

Lublin, 12 stycznia 2015 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki  
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
w Lublinie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Walczewskiej-Szewc pt. „Interpreting resonance energy transfer experiments with Monte-Carlo and molecular dynamics simulations”**

Bezpromienisty transfer energii wzbudzenia elektronowego jest, w moim odczuciu, zjawiskiem wyjątkowym, zarówno w aspekcie zainteresowania jaki budzi nieprzerwanie, od wielu już dekad, w gronie fizyków jak i pojawiających się możliwości praktycznych zastosowań w precyzyjnych badaniach układów molekularnych. Zastosowania te związane są z możliwością określenia odległości cząsteczek wymieniających energię wzbudzenia, w oparciu o analizę wydajności tego procesu. Proces ten określany jest hasłowo jako „linijka molekularna” i opiera się na foersterowskim rezonansowym transferze energii (FRET). Stosowanie metodologii opartej na FRET w badaniach molekularnych łączy się jednakże z wieloma ograniczeniami oraz założeniami, z których często nie zdajemy sobie sprawy, powielając utrwalone, najbardziej popularne procedury. Wśród ograniczeń tych, ważne miejsce zajmuje wzajemna orientacja, a w szczególności fluktuacje przestrzenne dipolowych momentów przejścia, oddziałujących chromoforów. Szczegółowej analizie tego, oraz podobnych problemów, w eksperymentach opierających się rezonansowym przekazywaniu energii wzbudzenia elektronowego, poświęcona została przedkładana do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Walczewskiej-Szewc.

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki  
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1  
20-031 Lublin  
tel. (81) 537 62 50  
fax (81) 537 61 91  
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



Praca ta wprowadza również bardzo ważny, w moim mniemaniu, wymiar „statystyczny” procesów związanych z FRET, w których zjawiska przekazywania energii zachodzą pomiędzy zespołami cząsteczek. Zaryzykuję stwierdzenie, iż badania obliczeniowe, tego typu które przedstawione zostały w rozprawie doktorskiej, stanowią najbardziej obiecującą ścieżkę prowadzącą do pełnego zrozumienia tych właśnie zjawisk, istotnych nie tylko w projektowaniu układów molekularnych o zwiększonym zasięgu transferu energii wzbudzenia elektronowego ale, przede wszystkim, do pełnego zrozumienia systemów stosujących tego typu procesy w organizmach żywych. Jednym z przykładów z obszaru obiektów biologicznych, może być aparat fotosyntetyczny, w którym dalekozasięgowy przekaz energii wzbudzenia elektronowego stanowi absolutną podstawę funkcjonowania. W świetle tego, przeprowadzonego przeze mnie pokrótce rozeznania, postrzegam rozprawę doktorską Pani mgr Katarzyny Walczewskiej-Szewc jako niezwykle interesującą i aktualną.

Wyniki prezentowane w rozprawie uzyskane były w ramach pracy Doktorantki w dwóch znakomitych ośrodkach naukowych cieszących się wysoką renomą w tym obszarze badawczym: częściowo w Zakładzie Spektroskopii Molekularnej Instytutu Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem prof. dr. hab. Piotra Bojarskiego, oraz częściowo w Research School of Biology, Australian National University, pod kierunkiem dr. Bena Corry'ego.

Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Walczewskiej-Szewc zredagowana została w języku angielskim, w formie zbioru trzech oryginalnych prac ogłoszonych w czasopiśmie specjalistycznych (tzw. zsywki), opatrzonej obszernym wstępem oraz komentarzem, zawierającym również niepublikowane jeszcze w innej formie wyniki badań. Jak wynika z oświadczenia Autorki zamieszczonego we wstępnej części rozprawy (Statement of Contribution, str. vii) oraz z załączonych oświadczeń współautorów, udział Doktorantki w uzyskaniu wyników, które przedstawiane są jako rdzeń rozprawy doktorskiej, był zasadniczy, określony na poziomie 90%. Nie dziwi więc fakt, iż mgr Walczewska-Szewc jest pierwszym autorem w opublikowanych już pracach. Praca zredagowana została, w moim odczuciu, w sposób bardzo elegancki. Po spisie treści (Contents) prezentowany jest wykaz tabel (List of Tables) oraz wykaz rysunków (List of Figures). Trzy pierwsze rozdziały poświęcone zostały



