

Prof. dr hab. Monika Musiał
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski
ul. Szkolna 9
40-006 Katowice

Katowice, 14 września 2015

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Chmielowskiej zatytułowanej "Kwantowochemiczne obliczenia właściwości strukturalnych i elektrycznych oraz reaktywności klastera A w syntazie acetylokoenzymu A"

Metody obliczeniowe chemii kwantowej cieszą się coraz większym uznaniem jako komplementarna do badań doświadczalnych technika badawcza. Ten sukces należy przypisać teorii struktury elektronowej opartej na funkcjonalach gęstości elektronowej, znanej pod nazwą DFT, w której zamiast poszukiwać funkcji falowej poprzez rozwiązanie skomplikowanego równania Schrödingera, ograniczamy się do rozwiązania układu jednoelektronowych równań Kohna-Shama, pozwalających na uzyskanie funkcji gęstości elektronowej. Dzięki niezwykle dynamicznemu rozwojowi technik komputerowych metoda DFT jest stosowana z powodzeniem do rozległych układów, liczących kilkadziesiąt czy nawet kilkaset atomów, co sprawia, że wyniki uzyskane tą metodą są przydatne w takich dziedzinach jak kataliza, medycyna czy nawet w badaniach układów fotowoltanicznych. Szczególnie interesujący obszar jej zastosowań stanowią badania struktury elektronowej i właściwości układów istotnych dla procesów biochemicznych i biologicznych.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska dotyczy właśnie zagadnień związanych z zastosowaniem metody DFT w badaniach nad strukturą jednego z centrów aktywnych ważnego dwufunkcyjnego enzymu o nazwie syntaza acetylo-koenzymu A/dehydrogenaza tlenku węgla, w skrócie ACS/CODH, o masie cząsteczkowej 310 kilodaltonów. Enzym ten posiada kilka centrów aktywnych; przedmiotem badań stanowiących treść omawianego doktoratu jest jego część odpowiedzialna za funkcję syntazy, a więc tworzenie acetylokoenzymu A. Centrum aktywne syntazy stanowi tzw. klaster A, będący dość złożonym kompleksem niklu i kubanu żelazowo-siarkowego, zapisywanego skrótowo jako $[Fe_4S_4] - Ni_pNi_d$.

Praca ma tradycyjną formę rozprawy, liczy 81 stron (łącznie z bibliografią) i składa się z sześciu rozdziałów. W rozdziale pierwszym Autorka definiuje cel pracy. Rozdział drugi został przeznaczony na opis stosowanych metod obliczeniowych (teoria funkcjonałów gęstości), kolejny — na opis syntazy acetylokoenzymu A. Przegląd badań literaturowych stanowi treść rozdziału czwartego. Główna część rozprawy, czyli wyniki i opis wykonanych obliczeń zostały zamieszczone w rozdziale piątym. Praca kończy się podsumowaniem i wnioskami (rozdział szósty). Na końcu pracy Autorka zamieściła spis literatury (93 pozycje) oraz załączniki, w których umieściła tabele pomocnicze z danymi dla modeli z i bez cząsteczki wody, tj. energiami struktur zoptymalizowanych, wybranymi parametrami geometrycznymi, gęstościami spinowymi i ładunkami uzyskanymi poprzez analizę naturalnych orbitali wiązań.

Obliczenia wspomnianego w tytule układu wykonano przy użyciu pakietu GAUSSIAN09. W obliczeniach użyto metodę BS-DFT (*Broken Symmetry DFT*) i funkcjonału BP86 oraz bazy TZVP. Ponadto zastosowano model ciągły rozpuszczalnika (PCM), w celu uwzględnienia otoczenia białkowego enzymu, dla stałych dielektrycznych ϵ o wartościach: 4, 12, 20 i 80.

