

prof. dr hab. Jan Antosiewicz  
Zakład Biofizyki,  
Instytut Fizyki Doświadczalnej  
Wydział Fizyki,  
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 2022-08-07

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej pani mgr. Patrycji Wójcik,

*Bakteryjne  $\Delta^1$ -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe – struktura,  
mechanizm reakcji i zastosowanie w biokatalitycznym odwodornieniu  
leków steroidowych,*

przygotowanej w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im.  
Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem  
prof. dr. hab. Macieja Szaleńca i prof. dr. hab. Andrzeja Bojarskiego.

### Uwagi wstępne

Rozprawa doktorska mgr. Patrycji Wójcik ma formę monografii naukowej napisanej w języku polskim. Liczy 149 stron, na których zawarto 5 rozdziałów, poprzedzonych Spisem Treści, streszczeniami w języku polskim i angielskim, oraz opisem używanych skrótów. Na końcu Rozprawy zamieszczono listę cytowanej literatury, liczącą 147 pozycji oraz opis dorobku naukowego Doktorantki. Na dorobek ten składa się 6 prac opublikowanych w czasopismach znajdujących się na Liście Filadelfijskiej, jedno zgłoszenie patentowe oraz 23 prezentacje na konferencjach naukowych, w większości międzynarodowych. Opis dorobku przedstawia również staże zagraniczne, kursy i szkolenia odbyte przez Doktorantkę.

Wedle opisu dorobku naukowego zamieszczonego w Rozprawie, z jej tematyką związane jest pięć z sześciu opublikowanych prac:

1. P. Wójcik, M. Głanowski, A. M. Wojtkiewicz, A. Rohman, M. Szaleńiec, *Universal capability of 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenases to catalyze  $\Delta^1$ -dehydrogenation of C17-substituted steroids*, *Microb. Cell Fact.*, 20 (2021) 119/1-12; (IF2021 =5.328 by WOS<sup>1</sup>, ref. 142<sup>2</sup>)

---

<sup>1</sup>Web of Science

<sup>2</sup>numer oznacza pozycję publikacji w spisie literatury cytowanej w Rozprawie

2. M. Glanowski, P. Wójcik, M. Procner, T. Borowski, D. Lupa, P. Mielczarek, M. Oszajca, K. Świderek, V. Moliner, A. J. Bojarski, M. Szaleniec, *Enzymatic  $\Delta^1$ -Dehydrogenation of 3-Ketosteroids - Reconciliation of Kinetic Isotope Effects with the Reaction Mechanism*, ACS Catal., 11 (2021) 8211-8225; (IF2021 = 13.084 by WOS, ref. 145)
3. M. Wojtkiewicz, P. Wójcik, M. Procner, M. Flejszar, M. Oszajca, M. Hochołowski, M. Tataruch, B. Mrugała, T. Janeczko, M. Szaleniec, *The efficient  $\Delta^1$ -dehydrogenation of a wide spectrum of 3-ketosteroids in a broad pH range by 3-ketosteroid dehydrogenase from Sterolibacterium denitrificans*, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 202 (2020) 105731/1-10; (IF2020 = 4.292 by WOS, ref. 141)
4. M. Tataruch, P. Wójcik, A. M. Wojtkiewicz, K. Zaczyk, K. Szymańska, M. Szaleniec, *Application of Immobilized Cholest-4-En-3-One  $\Delta^1$ -Dehydrogenase from Sterolibacterium Denitrificans for Dehydrogenation of Steroids*, Catalyst, 10 (2020) 1460/1-13; IF2020 = 4.146 by WOS
5. K. Sofińska, A. M. Wojtkiewicz, P. Wójcik, O. Zastawny, M. Guzik, A. Winiarska, P. Waligórski, M. Cieśla, J. Barbasz, M. Szaleniec, *Investigation of quaternary structure of aggregating 3-ketosteroid dehydrogenase from Sterolibacterium denitrificans: In the pursuit of consensus of various biophysical techniques*, BBA - Gen. Subjects, 1863 (2019) 1027-1039; (IF2019 = 3.77 by WOS, ref. 108)

Poza publikacją nr. 4 z powyższej listy, pozostałe prace są w rozprawie cytowane. Natomiast szóstą pracą z dorobku naukowego mgr. Patrycji Wójci: E. Stepinac, N. Landrein, D. Skwarzyńska, P. Wójcik, J. Lesigang, I. Lučić, C. Y. He, M. Bonhivers, D. R. Robinson, G. Dong, *Structural studies of a novel extended synaptotagmin with only two C2 domains from Trypanosoma brucei*, iScience, 24 (2021) 102422/1-37; IF2021 = 5.458 by WOS, nie jest związana z tematyką rozprawy doktorskiej.

