



Kraków, 15.09.2015

dr hab. Renata Tokarz-Sobieraj, prof. IKiFP

nctokarz@cyf-kr.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. „Kwantowochemiczne obliczenia właściwości strukturalnych i elektronowych oraz reaktywności klastera A w syntazie acetylokoenzymu A”

Pani mgr Aleksandry Chmielowskiej

Praca doktorska mgr Aleksandry Chmielowskiej została wykonana w Instytucie Chemii w Zakładzie Chemii Teoretycznej Uniwersytetu Śląskiego, pod kierunkiem dr hab. Marii Jaworskiej, prof. UŚ. Celem recenzowanej rozprawy był teoretyczny opis właściwości strukturalnych i elektronowych dwucentrowego kompleksu niklu, będącego centrum aktywnym syntazy acetylokoenzymu A, opis mechanizmu redukcji jego utlenionej formy i zaproponowanie mechanizmu reakcji metylacji.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest przykładem zastosowania modelowania teoretycznego do szczegółowego opisu reakcji biegnących w obecności katalizatorów enzymatycznych, której celem jest rozstrzygnięcie wątpliwości i kontrowersji jakie pojawiają się w literaturze tematu.

Informacje o pracy.

Praca liczy 97 stron. Właściwą część pracy poprzedza: spis treści, tabel i rysunków oraz wykaz zastosowanych skrótów. Zasadnicza część pracy składa się z sześciu rozdziałów. W pierwszych czterech Autorka formułuje kolejno: główne cele swojej rozprawy doktorskiej, opisuje podstawy teoretyczne zastosowanej metody, dokonuje przeglądu literaturowego zarówno prac eksperymentalnych jak i teoretycznych. Badania własne Doktorantki zawarte są w rozdziale piątym, w których omówione są modele obliczeniowe, struktura geometryczna i elektronowa klastera A, obliczenia pK_a , obliczenia potencjałów redukcji i wreszcie opis reakcji metylacji. Rozdział szósty stanowi podsumowanie, w którym sformułowane są najważniejsze wnioski płynące z przeprowadzonych badań. Rozprawę zamyka spis cytowanej literatury, który zawiera 93 pozycje. Rozprawa zawiera dodatkowo dwa załączniki, będące uzupełnieniem przedstawionych wcześniej wyników badań, a całość zamyka spis dorobku naukowego. Rozprawa doktorska ilustrowana jest 26 rysunkami, a ich uzupełnienie stanowią 23 tabele.

Ocena merytoryczna rozprawy.

Pierwszy rozdział to bardzo krótki wstęp wprowadzający w tematykę rozprawy, na tle którego sformułowane zostały zadania badawcze, a następnie przedstawiona konstrukcja rozprawy.

Wprowadzenie w tematykę procesów enzymatycznych zostało podane w przystawionej „pigułce”, co spowodowało, że w krótkim tekście pojawiło się wiele skrótów np. „base-off” (zdefiniowane na str. 72), Ni_pNi_d (zdefiniowano na str. 22).

Uważam też, że lepszym rozwiązaniem byłoby przedstawienie najpierw celów rozprawy doktorskiej, a dopiero potem sposobu ich realizacji, które prowadzą do konkretnych wyników.

Rozdział drugi poświęcony jest opisowi modelu teoretycznego. Autorka rozprawy podaje informacje najpierw o metodzie DFT, stosowanych w modelowaniu funkcyjach, modelach rozpuszczalnika, a na końcu opisuje procedurę obliczeniową pK_a .

Dobrym rozwiązaniem w tej części pracy jest opis zastosowany dla funkcyj, gdzie na tle całej grupy szczegółowo omówiony został użyty w pracy funkcyj BP86. Zabrakło tego przy opisie rozpuszczalnika. Autorka skupiła się wyłącznie na modelu PCM, jaki stosuje w pracy, natomiast brakuje choćby spisu innych sposobów modelowania procesu solwatacji w obliczeniach teoretycznych.

Rozdział trzeci i czwarty to przegląd literaturowy najpierw prac eksperymentalnych, a następnie teoretycznych.

Przytoczone przez Autorkę przykłady literaturowe uzasadniają podjęcie przez Nią tematu rozprawy. Pokazują z jakimi problemami zmagają się eksperymenciści i jaki jest stan wiedzy teoretycznej dotyczącej koenzymu A, a jak widać z cytowanej literatury jest on bardzo ubogi.

Rozdział piąty, który jest prezentacją badań własnych, Doktorantka rozpoczyna podrozdziałem, w którym opisano szczegóły procedury zastosowanej na poszczególnych etapach modelowania.

Ta tzw. część „techniczna” jest cenna, pozwala bowiem ocenić dokładność stosowanych parametrów obliczeniowych. Na tym etapie brakuje mi jednak uzasadnienia wyborów niektórych z nich np. funkcyj, wartości stałych dielektrycznych czy zastosowanej metodologii Noodlemana do wyznaczania pK_a i potencjałów redukcji. Oczekuję, że w trakcie obrony takie uzasadnienia się pojawią.