wprowadzeniu do tematyki rezonansowego transferu energii wzbudzenia elektronowego i teorii Förstera (1), symulacji Monte Carlo (2) oraz obliczeń w ramach dynamiki molekularnej (3). W mojej ocenie, wprowadzenia te prezentują istotną wartość dydaktyczną i polecane być mogą studentom oraz adeptom badań naukowych, szczególnie w pokrewnych obszarach tematycznych. Krótki rozdział zatytułowany „Introduction to Computational Results” (4), stanowi, *de facto*, sformułowanie zasadniczych celów rozprawy, chociaż zredagowany jest w formie zapowiedzi oczekiwanych rezultatów. Właściwa prezentacja oryginalnych wyników badań naukowych Doktorantki ma miejsce na stronach rozdziałów 5-9, z których każdy poświęcony jest odmiennemu, zaadresowanemu w badaniach symulacyjnych, wyzwaniu badawczemu. W swoich badaniach Pani mgr Katarzyna Walczewska-Szewc stosowała zasadniczo dwa podejścia metodologiczne, symulacje Monte Carlo oraz symulacje w ramach dynamiki molekularnej. Te dwa podejścia metodologiczne odpowiadają geograficznie dwóm laboratoriom, w których afiliowana była Autorka, jednak, przede wszystkim, odpowiadają bardzo dobrze charakterowi stawianych pytań o charakterze poznawczych. Wyniki prezentowane w ramach rozdziału 5., opublikowane już w *J. Molecular Modeling*, wskazują na znaczenie wielu cząsteczek akceptorów w zwiększeniu limitu dalekozasięgowego transferu energii wzbudzenia. Wyniki przedstawione w rozdziale 6., wskazują w jakich warunkach obecność powierzchni metalicznych wpływa na zasięg oraz wydajność procesu przekazywania wzbudzeń. Wyniki prezentowane w rozdziale 7., które ukazały się już w czasopiśmie *Phys. Chem. Chem. Phys.*, wskazują na wagę fluktuacji odległości oraz orientacji cząsteczek donora i akceptora, związanych z dyfuzją, w prawidłowym opisie oraz zrozumieniu procesu transferu wzbudzenia. W ramach rozdziału 8. Testowane były porównawczo, alternatywne procedury dynamiki molekularnej, związane z optymalizacją symulacji w oparciu o tzw. „Enhanced Sampling”. Badania symulacyjne przeprowadzono na interesującym i eleganckim zarazem modelu, opartym na szkielecie molekularnym złożonym z 20 cząsteczek aminokwasu proliny, którego końce sfunkcjonalizowane zostały cząsteczkami barwników Alexa AF488 i AF594, grających rolę donora i akceptora energii. Ten rozdział okazał się dla mnie najtrudniejszy do zrozumienia, chociaż mam nadzieję, że byłam w stanie najwięcej się z niego nauczyć. W rozdziale 9., prezentowane są wyniki opublikowane już w czasopiśmie *Phys. Chem. Chem. Phys.*, dotyczące zalet znacznych-rozmiarów fluoroforów wielopierścieniowych (tzw. barwników



bifunkcjonalnych) w badaniach procesów międzycząsteczkowego transferu energii wzbudzenia elektronowego. Podzielałam zdanie Doktorantki co do wyjątkowości tych barwników oraz ich potencjalnego znaczenia. W pełni zgadzam się również z określeniem najważniejszych osiągnięć rozprawy, wyartykułowanych w ramach rozdziału 10., Conclusions. Osobiście, wśród wyników tych chciałbym podkreślić te związane bezpośrednio ze zwiększeniem limitu transferu energii w układach z wieloma akceptorami, podanie precyzyjnych zależności parametrów związanych z wydajnością wymiany energii w sąsiedztwie powierzchni metalicznych oraz wykazanie konieczności uwzględniania dyfuzji (postępowej oraz fluktuacji orientacji) fluoroforów w opisie transferu energii. Myślę również, iż badacze stosujący podejście dynamiki molekularnej docenią ogromny postęp w opisie procesu FRET, jaki stał się rezultatem opisanych w rozprawie prac. Niektóre opracowane procedury udostępnione zostały już przez Autorów, całemu środowisku, pod adresem internetowym.