Celem pracy była próba określenia mechanizmu tworzenia acetylokoenzymu A, powstającego poprzez dołączenie do koenzymu A grupy CH_3 oraz cząsteczki CO. Przedmiotem badań był tytułowy klaster A, w którym następuje właściwa synteza acetylokoenzymu A. Klaster A ma dość złożoną budowę, jego podstawowymi jednostkami strukturalnymi jest kuban żelazowo-siarkowy Fe_4S_4 oraz połączone z nim mostkiem siarkowym dwa atomy niklu oraz szereg reszt aminokwasowych. W obliczeniach doktorantki klaster A jest reprezentowany przez cztery modele, od M0 do M3, w których reszty aminokwasowe zostały podstawione grupami atomów o zbliżonych własnościach. Wykonane w pracy obliczenia można podzielić na kilka części. Obszerna część obliczeń była poświęcona optymalizacji geometrii i badaniom struktury elektronowej klasteru A, w tym także jego odmiany sprotonowanej oraz pochodnych z dołączonymi ligandami (CH_3 , OH^- , CO , HCOO^-). Ponieważ struktura krystalograficzna enzymu, a tym samym klastera A, jest znana można było uzyskać wyniki teoretyczne odnieść do wyników eksperymentalnych.

Kolejną wielkością wyznaczoną w pracy była stała dysocjacji kwasowej pK_a dla struktur protonowanych oraz potencjały redukcji związane z przyłączeniem jednego lub dwóch elektronów do centrum aktywnego.

Istotna część badań została poświęcona analizie mechanizmu reakcji metylacji klastera A. Metyl jest dostarczany do centrum reakcyjnego przez białko o symbolu CoFeSP zawierające metylokobalaminę, w której tworzy on

wiązanie z atomem kobaltu. Proponowany w pracy mechanizm zakłada najpierw deprotonację (czynnikiem usuwającym proton jest anion mrówczanowy) a następnie przejście grupy CH_3 z kobaltokoryny na tzw. proksymalny atom niklu (czyli ten bliższy fragmentowi kubanowemu) w postaci jonu CH_3^- . Jak wykazała Autorka, mechanizm ten, określony w pracy jako $\text{S}_{\text{N}}2$, należy rozważać o ile możliwe jest zbliżenie się atomów niklu (klaster A) oraz kobaltu (kobaltokoryna) na odległość około 4.5 Å. Jeżeli ze względów sterycznych, obydwa centra metaliczne pozostają bardziej odległe, możliwy jest mechanizm rodnikowy, przejawiający się wysoką gęstością spinową na grupie metylowej.

Pozytywnie oceniam stronę merytoryczną wykonanych badań. Autorka wszechstronnie analizuje badany układ: rozważa szereg modeli od najprostszego M0 do najbardziej zaawansowanego M3, symuluje zróżnicowaną aktywność otoczenia białkowego przez dobór odpowiedniej wartości stałej dielektrycznej w modelu PCM, rozważa różne – konkretnie trzy – stopnie utlenienia centrum kubanowo-niklowego, a dla każdego z tych wariantów strukturalnych wykonywana jest optymalizacja geometrii uzupełniona analizą gęstości spinowych i ładunków na atomach. Ważnym wnioskiem wysnutym na podstawie wykonanych obliczeń, jest wypowiedź odnośnie mechanizmu przyłączenia grupy metylowej, w którym możliwy mechanizm rodnikowy współzawodniczy z mechanizmem substytucji nukleofilowej – wyniki Autorki wskazują na ten ostatni. Jest rzeczą oczywistą, że nie możemy oczekiwać kategoriycznych konkluzji na podstawie obliczeń jednak metodami przybliżonymi, ale uzyskane wyniki przybliżają nas do poznania mechanizmu ważnego procesu enzymatycznego. Co do meritum pracy mam kilka uwag, o charakterze raczej wątpliwości niż zarzutów. Trochę mnie niepokoi fakt, że wartość stałej dielektrycznej w modelu PCM ma charakter parametru dobieranego tak, by uzyskać zgodność wyników obliczeń z danymi doświadczalnymi. Np. na str. 52 jest informacja, że dobrą zgodność z doświadczeniem uzyskuje się dla modeli M0a i M1a przy $\epsilon = 80$, natomiast rezultaty optymalizacji geometrii na rys. 5.7 i 5.8 odnoszą się do $\epsilon = 20$. Podobnie, w Tabeli 5.3 zamieszczono wyznaczone optymalne długości wiązań pomiędzy atomami nikiel-nikiel, nikiel-żelazo, nikiel-siarka dla sześciu struktur modelowych i czterech wartości stałej dielektrycznej. Czy możemy ocenić, które z nich najlepiej odtwarzają rzeczywistą strukturę i tym samym wypowiedzieć się co do przydatności pary model-stała dielektryczna? Podobnie dane dotyczące analizy populacyjnej z Tabeli 5.4. Czy pokazują one tylko jak zmieniają się gęstości na atomach przy zmianie modelu czy też umożliwiają ocenę modelu?