Szczegółowy opis otrzymanych wyników Pani Chmielowska rozpoczyna od omówienia struktury geometrycznej i elektronowej klastra A jako funkcji rozmiaru klastra i stałej dielektrycznej ośrodka. Autorka rozprawy wykazała, zależność parametrów geometrycznych od wielkości klastra użytego do obliczeń i wyznaczając gęstość spinową na poszczególnych fragmentach pokazała, że niesparowany elektron w formie A_{red1} klastra A lokalizuje się na atomie Ni_p , a w formach A_{red2} obserwuje się sprzężenie antyferromagnetyczne pomiędzy Ni_p a kubanem.



Nie do końca potrafię zgodzić się ze wszystkimi wnioskami, jakie zostały zawarte w tej części pracy. Autorka rozprawy pisze m.in. „...że wraz ze wzrostem wielkości modelu wydłuża się dystans między atomami Ni_p i Ni_d , a skraca między atomami Ni_p oraz $Fe1$.” Nie jest to do końca prawda bo model M3 jest wyjątkiem od tej reguły.

Podsumowanie Doktorantka rozpoczyna od słów „Dobra zgodność otrzymanych parametrów geometrycznych ... z danymi doświadczalnymi...”, szkoda że na poparcie tych słów nie zostały przytoczone jakieś liczby, potwierdzające tą zgodność.

Jednym z celów rozprawy było wypracowanie modelu i metodyki obliczeń. Przy formułowaniu wniosków końcowych zabrakło mi jednoznacznego wskazania jaki model obliczeń proponuje Autorka do opisu struktury elektronowej, bowiem wnioski końcowe odnoszą się wyłącznie do struktury geometrycznej.

Wyniki prezentowane w dalszej części pracy dotyczące opisu struktury geometrycznej i elektronowej protonowanego klastera A i jego form z różnymi ligandami, zostały opublikowane w J. Phys. Chem. A w 2013 r. Praca ta zawiera również wyznaczone, dla różnych form koenzymu A, wartości PK_a i potencjałów redukcji. Za najważniejsze wnioski wynikające z tej części pracy należy uznać stwierdzenie, że w formach utlenionych proton lokalizuje się na atomie siarki $S2$, podczas gdy w formach zredukowanych dochodzi do powstawania wodorków NiH oraz pokazanie, że w strukturach zredukowanych A_{red1} niesparowany elektron lokuje się na kubanie żelazowo-siarkowym. Niekwestionowaną wartością dodaną są, wyznaczone dla różnych form klastera A, wartości pK_a i potencjały redukcji. Na podstawie wyznaczonych wielkości Autorka wykazała, że najbardziej prawdopodobnym sposobem aktywacji formy utlenionej jest dwuelektronowa redukcja formy A_{ox} , a forma A_{red2} w warunkach fizjologicznych występuje w formie sprotonowanej. Otrzymane wielkości posłużyły Autorce rozprawy do sformułowania ogólnego mechanizmu reakcji metylacji.

Dużym mankamentem tej części pracy jest „telegraficzny skrót”. Ogólne wnioski z tej części pracy zostały sformułowane dopiero na końcu rozprawy. Szkoda natomiast, że zabrakło jakiegokolwiek dyskusji wyników w poszczególnych podrozdziałach. Rozumiem, że Pani Chmielewska nie chciała kopiować materiałów już publikowanych, ale samo przedstawienie obiektu badań (zresztą w przypadku ligandów bardzo nieprecyzyjne) i przytoczenie tabel z dużą ilością liczb, z których większość nie jest omawiana, to trochę za mało. Liczę, że w trakcie obrony dowiemy się np. jak protonacja czy dołączenie liganda wpływa na parametry struktury geometrycznej i elektronowej różnych form klastera A.

Bardzo cennych informacji na poziomie molekularnym dostarcza nam kolejny podrozdział, w którym Autorka przedstawia obliczenia dotyczące reakcji metylacji. Za najważniejsze osiągnięcia tej części rozprawy uważam wskazanie poszczególnych etapów procesu metylacji i czynników, które decydują czy proces przebiega według schematu S_N2 czy mechanizmu rodnikowego.

Niestety tak jak w poprzednim rozdziale, Autorka rozprawy bardzo dawkuje nam informacji. Po lekturze tego fragmentu rozprawy oczekuje dyskusji w temacie:

- jak stała dielektryczna wpływa na energetykę procesu deprotonacji i na gęstość spinową w poszczególnych fragmentach klastera A;

- czym Autorka tłumaczy obserwowane dla $\epsilon=80$ różnice w zmianach gęstości spinowych na poszczególnych fragmentach klastra A, w porównaniu do układów liczonych dla $\epsilon=4,20$;
- na podstawie jakich obliczeń stwierdzono, że bariera energetyczna w mechanizmie rodnikowym zależy od odległości Ni_P-Co.;
- wyjaśniając różnice pomiędzy obliczeniami teoretycznymi a eksperymentem dotyczącymi efektów energetycznych reakcji Autorka pisze, że przyczyną tej różnicy może być koszt energetyczny deprotonacji. Czy próbowano wyznaczyć sumaryczny efekt posługując się danymi literaturowymi lub obliczeniami własnymi?

Uwagi ogólne

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na liczne błędy edytorskie, jakich dopatrzyłam się w trakcie lektury pracy:

- błędy ortograficzne: str. 26 bierzący – bieżący, str. 66 gęstością – gęstościom;
- błędy interpunkcyjne:
 - brak przecinków przed któr(y)(a)(e), np. str. 11, 29, 38, 59;
 - brak przecinków przed że, żeby np. str. 17, 27, 38, 51, 73, 74;
 - brak przecinków oddzielającego zdania wtrącone np. str. 10, 13;
- brak cytowań: str. 43, 55, 56;
- błędy korektorskie str. 16 – funkcjoanty, str. 17 – wewnętrzu, rozpuszczenej, str. 27 bazy fukcyjnej, str. 28 wygenerowana, czętseczki, str. 32 czy..., str. 38 więsz..., str. 51 powoduję, mychanizmy, str. 55 czynnikiem, str. 56 najprawdopodobniej, str. 63 zbizać, str. 66 przeniesieni..., str. 7- argumanty;
- małe, a tym samym nieczytelne rysunki/tablice np. Rys. 2.1, Rys. 5.9, Tablica 5.4;
- nieprecyzyjne opisy rysunków np. Rys. 3.3 (brak oznaczenia miejsca M_p), Rys. 5.12 (niewidoczna legenda, brak opisu poszczególnych części rysunku);
- brak odniesienia do Rys. 3.4 w tekście;
- brak uzasadnienia umieszczenia Rys. 5.6 na str. 32;
- opisując różnice w modelu M2 i M3 zastosowano duży skrót myślowy, z którego wynika, że to model M2 zawiera argininę;
- złe cytowania tabel np. str. 48 (ma być tablica 5.11);
- zły zestaw rysunków pod krzywą na Rys. 5.21;
- nieuzasadnione użycie dużej litery dla „Mechanizm reakcji”;
- nieprecyzyjne sformułowania np. str. 38 „wpływ stałej dielektrycznej w obliczeniach PCM jest niewielki”, str. 51 „przesunięcie wartości E₀”, str. 59 „wyznaczono energię”, str. 63 „bariera reakcji dla odległości 7 Å wynosi ...”.

Zdaniem recenzenta konieczna jest korekta edytorska pracy, przed jej upublicznieniem i pozostawieniem jej do wglądu dla innych adeptów badań naukowych.

Powyższe uwagi nie wpływają jednak na wartość merytoryczną recenzowanej rozprawy.



Podsumowanie.

Syntaza acetylokoenzymu A, będąca przedmiotem badań Autorki rozprawy odgrywa ważną rolę w metabolizmie. Uczestniczy w przemianie tlenowej sacharydów w Cyklu Krebsa, w syntezie kwasów tłuszczowych oraz w syntezie steroidów. Poznanie mechanizmu działania tych układów jest nieodzownym elementem potrzebnym do zrozumienia wielu procesów metabolicznych, a w przyszłości dającym możliwość potencjalnego zastosowania enzymów w procesach pozaustrojowych. Aby taki cel osiągnąć nieodzownym staje się poznanie na poziomie molekularnym korelacji pomiędzy strukturą enzymów a ich aktywnością. Wiąże się to z koniecznością użycia obok badań doświadczalnych, prowadzonych przy użyciu różnych technik, również badań teoretycznych. W świetle podanych powyżej faktów wybór tematu rozprawy doktorskiej i narzędzi badawczych stosowanych w rozprawie doktorskiej uważam za bardzo trafny i celowy.

Pani Aleksandra Chmielowska szczegółowo przeanalizowała różne formy (geometryczne i elektronowe) klastru A. Do opisu poszczególnych etapów trafnie wybrała nie tylko metody teoretyczne, ale i parametry, które pozwoliły jej na wskazanie, jakie elementy struktury geometrycznej/elektronowej badanych układów decydują o ich reaktywności. Autorka rozprawy pokazała, że z przeprowadzonej analizy potrafi wysuwać poprawne wnioski i umiejętnie korzysta z wiedzy zdobytej na poszczególnych etapach badań.

Na podstawie powyższej sformułowanych faktów stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska „Kwantowochemiczne obliczenia właściwości strukturalnych i elektronowych oraz reaktywności klastru A w syntazie acetylokoenzymu A”, spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę o dopuszczenie mgr Aleksandry Chmielowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Renata
Tolwar-Sobieraj*