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Walczewskiej-Szewc jest również opracowaniem bardzo starannym, w aspekcie edycyjnym. Mógłbym zarekomendować Autorce nieliczne, po części może dyskusyjne, korekty. Oto ich krótka lista:

1. Str. 5, 6 wiersz od góry, w miejsce „is the donor’s quantum yield” proponuję „is the donor’s fluorescence quantum yield”.
2. Str. 5, wiersz 11, przy objaśnieniu  $f_D(v)$  proponuję dodatkową informację, że widmo normalizowane było polem pod krzywą nie zaś intensywnością w maksimum.
3. Str. 5, wzór 1.8, proponuję zamianę „N” na „N<sub>A</sub>”, zgodnie z konwencją przyjętą powyżej.
4. Str. 9, przy definicji wartości średniej czasów życia (wzór 1.14), dodać można, iż jest to uśrednianie „po amplitudach” w odróżnieniu do uśredniania „po intensywnościach”.
5. Str. 22, 4 wiersz od dołu, moim zdaniem, w miejscu „P<sub>i+1</sub>” powinno być „P(x<sub>i+1</sub>)”.
6. Str. 37, wzór 3.7, czynnik  $3/2\kappa^2$  w mianowniku, powinien być zastąpiony przez  $2/3\kappa^2$ .



Tak wieloaspektowe i zaawansowane zarazem opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską Pani mgr Katarzyny Walczewskiej-Szewc, pobudza ciekawość poznawczą, czego wyrazem może być sformułowanie następujących problemów:

1. Fotosyntetyczne kompleksy barwnikowo-białkowe, zarówno te pełniące funkcję anten, odpowiedzialne za zbieranie wzbudzeń elektronowych oraz przesyłanie ich do centrów reakcji, jak i same kompleksy rdzeniowe centrów fotosyntetycznych, zawierają wiele cząsteczek chlorofilu, mogących potencjalnie brać udział w dalekozasięgowym mechanizmie transferu energii wzbudzenia elektronowego. Czy możliwe jest, że wzajemna lokalizacja i orientacja grup barwników w aparacie fotosyntetycznym jest właśnie realizacją, testowanego w rozprawie mechanizmu zwiększania zasięgu przekazywania energii? Ciekaw jestem jakie jest zdanie Doktorantki na ten temat.
2. W pełni podzielam zdanie Doktorantki co do wyjątkowości barwników bifunkcyjnych, w aspekcie badania transferu energii wzbudzenia elektronowego. Rysunek (Fig. B1) zamieszczony w Supplementary Information do pracy, która ukazała się jako ostatnia w *Phys. Chem. Chem. Phys.*, w 2014 r., pokazuje antycypowaną orientację dipolowego momentu przejścia klasy barwników rozaminowych. W pełni zgadzam się, iż taka orientacja w stosunku do chromoforu cząsteczki barwnika wydaje się bardzo prawdopodobna. Z drugiej jednak strony, fakt, iż układ podwójnych wiązań sprzężonych wkracza w czwarty, odosobniony pierścień, a nawet w przypadku barwników przedstawionych jako Fig. 1a oraz Fig. 1b oryginalnej publikacji (str. 18950), obejmuje również grupę karbonylową, zachęca do przeanalizowania wariantu odmiennej orientacji dipolowego momentu przejścia bądź obecności innego, dodatkowego przejścia elektronowego. Ciekaw jestem opinii Doktorantki dotyczącej tego problemu.



Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż Pani mgr Katarzyna Walczewska-Szewc przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opartą na licznych oraz ważnych wynikach przeprowadzonych przez siebie badań naukowych. Badań, wymagających od eksperymentatora dużej wiedzy z zakresu fotofizyki oraz ogromnego doświadczenia w obszarze symulacji komputerowych, zarówno w ramach podejścia Monte Carlo jak i dynamiki molekularnej. Zarówno te, już opublikowane, jak i oczekujące na publikację wyniki oryginalnych badań naukowych, które stały się podstawą doktoratu, są w moim odczuciu wysoce nowatorskie oraz bardzo istotne. Te cechy analizowanej rozprawy, czynią ją, w mojej opinii szczególnie wartościową i, z pewnością, wyróżniającą. Gratulując Doktorantce oraz Promotorowi tak dobrych rezultatów, uprzejmie proszę Wysoką Radę o przyjęcie mojej rekomendacji oraz stawiam wniosek o dopuszczenie Panią mgr Katarzynę Walczewską-Szewc do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki