

Prof. dr hab. Krzysztof Bobrowski
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
Dorodna 16, 03-195 Warszawa



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. KAMILA JAKUBA FRĄCKOWIAKA
„From amino acids to protein – study of the effect of amino acid photo-oxidation
on the model protein”**

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Bronisław Marciniak
Promotor pomocniczy: dr Marta Teresa Ignasiak-Kciuk

Olbrzymi postęp, jaki ma miejsce w ostatnich kilkunastu latach i który ciągle dokonuje się na naszych oczach w poznaniu indukowanych fotochemicznie procesów utleniania w układach białkowych, zarówno *in vitro* jak *in vivo*, i zachodzących z udziałem rodników wymaga kompleksowego spojrzenia związanego nie tylko z prawidłową identyfikacją końcowych produktów utleniania zarówno od strony jakościowej jak i ilościowej, ale również z koniecznością rozwoju wiedzy dotyczącej między innymi kinetyki i mechanizmów reakcji w których biorą udział produkty przejściowe tych reakcji. Stanowi to poważne wyzwanie dla chemików, biochemików, biofizyków, biologów, medyków oraz farmaceutów zajmujących się w/w zagadnieniami.

Foto-indukowane utlenianie białek, które prowadzi do ich uszkodzeń zachodzi zasadniczo na dwóch głównych drogach: pierwsza z nich jest inicjowana głównie przez promieniowanie UVB (w mniejszym stopniu przez UVA) poprzez jego absorpcję przez określone reszty aminokwasowe (m.in. tryptofan, tyrozynę, fenyloalaninę, histydynę) i prowadząca do powstawania ich stanów elektronowo wzbudzonych lub do ich fotojonizacji, z kolei druga z nich poprzez absorpcję światła UV i/lub widzialnego przez związki sensybilizujące. Związki sensybilizujące tzw. sensybilizatory, mogą mieć charakter zarówno endogenny (np. porfiryny, witaminy takie jak ryboflawina, oraz pochodne pteryny) jak i egzogenny (np. leki w postaci związków poliaromatycznych lub barwników, stosowane w fotodynamicznej fototerapii). Sensybilizatory są zazwyczaj wzbudzane do krótkożyłowego wzbudzonego stanu singletowego, który w wyniku przejścia międzysystemowego prowadzi do dłużej żyjącego wzbudzonego stanu trypletowego. Stan trypletowy może ulec procesom prowadzącym do stanu podstawowego, albo reagować z cząsteczką białkową na dwóch drogach znanych jako procesu typu I oraz typu II, które mogą skutkować ich uszkodzeniem. Proces typu I prowadzi do utworzenia rodników zarówno na cząsteczce białkowej jak i sensybilizatora w wyniku przeniesienia elektronu albo oderwania wodoru od określonych aminokwasów w cząsteczce białkowej, które w obecności tlenu mogą ulegać konwersji m.in. do rodników nadtlenkowych. Z kolei proces typu II obejmuje przeniesienie energii ze wzbudzonej cząsteczki sensybilizatora do obecnego w układzie tlenu cząsteczkowego ($^3\text{O}_2$) co prowadzi do powstania wzbudzonego stanu tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$), który dość łatwo utlenia określone aminokwasy (m.in. tryptofan, histydynę i metioninę).

Nie jest więc zaskoczeniem, że kluczowym parametrem mającym istotny wpływ na charakter powstających produktów foto-utleniania jest obecność tlenu, który w istotny sposób może wpływać na kinetykę zaniku poszczególnych rodników i w konsekwencji na mechanizm reakcji rodnikowych prowadzących do degradacji cząsteczek białkowych. To ma istotne znaczenie biologiczne, ponieważ szybkość tych reakcji znacząco ogranicza inne możliwe reakcje, które mogłyby zachodzić w warunkach hipoksji, która wbrew pozorom jest zjawiskiem dość powszechnym. Endogenne poziomy O_2 mieszczą się zwykle w zakresie od 3 do 70 mikromoli w zależności od rodzaju tkanki ludzkiej, a poziomy te mogą być jeszcze niższe w sytuacjach, w których zapotrzebowanie na tlen jest duże (np. wysokie wskaźniki metaboliczne) lub przepływ płynów ustrojowych (głównie krwi) jest słaby (np. w rdzeniu wielu nowotworów litych). W przeciwieństwie do fotosensybilizowanych procesów utleniania białek w warunkach obecności tlenu, fotosensybilizowane procesy utleniania zachodzące w jego nieobecności cieszyły się mniejszym zainteresowaniem. Z tego powodu istnieje więc konieczność dalszego rozwoju wiedzy związanej z mechanizmami fotosensybilizowanego utleniania białek w warunkach beztlenowych.

