowego. Jednak brak jest informacji na temat oddziaływania jonów cynku z czterema atomami siarki sondy fluorescencyjnej (pochodnej dichlorofluoresceiny - Cl₂FIAsh-EDT₂). Brak tego oddziaływania mógłby świadczyć bądź o efekcie sterycznym mostka etylenowego w barwniku lub o słabym kompleksowaniu jonów cynku i obojętnych atomów siarki. Co więcej byłoby to potwierdzeniem wniosku o konkurowaniu jonów cynku i barwnika o motyw czterocysteinowy, a nie unieczynnieniem barwnika z powodu związania z cynkiem. Nowe, otrzymane przez Autora, sondy zostały scharakteryzowane za pomocą spektrometrii mas oraz widm ¹H i ¹³C NMR tam, gdzie rozpuszczalność na to pozwoliła. Stabilność otrzymanych barwników została przebadana (dotychczas brak jest doniesień na ten temat). Brak jest w pracy badania ich stabilności lub kinetyki degradacji w zależności od pH środowiska w zakresie od 5 (lizosomy) do około 8,2 (mitochondria), jak wymienia Autor. Na stronie 142 Autor krytycznie odnosi się do przypuszczenia mówiącego o hamującym wpływie wiązań halogenowych na aktywność białkowych fosfataz tyrozynowych. I tak, jak zauważa Autor, *a)* odległość ponad 10Å jest zbyt duża na tego typu

oddziaływanie oraz b) atomy fluoru niezwykle rzadko wchodzą interakcje, które można nazwać *wiązaniem halogenowymi*. Dalszy komentarz o zwiększeniu kwasowości atomów arsenu przy obecności elektronoakceptorów jak chlor czy fluor jest bardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem mechanizmu. Potwierdzić to można syntezując odpowiednio podstawione związki, w których właściwości podstawnika będą się zmieniać systematycznie. Wymaga to jednak osobnego przestudiowania literatury. Zacytowana w pracy literatura odnosząca się do badań Autora jest bardzo aktualna co dowodzi, że mgr Adam Pomorski zaznajomiony jest z najnowszymi wynikami.

Nieliczne błędy jakie zauważyłem wymieniam poniżej. Nie wpływają one jednak na wartość merytoryczną rozprawy.

1. Strona 8 - błędnie jest opisane zjawisko absorpcji kwantu promieniowania - zamiast słowa *tranzycja* (ta dotyczy zastąpienia nukleotydu w cząsteczce DNA) należało użyć *pobudzenie elektronowe* lub *wzbudzenie*.
2. Strona 10 - Autor wymienia warunki, które powinien spełniać barwnik, aby mógł być użyteczny w badaniach. Do warunków tych należą: wysoka wydajność kwantowa fluorescencji, wysoki molowy współczynnik absorpcji oraz wartość przesunięcia Stokes'a. Ta ostatnia powinna wynosić co najmniej 10nm. Jednak z danych zamieszczonych w Tabeli 1 przesunięcie Stokes'a dla tryptofanu posiada wartość 2nm, a mimo to Autor twierdzi, że tryptofan posiada *najlepsze właściwości fluorescencyjne*. Niespójność tych dwóch twierdzeń wynika z faktu, że maksimum fluorescencji dla tryptofanu zostało podane błędnie. W zależności od warunków i źródła maksimum fluorescencji tryptofanu przypada na zakres 348 do 355 (bufor o pH=7) nm. Autor nie podaje źródła przytoczonych danych.
3. Strona 14, Rycina 3 - wzór maleimidu jest błędny. Przedstawiony związek jest diolem, a nie imidem.
4. Strona 67 - Schemat przedstawia m.in. reakcję nr 5, gdzie użytym był 1,2-dijodoetan podczas, gdy produkt zawiera brom, zaś sam 1,2-dijodoetan jest zapisany nieprawidłowo.
5. Strona 94, Tabela 4. - nie ma większego sensu podawanie przesunięć chemicznych ¹³C z dokładnością do setnych.
6. Strona 127 - czy synteza sensora ZnAFIAsH-1F-EDT₂ była monitorowana za pomocą chromatografii cienkowarstwowej? Jest to łatwiejsza metoda aniżeli zastosowana spektrometria mas.
7. Pomyłki językowe/skróty myślowe:
 - Strona 27: fragment *Barwniki biarsenowe zbudowane na bazie 5-karboksyfluoresceiny lub 5-aminofluoresceiny są świetnymi podstawami, do których można przylączyć inne związki chemiczne*. Moim zdaniem świetne podstawy do prowadzenia badań w dyscyplinie chemii biologicznej zdobył doktorant pod kierownictwem dr hab. Artura Krężła. W cytowanym zdaniu znacznie lepiej byłoby powiedzieć, że cząsteczka fluoresceiny jest *łatwa do modyfikacji*.

- Strona 43: Cytowany poniżej fragment jest nieco mylący dla osoby, która nie zna podstaw zjawiska FRET.

Jedną z głównych zalet barwników biarsenowych jest ich mały rozmiar, a także specyficzność miejsca wiązania. Z tego względu znalazły one zastosowanie w badaniach bazujących na efekcie FRET.