O ile strona merytoryczna nie budzi moich zastrzeżeń, poza drobnymi wątpliwościami, jak powyżej, o tyle mam wiele uwag co do formy prezentacji pracy i szereg zastrzeżeń odnośnie strony redakcyjnej.

Po pierwsze nie mogłam doszukać się dobrej wyraźnej prezentacji struktur modelowych, które były przedmiotem obliczeń. Cztery rozważane modele klastra A są przedstawione na rys. 5.6, ale ze względu na małe rozmiary rysunku trudno jest się zorientować jakie atomy i w jakiej liczbie wchodzi w skład każdej ze struktur. W literaturze, np. poz. [16], podaje się precyzyjnie strukturę np. przez zastosowanie kodu kolorów i bardziej szczegółowy opis atomów i grup atomów. Myślę, że nic nie stoi na przeszkodzie by np. przedstawić każdą ze struktur na oddzielnej stronie w odpowiednim powiększeniu. Uważam, że właśnie praca doktorska powinna być miejscem, gdzie przedstawia się różne szczegóły, na które nie ma miejsca w publikacji. Okazuje się, że w pracy doktorantki, opublikowanej w *Journal of Physical Chemistry A*, badana struktura jest przedstawiona ze znacznie większą dbałością i dokładnością niż w pracy doktorskiej. Obawiam się, np. że rysunki 5.9, 5.10 i 5.11, przedstawiające zoptymalizowaną geometrię sześciu modelowych struktur klastra A, zawierają znikomą informację: po pierwsze, są bardzo małe, są to zaledwie kolorowe szkice, po drugie, brak jest jakiegokolwiek komentarza na co czytelnik powinien zwrócić uwagę.

Do mankamentów pracy zaliczam wyjątkowo niestaranną jej redakcję. Ogromna liczba literówek, średnio licząc jedna na stronę, brak dbałości o znaki diakrytyczne i poprawną interpunkcję, przede wszystkim ogonki przy *ę,ą*, niewłaściwe odwołania do tabel, np. na str. 48 raz jest przywołana Tablica 5.5, innym razem Tablica 5.12, a według mnie w obu przypadkach chodzi o Tablicę 5.11. Niewłaściwe odwołania do literatury, kilkakrotnie w miejsce numeru pozycji literaturowej jest wpisany znak zapytania, na str.56 w podpisie rysunku brak odnośnika, Na stronie 21 podana jest informacja o masie atomowej enzymu 301 kDa, w literaturze podana jest wartość 310 kDa, skąd ta rozbieżność?

Mimo pewnego zawodu jakiego doznaje czytelnik pracy w związku z pozostawiającą wiele do życzenia stroną graficzną, trudno nie uznać kompetencji Autorki i jej ogromnego wysiłku włożonego w wykonane badania. Przeprowadzone obliczenia wymagały biegłości w przygotowywaniu danych wejściowych, dogłębnej znajomości możliwości używanego pakietu programów jak i dostępnych wariantów. Realizacja takiego tematu badawczego to żmudne obliczenia dla olbrzymich układów oraz analiza ogromnej liczby danych. Mogę więc stwierdzić, że doktorantka doskonale radzi sobie ze stosowaniem

zaawansowanych metod obliczeniowych chemii kwantowej do badania złożonych układów chemicznych.

Biorąc to pod uwagę, jak również pozytywną ocenę merytorycznej strony pracy, mogę stwierdzić, że przedstawiona mi do recenzji praca stanowi istotny wkład do badań nad jednym z centrów aktywnych enzymu ACS/CODH, zwanym klasterem A, zawiera elementy nowości naukowej związane z analizą możliwych mechanizmów tworzenia acetylowej pochodnej koenzymu A. Stwierdzam, że dysertacja doktorska mgr Aleksandry Chmielowskiej spełnia bez zastrzeżeń warunki stawiane pracom doktorskim.

W związku z powyższym zwracam się do Rady Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie magister Aleksandry Chmielowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

J. Huciat