Ogólna ocena rozprawy. W te trudne do zaprzeczenia fakty bardzo dobrze wpisuje się rozprawa doktorska mgr. Kamila Frąckowiaka, która została wykonana w Zakładzie Chemii Fizycznej i Fotochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr. hab. Bronisława Marciniaka oraz przy istotnej pomocy dr Marty Ignasiak-Kciuk pełniącej rolę promotora pomocniczego. Zakres rozprawy wiąże się ściśle z tematyką badań, które od kilku lat są przedmiotem zainteresowań członków grupy badawczej kierowanej przez prof. Bronisława Marciniaka, w której doktorant przygotowywał swoją rozprawę, a ogólnie związanych z poznaniem mechanizmów inicjowanych fotochemicznie reakcji zachodzących w układach białkowych. Rozprawa mgr. Kamila Frąckowiaka stanowi bardzo udaną kontynuację w/w tematyki i dostarcza nowych informacji związanych z mechanizmami reakcji inicjowanych fotochemicznie w warunkach beztlenowych, w wybranych modelowych peptydach zawierających aromatyczne aminokwasy (tryptofan, tyrozynę, fenyloalaninę i histydynę) oraz w dehydrogenazie aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), białku zawierającym reszty wspomnianych wcześniej aminokwasów.

Tematyka rozprawy jest bardzo aktualna, nowoczesna i o dużym aspekcie poznawczym co znalazło już potwierdzenie w opublikowanych wynikach fragmentów rozprawy w czasopismach z bazy *Journal Citation Reports* o wysokich współczynnikach oddziaływania jeśli chodzi o czasopisma chemiczne. I tak, fragmenty rozprawy dotyczące sensybilizowanego 3-karboksybenzofenonem fotoutleniania histydyny i jej pochodnych w warunkach beztlenowych zostały zawarte w artykule opublikowanym w czasopiśmie *Free Radical Biology and Medicine* (2024) (IF = 7.1 za rok 2023/2024), gdzie doktorant był pierwszym autorem (przy współdziale 9 autorów, w tym promotora oraz promotora pomocniczego rozprawy). Z kolei w drugim artykule opublikowanym w czasopiśmie *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry* (2025) (IF = 4.1 za rok 2023/2024) znalazły się fragmenty rozprawy związane z wpływem grup blokujących na sensybilizowane 3-karboksybenzofenonem fotoutlenianie tyrozyny i jej pochodnych w warunkach beztlenowych. Ponownie, doktorant była wymieniony jako pierwszy ze współautorów (przy współdziale 4 autorów, w tym ponownie promotora i promotora pomocniczego rozprawy), Świadczy to wyraźnie, że wyniki uzyskane przez doktoranta w

trakcie realizacji rozprawy doktorskiej stanowiły również istotny wkład w zawartość merytoryczną wspomnianych wyżej publikacji.

Zanim przejdę do szczegółowej oceny rozprawy chcę w tym miejscu podkreślić, że doktorant przygotował swoją rozprawę w języku angielskim, co osobiście oceniam bardzo pozytywnie. Wszystkie wyniki rozprawy są przez to dostępne dużo wcześniej dla całego środowiska naukowego zainteresowanego tymi zagadnieniami, a nie tylko dla środowiska naukowego posługującego się językiem polskim. Przypuszczam też, że kolejne fragmenty rozprawy doktorskiej zostaną w najbliższym czasie również opublikowane w wartościowych czasopiśmie naukowych.

Układ rozprawy jest w zasadzie typowy dla tego typu opracowań, jest przejrzysty, a prezentacja wyników oraz ich dyskusja przedstawiona w sposób jasny, konsekwentny i logiczny. Jest to jej kolejną zaletą biorąc pod uwagę bogaty i wartościowy materiał doświadczalny zgromadzony przez doktoranta. Mam tylko spore zastrzeżenia dotyczące rozdziału „**I. Introduction and the aim of the work**”. Wrócę do tego zagadnienia później przy omawianiu tego rozdziału w szczegółowej ocenie rozprawy.

Rozprawa została podzielona na 6 zasadniczych rozdziałów przedstawionych na 200 stronach, zawierających 55 rysunków, 15 tabel i 7 równań oraz 178 pozycji literaturowych. Bardzo pomocne przy czytaniu rozprawy były również wspomniane wyżej dwie oryginalne publikacje współautorstwa doktoranta, które pozwoliły ocenić wkład merytoryczny rozprawy doktoranta w ich powstanie. Dobrym posunięciem doktoranta było wprowadzenie rozdziału „**VI Supplementary Information**” w którym zamieścił uzupełniające wyniki badań, dla pochodnych badanych aminokwasów i białka modelowego, w postaci tabel i rysunków, które już nie wymagały rozbudowanego komentarza słownego, a stanowiły tylko ilustrację przeprowadzonych eksperymentów, i do których są odpowiednie odnośniki w tekście rozprawy. Rozdział ten zawiera 103 rysunki i 4 tabele.

W realizacji postawionych celów pracy mgr Kamil Frąckowiak wykorzystał różnorodne techniki pomiarowe i tak w części związanej z badaniami spektralnymi i kinetycznymi produktów przejściowych spektroskopią czasowo-rozdzielczą w postaci nanosekundowej laserowej fotolizy błyskowej, do generacji stałych produktów fotolizy fotolizę stacjonarną a do ich analizy wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) oraz spektrometrię masową z wykorzystaniem metody elektrorozpylania (ESI-MS), ruchliwości jonów spułapkowanych (TIMS-MS) oraz czasu przelotu (TOF-MS), klasyczną spektroskopię UV-vis, a w części związanej z identyfikacją produktów stałych powstałych w wyniku fotolizy GAPDH elektroforez w żelu poliakrylamidowym, wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (HPLC-MS), a ponadto analizę aminokwasową, tzw. próbę Ellmana oraz test aktywności GAPDH. Świadczy to o wszechstronnym i bardzo dobrym przygotowaniu doktoranta od strony eksperymentalnej i o jego dobrym rozeznaniu w możliwościach poszczególnych technik eksperymentalnych, co z dużym powodzeniem wykorzystał w swoich badaniach.

Szczegółowa ocena rozprawy. Rozprawę otwiera rozdział „**Introduction and the aim of the work**”, w którym mgr Kamil Frąckowiak wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z fotoutlenianiem aminokwasów na wspomnianych na wstępie recenzji dwóch drogach, zarówno w warunkach obecności jak i nieobecności tlenu jak również utleniania samego białka GAPDH, głównie przez reaktywne formy tlenu (ROS). Mam do doktoranta kilka pytań i uwag krytycznych związanych z tym rozdziałem: (i) skoro doktorant zajmował

się wyłącznie badaniami związanymi z fotosensybilizowanym utlenianiem aminokwasów w warunkach beztlenowych, to dlaczego poświęca tyle miejsca zagadnieniom związanym z utlenianiem przez ROS i RNS: tekst na str.19 wraz z Tabelą I.1; oraz Tabela I.2 (str.23) zawierająca stałe szybkości aminokwasów z tlenem singletowym (1O_2), który w układach badanych przez doktoranta w ogóle nie powstaje? Czy nie lepiej byłoby zebrać w Tabeli stałe szybkości wzbudzonych stanów trypletowych wybranych związków z aminokwasami i białkami np. wzbudzonego stanu trypletowego benzofenonu z aminokwasami (*vide: J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 1984, 80, 1107*) z lizozymem (*vide: Photochem. Photobiol. 1989, 49, 557*) lub wzbudzonego stanu trypletowego szeregu furokumaryn (*vide: Photochem. Photobiol. 1978, 27, 273*), ryboflawin (*vide: J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 6602; J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 8049*), difloksacyny (*vide: Acta Phys.-Chim. Sin. 2017, 33, 1051*), ketoprofenu (*vide: J. Phys. Chem. B 2007, 111, 8277*) z aminokwasami i białkami i je omówić, a w szczególności porównać je ze stałymi szybkości z tlenem? Pozwoliłoby to na oszacowanie jak w warunkach różnych stężeń tlenu w organizmie ludzkim jest możliwy udział reakcji typu II i udział 1O_2 w reakcjach wtórnych. Niestety, żadna z tych wymienionych prac nie znalazła się w rozdziale **References.(ii)** na Rys. I.2 przedstawiona jest struktura białka GAPDH wraz z zaznaczonymi aminokwasami szczególnie podatnymi na foto-indukowane utlenianie, cztery z nich to aminokwasy aromatyczne, które są obiektem badań doktoranta a dwa to aminokwasy zawierające w swojej strukturze atom siarki. Nigdzie nie znalazłem komentarza/wyjaśnienia, dlaczego doktorant ograniczył swoje badania tylko do aminokwasów aromatycznych, czy wynika to z faktu, że wcześniejsze wyniki uzyskane przez różne grupy badawcze dla sensybilizowanego utleniania tych aminokwasów oraz zawierających je wybranych peptydów w obecności 4CB/3-CB w warunkach beztlenowych były wystarczające dla interpretacji wyników uzyskanych dla białka GAPDH? Jeśli tak, wyjaśnia to dlaczego doktorant tak szczegółowo omawia procesy ich sensybilizowanego utleniania w obecności 4CB/3-CB w warunkach beztlenowych prowadzące do produktów przejściowych jak i końcowych, pomimo faktu, że to aminokwasy aromatyczne były przedmiotem badań doktoranta. **(iii)** Informacja na str. 29 „*There is a competition between Type I and Type II photo-oxidation when it comes to reactions with cysteine (Cys, Figure I.5a) [60]*” nie dotyczy układów beztlenowych i jest w zasadzie niepotrzebna, **(iv)** Na Rys. I.6 reakcja prowadząca od CysCys do Cys₂SS⁻ sugeruje, że w tym przypadku wzbudzony stan trypletowy 3PS jest reduktorem, a nie utleniaczem. Dotyczy to jednak szczególnego przypadku, a mianowicie kiedy foto-sensybilizatorem jest wzbudzony stan trypletowy tryptofanu (3Trp) albo tyrozyny (3Tyr), które są reduktorami. Z tego powodu, użycie w tym przypadku symbolu $^3PS^*$ jest trochę dezorientujące czytelnika, bo nie jest to ten sam typ $^3PS^*$, który prowadzi do rodnika CysS[•]; podpis pod rysunkiem zawiera odnośniki literaturowe 62, 64 i 67, ale powinny być dodane również odnośniki literaturowe: 61, 63, 65 i 66, **(v)** Zdanie na str. 30 „*The stabilization by Met(S.:N)⁺ leads to decarboxylation when the Met residue is C-terminal*”; zdanie to wymaga komentarza (i), stabilizacja czego? monomerycznego kationorodnika siarkowego? i (ii) jak może stabilizacja w wyniku utworzenia wiązania trielektronowego typu S.:N prowadzić do dekarboksylacji kiedy metionina jest C-terminalna, dekarboksylacja w tym wypadku zachodzi wg. mechanizmu typu pseudo-Kolbego i nie ma nic wspólnego z w/w stabilizacją; **(vi)** nie podzielałam sposobu zapisu aminokwasów począwszy od Rys. I.6, a kończąc na Rys.I.18, a w szczególności na Rysunkach I.6, I.7, I.10, I.13, I.16 i I.18, które przedstawiają schematy

reakcji w roztworach wodnych, w które uwikłane są równowagi kwasowo-zasadowe. W zakresie pH od 0 do 14 nie ma możliwości aby jednocześnie grupa aminowa była zdeprotonowana, a grupa karboksylowa protonowana. W zakresie pH, w których prowadzono większość badań, również tych przez doktoranta, aminokwasy występują w postaci tzw. jonu obojnaczego inaczej „zwitterjonu”. Prawidłowy zapis aminokwasu jest bardzo istotny, bo szybkość reakcji i jej kierunek bardzo często zależy od stanu protonacji obu wspomnianych grup, co jest szczególnie widoczne dla reakcji z udziałem metioniny i histydyny. Wspomina o tym sam doktorant na str. 36 i 37 przy okazji omawiania histydyny (podrozdział I.2.2.4); (vii) Rys. I.10 na str. 33 nie oddaje w pełni mechanizmu tworzenia się trwałych produktów w tyrozynie w nieobecności tlenu. Publikacje do których odnosi się doktorant w podpisie pod tym rysunkiem jak i w innych miejscach rozprawy (np. na str. 62 i 63) istotnie odnoszą się do procesów fotosensybilizowanego utleniania Tyr, ale zaproponowane w nich mechanizmy nie są całkowicie zgodne z mechanizmem zaproponowanym na Rys. I.10, ponieważ jest w nich uwzględniona obecność kompleksu spotkaniowego $[{}^3\text{CB}(>\text{C}=\text{O}^{\delta-}) \dots \delta^+\text{TyrOH}]$ (CT-complex). Z kolei publikacja [81] odnosi się do innego zagadnienia. Podsumowując ten fragment rozprawy uważam, że jest on najślabszy w całej rozprawie, napisany jest dość chaotycznie i w sposób niesystematyczny, mieszane są informacje związane z bezpośrednimi reakcjami fotoutleniania aminokwasów z reakcjami fotoutleniania z udziałem sensybilizatorów i to zarówno w obecności jak i nieobecności tlenu, a przypominam, że doktorant zajmował się układami zawierającymi sensybilizator 3-CB i odtlenionymi. Nie krytykuję samego faktu, że doktorant odwoływał się do literatury dotyczącej układów i procesów, które nie były przedmiotem zainteresowań w jego rozprawie, ale faktem, że wyraźnie nie wydzielił podrozdziału w którym omówiłby literaturę bezpośrednio związaną z tematyką jego rozprawy. Pozwoliłoby to czytelnikowi wyrobić sobie opinię jaki jest „state of the art” związany z tymi zagadnieniami i w związku z tym o celowości podjętych przez doktoranta badań jak również sformułowanych przez niego celów rozprawy i zaplanowanych i wykonanych w celu ich realizacji eksperymentów.

Doktorant pominął kilka ważnych pozycji literaturowych, o których wspominałem wcześniej, ale również trzy istotne prace przeglądowe związane z fotoutlenianiem tzw. białek terapeutycznych: *Pharm. Res.* „Photo-Degradation of Therapeutic Proteins: Mechanistic Aspects” **2020**, 37-45; *Pharmaceutics* „Photo-Oxidation of Therapeutic Protein Formulations: from Radical Formation to Analytical Techniques” **2022**, 14, 72 i *Biomolecules* “Primary Processes of Free Radical Formation in Pharmaceutical Formulations of Therapeutic Proteins” **2023**, 13, 1142, wszystkie z bogatą listą oryginalnych publikacji związanych z w/w tematyką. Jako recenzent czuję więc duży niedosyt związany z dokonaniem przez doktoranta przeglądem literaturowym i uważam, że potraktował go, mówiąc kolokwialnie, „po macoszemu”.

Do końcowego fragmentu tego rozdziału związanego z celem pracy mam następujące uwagi, pytania i komentarz: (i) początek pierwszego zdania „Anoxic modifications are omitted during research...” jest nieco dezorientujące bo w pierwszej chwili nie bardzo wiadomo o które badania chodzi, doktoranta czy wykonane wcześniej przez inne grupy badawcze?; może należałoby dodać „**earlier** research i jednocześnie zamienić **are omitted** na **were omitted**, (ii) w zdaniu precyzującym cel badawczy rozprawy jaki chciał zrealizować doktorant wydaje się koniecznym dodanie na jego końcu „**in anoxic conditions**”, (iii) dlaczego w sformułowanym przez doktoranta celu rozprawy jest ograniczenie do produktów trwałych, doktorant scharakteryzował również produkty

przejściowe w związkach modelowych i peptydach, (iv) w pytaniu 1 jakie „*different neighboring groups*” a, w pytaniu 2 jakie „*surroundings*” ma na myśli doktorant?, (v) według recenzenta postawione pytania od 1 do 4 powinny stanowić właściwy cel pracy, natomiast postawiony przez doktoranta cel pracy to konieczne zadania badawcze służące do jego realizacji, (vi) struktury związków modelowych, oraz di i tripeptydów badanych przez doktoranta zostały przedstawione na Rysunku II.1 w podrozdziale II.1 *Materials and methods*, chociaż wg recenzenta rysunek ten wraz z odpowiednim komentarzem wyjaśniającym ich wybór powinien znaleźć się w podrozdziale I.3 *The aim of the work*, bo przecież był on podyktowany konkretnymi przesłankami jakimi kierował się doktorant przy stawianiu przed sobą celów badawczych rozprawy oraz określeniu zakresu badań niezbędnych do ich realizacji.

Rozdział *Materials and methods* zawiera spis badanych w rozprawie związków modelowych, peptydów oraz białka oraz krótki opis wielu metod i technik badawczych, które mgr Kamil Frąckowiak wykorzystał w swoich badaniach i które wykonywał w swojej macierzystej instytucji (Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu) jak również podczas dwumiesięcznego stażu naukowego na Uniwersytecie Kopenhaskim pracując w grupie prof. Michaela Daviesa. Na podkreślenie zasługuje trafność wyboru obiektów badań oraz metod i narzędzi badawczych.

Rozdział „**Results and discussion**” stanowi najważniejszą część rozprawy, w których są przedstawione uzyskane przez doktoranta wyniki doświadczalne z ich dyskusją wraz z odpowiednim dla każdego poruszanego zagadnienia krótkim opisem warunków eksperymentów dla poszczególnych badanych aminokwasów i ich pochodnych oraz białka GAPDH. Odnosząc się do tego fragmentu pracy chciałbym podkreślić, że mgr Kamil Frąckowiak zgromadził bogaty, interesujący i wartościowy od strony poznawczej materiał eksperymentalny, co znalazło już potwierdzenie, jak wspomniałem już wcześniej, w 2 publikacjach, współautorstwa doktoranta, w czasopiśmie o randze międzynarodowej.

Podczas czytania tego fragmentu rozprawy nasunęły mi się następujące uwagi i komentarze: (i) Pierwsze trzy zdania w drugim akapicie na **str.62** wymagają korekty i uzupełnienia: *carboxylic acid, amine and phenol are not groups, they should be substituted by the following terms, carboxyl, amine and hydroxyl group in phenol*, nie wspomniano o ładunku grupy hydroksylowej w fenolu, która w warunkach pH = 7 jest neutralna ($pK_a = 10.1$), stąd ładunek cząsteczki tyrozyny przy niezablokowanych grupach funkcyjnych jest równy zero, z kolei trzecie zdanie dotyczy już chyba nie tyrozyny tylko N-acetylotyrozyny; (ii) **str. 62**: zdanie “*According to those results, it seems that primary step of photosensitized oxidation of Tyr involves electron transfer followed by proton transfer, and is in accordance to proposed mechanism for other sensitizers in the literature [77,78, 81]*” i **str. 63**: zdanie “*Presence of $3CB^{\bullet-}$ in all spectra implies that first step must be electron transfer [149] followed by second step, proton transfer*” oraz “*The mechanism of primary steps of sensitized photo-oxidation based on the presented results, is similar to the mechanism currently known in the literature for another sensitizers [78, 98, 115, 149]*” wymagają komentarza. Poza obecnością $3CB^{\bullet-}$ w widmach obserwuje się również $3CBH^{\bullet}$ oraz $TyrO^{\bullet}$ (*vide* Rysunek TYR2 (b)). Istotnie ET ma miejsce ale w ramach kompleksu spotkaniowego z przeniesieniem ładunku (CT-complex) [${}^3CB(>C=O^{\delta-}) \dots \dots \delta^+TyrOH$] z wytworzeniem cząstkowych ładunków na tlenie grupy karbonylowej i w pierścieniu aromatycznym tyrozyny (*vide* komentarz (vii) do Rysunku I.10. Opierając się na

zmierzonych wydajnościach kwantowych (Tabela TYR.1) można stwierdzić, że proces powrotnego przeniesienia elektronu jest do pominięcia (może z wyjątkiem dipeptydu Tyr-Val), proces przeniesienia protonu wewnątrz kompleksu spotkaniowego prowadzącym do rodnika ketylowego CBH^\bullet i TyrO^\bullet jest dominujący, a rodniki tyrozylowe tworzą się głównie w tym procesie oraz w mniejszym stopniu w wyniku rozseparowania ładunków, co prowadzi do anionorodnika ketylowego $\text{CB}^{\bullet-}$ i kationorodnika tyrozylowego ($\text{TyrOH}^{\bullet+}$), który błyskawicznie ulega deprotonacji do rodnika tyrozylowego (TyrO^\bullet); (iii) bardzo ciekawą obserwacją jest niska wydajność kwantowa rozkładu Tyr i jej pochodnych z zablokowanymi grupami karboksylowymi lub/i aminowymi oraz ^3CB . Na podstawie wcześniej zaproponowanych mechanizmów jedyną drogą regeneracji substratów był proces powrotnego przeniesienia elektronu w ramach CT-kompleksu, ale w oparciu o pomiary wydajności kwantowych CBH^\bullet , $\text{CB}^{\bullet-}$, oraz TyrO^\bullet , proces ten, szczególnie dla tyrozyny, jest właściwie do pominięcia. W celu wyjaśnienia tej obserwacji, doktorant zaproponował uzupełnienie mechanizmu o nową reakcję, a mianowicie tzw. powrotne przeniesienie atomu wodoru (bH) (Rysunek TYR.7). Co według doktoranta jest siłą napędową tej reakcji, skoro oderwanie wodoru ($>\text{C}^\bullet-\text{O}-\text{H}$) i przyłączenie wodoru ($\text{TyrO}-\text{H}$) zachodzi przy atomie tlenu, a więc energia (BDE) zerwanego wiązania i nowoutworzonego wiązania tlen-wodór powinny być bardzo zbliżone? W mojej opinii obliczenia kwantowo-mechaniczne mogłyby być pomocne w określeniu czy taka reakcja jest termodynamicznie możliwa, jak również eksperyment z wykorzystaniem radiolizy impulsowej na odpowiednio zaprojektowanym układzie. Szkoda, że dyskusja wyników dotycząca tyrozyny w rozprawie jest dużo krótsza w porównaniu z dyskusją wyników w oryginalnej publikacji doktoranta (*JP&P A: Chem. 2025*), której był przecież pierwszym autorem; (iv) schemat na Rys. Tyr.7 i kolejne schematy na rysunkach Trp.7, His.9 i Phe.6; dlaczego doktorant nie uwzględnił faktu, że w warunkach prowadzonych przez niego eksperymentów (pH = 7) grupa karboksylowa jest w formie zdeprotonowanej (COO^-), a grupa aminowa w formie protonowanej (NH_3^+) (vide podobna uwaga (vi) przy omawianiu rozdziału I); (v) dlaczego w Tabeli TRP.1, doktorant podaje sumę wydajności kwantowych CBH^\bullet i $\text{CB}^{\bullet-}$ skoro dla związków modelowych i peptydów zawierających Trp zarówno CBH^\bullet i $\text{CB}^{\bullet-}$ były brane pod uwagę przy rozkładzie widm i dla tego ostatniego indywiduum, wartości stężeń nie były zerowe (Figure TRP.S17), w przeciwieństwie do tryptofanu? Zastanawiająca jest też olbrzymia rozpiętość w wartościach wydajności kwantowych rodnika TrpN^\bullet oraz brak ich korelacji z wydajnościami kwantowymi produktów przejściowych powstałych z sensybilizatora; (vi) na str. 74, doktorant wspomina o kompleksie spotkaniowym, ale dlaczego nie uwzględnił jego obecności na schemacie na Rys. TRP.7?; (vii) zdanie „*This phenomenon further substantiates the argument that $\text{TrpNH}^{\bullet+}$ has the ability to oxidize TyrO^\bullet (?)*. Do jakiego produktu miałby go utleniać? Czy doktorantowi nie chodziło przypadkiem o resztę Tyr w dipeptydzie?; (viii) zastanawia mnie fakt, dlaczego w pH 7 doktorant dla badanych peptydów brał pod uwagę w rozkładach widm obecność $\text{TrpH}^{\bullet+}$, skoro pK_a dla równowagi $\text{TrpH}^{\bullet+} \rightleftharpoons \text{Trp}^\bullet + \text{H}^+$ jest równe ~ 4.3 , a więc blisko 3-rzędy wielkości niższe od pH w którym prowadzono eksperyment; (ix) Profile stężeniowe $^3\text{CBH}^\bullet$, $^3\text{CB}^{\bullet-}$ i ^3CB (Rys. HIS.2b) uzyskano bez brania pod uwagę przejściowych produktów fotoutleniania histydyny w procedurze rozkładu widm przedstawionych na Rys. HIS2a. Szkoda, że doktorant nie pokazał chociaż na przykładzie widm przejściowych otrzymanych dla His jak wygląda w tym przypadku dopasowanie widm uzyskanych z procedury rozkładu z widmami eksperymentalnymi. Jeżeli

dopasowanie jest dobre, z większym zaufaniem można byłoby przyjąć wartości wydajności kwantowych zamieszczonych w Tabeli HIS.1; (ix) kolejną ciekawą obserwacją eksperymentalną charakterystyczną dla fotosensybilizowanego utleniania histydyny i jej związków modelowych i peptydów jest obecność dodatkowych dwóch produktów końcowych, których utworzenie nie można było przypisać procesom, których prekursorem jest kompleks spotkaniowy z przeniesieniem ładunku. Opierając się na diagramach energetycznych $^3\text{3CB}^*$ i $^3(\text{HisH}^+)^*$ doktorant zaproponował dodatkowy kanał reakcyjny procesu wygaszania $^3\text{3CB}^*$, a mianowicie przeniesienie energii na histydynę z utworzeniem $^3(\text{HisH}^+)^*$, który jest prekursorem dwóch wspomnianych wcześniej produktów końcowych; zbliżony mechanizm fotosensybilizacji z udziałem m.in. $^3\text{Phe}^*$ w oparciu o analizę produktów końcowych doktorant zaproponował również dla fenyloalaniny.

Ostatnie dwa rozdziały rozprawy to **Conclusions i References**

Rozdział **Conclusions** stanowi właściwie końcowy rozdział rozprawy. Wnioski zostały sformułowane w sposób poprawny, chociaż niektóre fragmenty mogłyby być przedstawione w sposób bardziej zwięzły. Pozytywnie oceniam podsumowanie wyników w rozprawie w postaci serii pytań postawionych w rozdziale I.3 z jednoczesnymi odpowiedziami (nawiasem mówiąc liczba tych pytań i związanych z nimi odpowiedzi jest większa od postawionych pytań w rozdziale I.3).

Rozdział **References** obejmuje spis cytowanych oryginalnych i przeglądowych prac, i monografii w rozprawie. Liczba i trafny dobór cytowanej literatury (uwzględniający również ostatnie lata) świadczy o dobrym rozeznaniu doktoranta w literaturze związanej z zagadnieniami zawartymi w rozprawie, chociaż jak wspomniałem wcześniej doktorant nie ustrzegł się kilku ważnych przeoczeń.

Za szczególnie ważne osiągnięcia uzyskane przez doktoranta w trakcie realizacji rozprawy uważam:

- kompleksowe scharakteryzowanie indywiduów przejściowych i związanych z nimi produktów trwałych powstających w aminokwasach aromatycznych podczas ich fotosensybilizowanego utleniania w obecności 3-karboksybenzofenonu w warunkach beztlenowych i w oparciu o nie sformułowanie całościowego mechanizmu począwszy od pierwotnych produktów a kończąc na produktach trwałych,
- w tych samych warunkach eksperymentalnych co powyżej, kompleksowe scharakteryzowanie indywiduów przejściowych i związanych z nimi produktów trwałych powstających w aminokwasach aromatycznych z zablokowanymi grupami funkcyjnymi, które reprezentują ich najprostsze modele lokalizacji w układach białkowych, jako reszty aminokwasowe ulokowane na N- i C-końcu oraz wewnątrz cząsteczki białkowej,
- w oparciu o analizę produktów końcowych uzupełnienie mechanizmów fotosensybilizacji w warunkach beztlenowych o dodatkową drogą wygaszania stanu trypletowego sensybilizatora $^3\text{3CB}^*$ w procesie przeniesienia energii na histydynę i fenyloalaninę.
- w tych samych warunkach eksperymentalnych co powyżej (z jednoczesnym wykazaniem, że cząsteczki sensybilizatora tworzą kompleksy związane z powierzchnią białka w stanie podstawowym) scharakteryzowanie produktów trwałych powstających w cząsteczce białka GAPDH, które zawiera wszystkie badane przez doktoranta aminokwasy aromatyczne, a w oparciu o wcześniejsze badania związków modelowych

zakres ich modyfikacji w GAPDH i które dotyczą tylko reszt aminokwasowych aromatycznych ulokowanych na powierzchni białka,