Sugeruje on, że wielkość cząsteczki jest jednym z kryteriów wystąpienia FRET. Podstawowymi warunkami wspomnianego zjawiska są odległość między donorem i akceptorem FRET oraz nakładanie się widma fluorescencji donora z widmem absorpcji akceptora.

- Strona 63: *odparowano do gęstego oleju* - powinno być *do otrzymania gęstego oleju*.
- Strona 63: *gęstego oleju, z którego po kilku godzinach w 4°C wytrącał się osad* - czy olej krzepł czy faktycznie był to osad, jeśli osad to jak go odsączono skoro mowa była o gęstym oleju? Dla osoby, która chciałaby powtórzyć syntezy może się okazać cenną informacją.
- Strona 74: *do rozdziału wykorzystywano gradient acetonitrylu od 0 do 90% w 20 minutach w 5mM węglanie amonu* - nie podano w jakim rozpuszczalniku był rozpuszczony węglan amonu - zakładam, że w wodzie?
- Strona 74: jonizacja *elektrosprejem* powinna być zastąpiona *elektrozpylaniem*.
- Strona 92: rozdzielanie i oczyszczanie odbywało się nie techniką *FLASH* lecz przy pomocy *preparatywnej chromatografii kolumnowej*.
- Strona 94: przy opisie widm NMR należy podawać przez ile wiązań obserwowane jest sprzężenie spinowo-spinowe - poprawny zapis dla wartości sprzężeń wycylnych podanych w pracy to $^3J_{HH} = \text{wartość Hz}$.

8. Błędy w cytowanej literaturze:

- Strona 18 [Halo, 2008] powinno być [Halo, 2009]
- Strona 21 w spisie literatury nie znalazłem pozycji [Kalefi i Gitler, 1994]
- Strona 155 w pozycji Keppler *et al.* błędnie podano rok 2003 (poprawny rok to 2002)
- Strona 162 - praca Zhang z 2012 roku jest podana w spisie literatury dwukrotnie

Pozostałe drobne i nieliczne pomyłki nie są warte tego, aby poświęcać im więcej uwagi.

Po przeczytaniu całości rozprawy nasuwają się następujące pytania:

1. Dlaczego dla związków, których rozpuszczalność w deuterowanych rozpuszczalnikach była niewielka nie przeprowadzono prób rejestrowania widm CP MAS NMR?
2. Czy Autor podjął próby wyznaczenia oddziaływania dwuarsenowych sond z jonami cynku?
3. Czy w związku z powyższym można wykluczyć unieczynnienie sondy na wiązanie się z motywem czterocysteinowym z powodu niekwalencyjnego wiązania jonów cynku

z atomami siarki sondy czy też dominującym jest konkurencyjność obu (jonów cynku i sondy) o motyw czterocysteinowy?

4. Na stronie 65 Autor przedstawił syntezę pochodnej aminofluoresceiny (produkt pośredni syntezy sensorów ZnAF-F). Czy rozważano możliwość otrzymania symetrycznej sondy bazującej na tej fluoresceinie? Manipulując długością dwufunkcyjnego mostka łączącego grupy aminowe można w dość łatwy sposób otrzymać sondy zdolne do łączenia z dwoma motywami czterocysteinowymi jednocześnie.
5. Czy były podejmowane próby dwufotonowego wzbudzenia fluorescencji otrzymywanych barwników skoro wzmianki na temat absorpcji dwufotonowej pojawiły się we wstępie pracy?

Na uwagę zasługuje fakt, że Autor rozprawy uczestniczył w trzech projektach badawczych z czego jednego był kierownikiem. Świadczy to o Jego dynamice, ale też o zespole w którym pracuje. Należy zauważyć, że Autor śmiało podejmuje badania nie tylko na polu, na którym jest najbardziej kompetentny, ale poszerza zakres swoich umiejętności na dyscypliny takie jak synteza organiczna. Gdyby nie fakt, że magister Adam Pomorski opublikował artykuł przeglądowy to, biorąc za podstawę treść wstępu, sugerowałbym opublikowanie takiej pracy.

Biorąc pod uwagę różną skalę (od cząsteczki do komórki) i różne obszary badań (od chemii do biologii) oraz znajomość odpowiednich technik od hodowli komórek po syntezę odpowiednich barwników fluorescencyjnych widać, że Autor jest ukształtowanym naukowcem. Aż prosi się, aby umiejętności Autora wykorzystać w dalszych badaniach i połączyć efekty związane z przeniesieniem ładunku w stanie wzbudzonym, wiązaniem odpowiednich kationów i znakowaniem białek w sposób jaki zaprezentowano w pracy. Uważam, że mgr Adam Pomorski wykonał badania, które wnoszą istotny wkład w rozwój nowych sond do zastosowań w biologii molekularnej udowadniając przy tym ich przydatność.

Stwierdzam, że omawiana rozprawa doktorska spełnia wymagania „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym...” z dnia 18 marca 2011 r i wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie rozprawy mgr Adama Pomorskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego wnosząc jednocześnie o jej wyróżnienie.

