

Bírálat

Dr. Oláh Julianna:

Átmenetifém-tartalmú biológiailag aktív rendszerek reaktivitása
c. MTA doktori értekezéséről

Oláh Julianna doktori értekezésében a PhD fokozat megszerzése óta eltelt időszakban elért eredmények közül azokat foglalta össze, melyek átmenetifémeket tartalmazó enzimek és komplexek reaktivitására irányuló számításon alapuló kémiai tanulmányaiból származnak. Ilyen irányú kutatásait a Bristol Egyetemen kezdte el, ahol Marie Curie ösztöndíjasként dolgozott Jeremy Harvey kutatócsoportjában. 2009 óta a BME VBK Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékén végez önálló kutatásokat alapvetően az enzim modellezés területén. A kutatások elméleti jellegűek, azokban a számításon alapuló kémia különböző szintű módszerei (MM, MD, DFT, QM/MM, kinetikai szimulációk) kerülnek alkalmazásra. Fő motiváció a gyógyszerkémiai szempontból fontos enzimkatalitikus folyamatok mechanizmusának feltárása, és ezáltal a kísérletileg észlelt reaktivitások és szelektivitások értelmezése, adott esetben új kísérletek tervezése. Enzimek reaktivitásának modellezése rendkívül izgalmas, napjainkban is gyorsan fejlődő kutatási terület, mely komoly elméleti kémiai felkészültséget valamint széleskörű kémiai és biológiai ismereteket igényel.

Oláh Julianna a szóban forgó időszak alatt több mint 40 cikket publikált javarészt rangos folyóiratokban. Az értekezés tárgyát 15 tanulmány képezi, melyek túlnyomó többségében a jelölt meghatározó szerzőként szerepel jelezvén, hogy az önálló kutatói tevékenységhez nem férhet kétség. Oláh Julianna már több éve egy kutatócsoportot vezet, és kiemelő, hogy a doktori disszertáció témájához kapcsolódóan három PhD munkának is témavezetője volt. Az értekezésben feldolgozott publikációk egy része (a bristoli munkák) jelentős visszhangra talált a szakirodalomban (70-150 független hivatkozás), a többi cikkre viszont egyenlőre nem érkezett nagyszámú hivatkozás (jellemzően 3-10, még a 2010-es évek közepén publikált munkákra is). Nem kétséges azonban, hogy mindez megfelelő alapot szolgáltat az MTA doktori cím megszerzésére.

Maga a dolgozat egy 135 oldalas, logikusan felépített, jól szerkesztett összefoglaló munka, melyben a szerző bevezetesként bemutatja a munka előzményeit, a motivációkat, az együttműködő partnereket, majd a módszertani részben áttekinti a DFT módszerek átmenetifémeket tartalmazó rendszerekre történő alkalmazásának főbb kihívásait, illetve a QM/MM számításokhoz használt protokoll egyes lépéseit. Ezt követően az eredmények négy egymástól tematikailag

jól elkülöníthető fejezetben (3-6. fejezetek) kerülnek bemutatásra. Mindegyik fejezetben az olvasó számára figyelemfelkeltő és nagyon hasznos felvezetés található, mely ismerteti az adott tématerülethez kapcsolódó kutatások jelentőségét, és megfogalmazza a vizsgált tudományos kérdéseket. Az alfejezetekben a szerző az egyes cikkek anyagát dolgozza fel általában megfelelő egyensúlyt tartva a tömörség és az érthetőség kívánalmai között. Ez azonban úgy tűnik nem könnyű feladat, mert például a humán aromataz enzimreakció mechanizmusát bemutató 3.4. fejezet (két hosszabb lélegzetű cikk anyaga) túl tömörre sikeredett (a cikkeket átnézve persze sok érdekes részletre és eredményre fény derül a mechanizmus kapcsán), ugyanakkor a 4.1. fejezetben egy meglehetősen régi (2009-es), a maga idejében persze nagyon hasznos DFT benchmark tanulmány pedig teljes részletességgel tárgyalva van. A formai értékeléshez még hozzáfűzném, hogy a dolgozatban viszonylag sok szerkesztési hibát és elírást találtam, de szerencsére azok nem zavarják az olvasást és az érthetőséget.

Az eredményeket bemutató részben a dolgozatban először a citokróm P450 (CYP) enzimek reaktivására és az általa katalizált folyamatok mechanizmusára irányuló tanulmányok diszkussziójáról olvashatunk (3. fejezet). MD szimulációk és QM/MM számítások segítségével tanulmányozták különböző CYP izoformák Fe(IV)-oxo centrumainak elektronszerkezetét és azok oxidáló képességét, és több CYP enzim által katalizált anyagcsere folyamat (dextrometorfán metabolizmusa, ösztrogének lebomlása és bioszintézise) kulcsfontosságú elemi lépéseit is felderítették. A tanulmányok fontos eredménye, hogy ezekben a katalitikus oxidációs folyamatokban sikerült azonosítani a regioszelektivitásért felelős tényezőket, illetve az aromataz enzim katalitikus ciklusában olyan új mechanizmus útvonalakat találtak, melyek összhangban vannak a legújabb kísérleti megfigyelésekkel.

A dolgozat 4. fejezete kétatomos gázmolekulák (CO, NO és O₂) és hemfehérjék kölcsönhatásával foglalkozik. Egy korai munkában tesztelték néhány GGA és hibrid típusú DFT funkcionál teljesítőképességét Fe(II)- és Fe(III)-iont tartalmazó hemmodellek spinállapotaira illetve NO kötési energiáira, és az eredmények jól rávilágítottak ezen DFT módszerek pontatlanságaira. Később megmutatták, hogy a vashoz koordinálódó NO molekulát a NADH kofaktor fehérje környezetben is a nitrogén atomon redukálja kedvezőbben. Érdekes tanulmánynak tartom a mioglobint és gázmolekulákat magában foglaló MD szimulációkat, melyek eredményei alapján sikerült felépíteni egy olyan kinetikai modellt, mely szerint a gázok fehérjébe történő diffúziójának sebességi együtthatója megbecsülhető. Három bakteriális H-NOX fehérjében is vizsgálták gázok diffúzióját, és sikerült feltérképezni a legfontosabb gáz vándorlási útvonalakat illetve a gáztárolásra alkalmas fehérje zsebeket.

Az 5. fejezet egy széleskörű együttműködés közös eredményeit, pontosabban azok számításos részeit dolgozza fel. A közös munka során az izopropil-malát dehidrogenáz enzim mutációk szerkezetét és aktív centrumainak katalitikus hatását vizsgálták. A QM/MM számítások ebben az esetben is nagyon hasznos új ismereteket szolgáltatottak a szubsztrát (izopropil-malát) oxidatív dekarboxilációjának elemi lépéseiről, az aktív hely közelében található Mn^{2+}/Mg^{2+} és K^+ kationok szerepéről, továbbá egyes aminosav egységek katalitikus hatásáról. A számítások segítségével sikerült feltárni az oxidáció proton- és hidridtranszfer lépéseinek részleteit, és az egyes aminosav oldalláncok protonáltsági állapotára kapott eredmények is értékesnek tekinthetők.

Oláh Júlia az utóbbi néhány évben egy ígéretes biomimetikus ammóniaszintézisre irányuló rendszer (négyfogú EP_3 ligandumot tartalmazó vaskomplex) katalitikus ciklusának rendkívül összetett mechanizmusával is foglalkozott, és az ide vonatkozó eredményeket a dolgozat 6. fejezetében foglalta össze. A soklépéses, számos alternatív reakció útvonalat és több lehetséges spin állapottal rendelkező köztiterméket magába foglaló ciklus alapos feltérképezése, és megbízható szabadentalpia profiljának kiszámítása komoly teljesítményként értékelhető. Ezek az új eredmények nagyban elősegítik a megértést a vizsgált katalitikus rendszer korlátait és a továbbfejlesztés lehetőségeit illetően. Az autokatalitikus hidrogénfejlődési reakció (aHER) hipotézis eredeti ötletnek számít, amit sikerült DFT számításokkal és mikrokinetikai szimulációkkal is alátámasztani, és vélhetően hasznosan felhasználható majd a katalízis hatékonyságának növeléséhez. A mikrokinetikai szimulációknál a kísérleti adatokhoz történő paraméter illesztések, és azt követő analízis az egész tanulmány nagyon fontos részét képezik.

A dolgozat egy átfogó értékeléssel zárul, melyben a jelölt tömören összegzi a legfontosabb eredményeket. A kitekintés rész kicsit rövidre sikeredett. Nem esik szó további tervekről, nem derül ki, hogy mely kutatási irányokban várhatók még megoldásra váró feladatok. A tézisek egy jól összeállított külön dokumentumban kaptak helyet. A tézispontok tartalmával teljes mértékben egyetértek és azokat feltétel nélkül mind elfogadom.

A részleteket illetően az alábbi megjegyzésekkel, kérdésekkel fordulok a jelölthöz. A kérdések inkább szakmai kíváncsiságból, mint kritikai célzattal merültek fel bennem a dolgozat olvasása közben.

- 1) A kvantumkémia számításokban használt DFT módszerek tesztelése többször is szóba kerül a dolgozatban, és a kapott eredmények jól rávilágítanak az energia becslések bizonytalanságára. Kissé meglepő számomra, hogy a tanulmányok túlnyomó többségében a B3LYP funkcionált alkalmazták (gyakran diszperzió korrekció nélkül), és a modernebb hibrid meta-GGA funkcionálok (Truhlar vagy Head-

Gordon féle funkcionálok) nem vagy csak elvétve kerültek alkalmazásra illetve tesztelésre. Mi az oka annak, hogy a B3LYP funkcionál ilyen sokáig népszerű maradt a fémtartalmú enzimek reakcióinak kvantumkémiai tanulmányozásában? Mennyire fontos a diszperziós kölcsönhatások figyelembe vétele az ilyen jellegű tanulmányokban. Megbízhatóbb közelítő funkcionálok fejlesztése napjainkban is aktív kutatási terület. Léteznek olyan friss benchmark tanulmányok átmenetifém rendszerekre melyek segítenek eligazodni pontosabb (de nagyobb rendszerekre is felhasználható) funkcionálok kiválasztásában?

- 2) A dolgozat 3.1. fejezetében bemutatott tanulmányban különböző CYP izoformák Cpd I állapotainak elektronszerkezetét és oxidáló képességét hasonlították össze, és arra a következtetésre jutnak, hogy azok között nincs jelentős különbség, vagyis ez nem lehet meghatározó tényező az izoformák szelektivitását illetően. A tanulmányból ugyanakkor kiderül (1. táblázat), hogy a P450cam enzim esetében a porfingyűrűre és a kén atomra számolt $\rho(\text{por})$ és $\rho(\text{S})$ spinsűrűségek jelentősen eltérnek a többi, emberi izoformákra számolt értékektől. Ennek mi lehet az oka?
- 3) Az ösztrogének metabolizmusának régiószelektivitását tárgyaló 3.3. fejezetben három ösztrogénszármazék (ösztron, equilin és equilenin) 2- és 4-hidroxilációs reakcióinak mechanizmusát vizsgálták. Egyszerű (a fehérje környezetet magába nem foglaló) Cpd I modelleken végzett DFT számítások eredményei (a két hidroxilációs útvonalra számolt aktiválási gátak, és a reaktivitást jellemző Fukui indexek) jó összhangban vannak az enzimkatalizált reakciókra mért 2-OH:4-OH termékarányokkal. A dolgozatban leírtak szerint (44. oldal) a számított és a mért termékarányokból származtatott gátkülönbségekre „nemcsak a trend egyezik meg, hanem szinte kvantitatív egyezést is találunk”. Ugyanakkor a 3. táblázatban szereplő aktiválási energia adatok (mért: -1.3, -0.5 és >0.8 kcal/mol; számolt: 1.4, 1.4 és 4.1 kcal/mol) ezt nem nagyon támasztják alá. Kifejtené, hogy fenti állítást hogyan kell értelmezni?
- 4) A 4.1. fejezetben a nitrogén-monoxid kötési energiájára vonatkozó tanulmányokkal kapcsolatban az alábbi kérdések merülnek fel: a) Mi lehet az oka annak, hogy a NO-ra kapott kötési entalpia becslések jóval pontatlanabbak, mint a CO és O₂ molekulákra kapott DFT eredmények? (50. oldal, irodalmi eredményekre való hivatkozások); b) A kis modell rendszerekre (Model 1-3) végzett benchmark számítások hibabecslései mennyire ültethetők át nagyobb Fe(porfin)-NO rendszerekre?; c) Konceptuálisan mennyire megalapozott az az eljárás, hogy a Kohn-

Sham pályákból felépített determináns hullámfüggvényt használjuk referenciaként a csatolt-klaszter sorfejtésben?

- 5) Az 5.1. fejezetben leírtak szerint az izopropil-malát dehidrogenáz (IPMDH) enzim által katalizált oxidációs folyamat modellezésénél a QM/MM számításokhoz az MD szimulációkból választottak különböző kiindulási szerkezeteket (konkrétan hármát), és ezekre egyenként meghatározták az aktiválási gátakat. A leírás szerint ezek a szerkezetek konformációjukban térnek el, de az nem derül ki (számomra még a D10-es cikkből sem), hogy pontosan miről van szó. Miben különbözik a három szerkezet? Csak az enzimmagkörnyezetben, az oldalláncok konformációiban, vagy pedig a szubsztrát molekula konformációjában is vannak különbségek? Mennyire önkényes vagy triviális ez a kiválasztás? A számolt energiaprofilokon mindenesetre viszonylag nagy eltérések adódnak, és mindhárom esetben a ketocsoportot tartalmazó köztitermék keletkezése endoterm folyamatnak bizonyul, és így vélhetően a dekarboxilációs lépés adja a teljes folyamat termodinamikai hajtóerejét. Alátámasztható ez számításokkal? Az 5. fejezet végén található összegzésben javaslatot tesznek a teljes katalitikus ciklus mechanizmusára, ami azt sugallja, hogy a dekarboxilezési folyamatra is vannak mechanizmus ismeretek.
- 6) A káliumion szerepét tárgyaló fejezetben (5.2. fejezet) a QM/MM eredmények értelmezésénél (80. oldal) olvasható, hogy az IMPDH enzim vad típusában a hidridiont fogadó C₄ szénatom pozitívabb, és így a hidridion felvétele könnyebb, mint a mutáns enzimben. A 11. táblázat utolsó sorában található Mulliken töltés adatok ennek ellenkezőjét mutatják (vad típusban negatívabb a C₄ szénatom). Félreérték én itt valamit?
- 7) Végül a 6.3. fejezetben bemutatott mikrokinetikai szimulációkkal kapcsolatban a következőket szeretném megkérdezni: Mennyire ad egyértelmű megoldást az az illesztési eljárás amit a kinetikai modell paramétereinek a kísérleti adatokhoz való illesztésénél alkalmaztak? Elegendő kísérleti adat állt rendelkezésre a nagyszámú paraméter illesztéséhez? Mennyire állja meg a helyét az a feltételezés amit az illesztési eljárásban alkalmaztak, miszerint a DFT számított gátak ± 3 kcal/mol hibahatáron belül vannak?

Összegzésként megállapíthatom, hogy Oláh Julianna a PhD fokozat megszerzése óta magas színvonalú és eredményes kutatómunkát végzett az alkalmazott elméleti kémia területén. A benyújtott disszertáció jól összefoglalja az új eredményeket, melyek jó része neves nemzetközi folyóiratban került publikálásra. A bemutatott tanulmányok nagyban elősegítik az átmenetifémeket

tartalmazó enzimek és biomimetikus rendszerek reaktivitásának értelmezését, és hasznos útmutatóul szolgálhatnak további kutatásokhoz, fejlesztésekhez. Mindezek alapján Oláh Julianna „Átmenetifém-tartalmú biológiailag aktív rendszerek reaktivitása” című MTA doktori értekezését nyilvános vitára alkalmasnak tartom, és messzemenően támogatom az MTA doktora cím odaítélését.

Budapest, 2022. május 18.



Pápai Imre