- wykazanie, że przy krótkich czasach naświetlania modyfikacje reszt aminokwasowych ulokowanych na powierzchni białka nie powodują utraty jego aktywności, gdy z kolei wydłużenie czasu naświetlania prowadzi do poważniejszych uszkodzeń w białku obejmujących miejsce aktywne i w konsekwencji utratę jego aktywności.

Z obowiązku recenzenta wymieniam kilka przykładowych znalezionych w tekście uchybień językowych związanych m. in. z drobnymi błędami typu „*typo*” oraz z niefortunnymi terminami i sformułowaniami, które oczywiście nie mają istotnego wpływu na merytoryczną wysoką ocenę rozprawy: **Abbreviations:** 3-carboxybenzophenon → 3-carboxybenzophenone (3-krotnie na stronie); 4-carboxybenzophenon → 4-carboxybenzophenone; cysteine **thiol** radical → cysteine **thiyl** radical; Glyceralderhyde → Glyceraldehyde; **str. 17:** light-induced **harm** → **damage?**; **str. 18:** **heightened** acidity, such **harm**; **str. 21:** their **worth** → **significance?**, **It's** → **Its**; **str. 22:** **oxygen** radical anion → **superoxide** radical anion; **str. 23:** podpis pod rysunkiem „**said** figure” → **mentioned** figure?; **str. 24:** Glyceralderhyde → Glyceraldehyde; **str. 30:** „Photosensitized reactions**has** been extensively **researched** by...” → Photosensitized reactions**have** been extensively **studied** by...” i ...**3CB^{•-}** and ...[68] → ...**4-CB** and ...[68]; **str. 38:** nie jest wyjaśniony akronim PBS; **oxidating** Phe by ... → **oxidation of** Phe by...; **str.61:** „...**shown** the formation...” → „...**showed** the formation...”; **str.71:** “...**to pick** suitable wavelength...” → “...**to select** suitable wavelength...”; **str. 125:** “...as it is well-**researched**...” → “...as it is well-**studied**...”

Reasumując, rozprawa doktorska mgr. Kamila Jakuba Frąckowiaka zawiera oryginalne i cenne wyniki związane z badaniami fotosensybilizowanego fotoutleniania aminokwasów aromatycznych, związków modelowych imitujących ich położenie w cząsteczce białkowej oraz białka GAPDH zawierające wspomniane aminokwasy. Doktorant wykonał olbrzymią pracę nie tylko od strony eksperymentalnej gromadząc olbrzymią ilość wyników ale również od strony interpretacyjnej. Chociaż nie ze wszystkimi wnioskami zgadzam się, niektóre są wyciągnięte trochę „na wyrost”, co z kolei stwarza jednocześnie silną motywację do kontynuacji tego typu badań nad cząsteczkami białkowymi, o czym również wspomina doktorant. Doktorant umiejętnie stawiał i rozwiązywał trudne niekiedy zagadnienia związane z zaprojektowaniem odpowiedniego układu chemicznego oraz wykazał umiejętność późniejszej interpretacji otrzymanych wyników co świadczy o jego dojrzałości naukowej. W zasadzie, wszystkie postawione przez mgr. Kamila Frąckowiaka cele badawcze rozprawy (*vide* komentarz (v) przy omawianiu **aim of the work**) zostały przez niego zrealizowane. Jestem przekonany, że doktorant przygotował bardzo wartościową rozprawę, ale również przy tej okazji zdobył dużą wiedzę związaną z inicjowanymi fotochemicznie procesami zachodzącymi z udziałem aromatycznych aminokwasów i ich peptydów jak również w cząsteczce o bardzo złożonej strukturze jakim było białko GAPDH zawierające wspomniane aminokwasy.

Powyższe stwierdzenia upoważniają mnie do sformułowania końcowej opinii, że **rozprawa doktorska mgr. Kamila Jakuba Frąckowiaka spełnia całkowicie**

wymagania przewidziane Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 (Dz. U. nr 65, poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami i wnoszę o jej przyjęcie przez Radę Wydziału oraz dopuszczenie mgr. Kamila Jakuba Frąckowiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



(prof. dr hab. Krzysztof Bobrowski)

Warszawa, 12 stycznia 2025