Trzeba tu podkreślić, że dorobek publikacyjny mgr. Patrycji Wójcik pod względem rangi czasopism, w których ukazały się prace z Jej współautorstwem, jest imponujący. Tak to można ocenić nawet jeśli najprawdopodobniej to nie na Niej spoczywała główna odpowiedzialność za doprowadzenie procedur akceptacji złożonych manuskryptów do pomysłych finałów. Na uznanie zasługuje również to, że mgr. Wójcik podjęła się trudu przygotowania Rozprawy w postaci niezależnej monografii, zamiast skorzystać z możliwości przedstawienie jej jako zbioru opublikowanych prac, któremu towarzyszą autorskie omówienie i oświadczenia współautorów o zakresie ich udziału. Forma prezentacji Rozprawy wybrana przez mgr. Wójcik daje większe możliwości oceny wysiłku włożonego przez Doktorantkę w

realizację projektu doktorskiego i poznania tego projektu z Jej osobistej perspektywy. Można jednak zauważyć, że w niektórych fragmentach Rozprawa wygląda jak tłumaczenie tekstu z oryginalnych publikacji, w których mgr. Wójcik jest współautorem, a ponadto wiele rysunków w Rozprawie jest "żywcem" wziętych z tych publikacji, bez wskazywania źródła. To nie powinno mieć miejsca.

Chwaląc Autorkę za wybór formy Rozprawy chciałbym jednak zauważyć, że Rozprawa nie jest napisana z myślą o możliwie szerokim kręgu czytelników. W szczególności ja miałem w wielu miejscach sporo trudności ze zrozumieniem tego co czytam. Oczywiście w jakiejś mierze wynika to z faktu, że nie jestem specjalistą dokładnie w zakresie tematyki rozprawy. Żeby wyjaśnić moje zastrzeżenia posłużę się następującymi przykładami.

- We wprowadzeniu do Rozdziału 1.1 mamy nazwę " $\Delta^1$ -Dehydrogenazy 3-ketosteroidowe" i Rysunek 1 przedstawiający wzory strukturalne jednego z substratów i otrzymanego z niego produktu. Mnie osobiście sprawiło kłopot dowiedzenie się co znaczy symbol " $\Delta^1$ ". Po dość długich poszukiwaniach odkryłem, że " $\Delta^1$ -3-ketosteroid" to 3-ketosteroid mający w pierścieniu A, pokazanym na Rysunku 1, wiązanie podwójne między pozycją 1 i 2, że " $\Delta^4$ -3-ketosteroid" to 3-ketosteroid mający w pierścieniu A wiązanie podwójne między pozycją 4 i 5, itd. W końcu domyśliłem się, że w nazwie " $\Delta^1$ -Dehydrogenazy 3-ketosteroidowe" symbol " $\Delta^1$ " odnosi się do tego, że produkt reakcji z udziałem enzymu jest  $\Delta^1$ -3-ketosteroidem, a następnie mogłem zauważyć, że badane substraty to albo 3-ketostereoidy, albo  $\Delta^4$ -3-ketosteroidy. Sądzę, że jedno zdanie wyjaśniające znaczenie symbolu " $\Delta^1$ " w omawianym fragmencie Rozprawy byłoby bardzo pomocne nie tylko dla mnie.
- Zanim udało mi się poczynić opisane powyżej ustalenia, sporo kłopotów ze zrozumieniem tego co czytam sprawiło mi określenie "synteza  $\Delta^1$ -dehydro-3-ketosteroidów z wykorzystaniem  $\Delta^1$ -KSTD", gdyż słowo "synteza" jest używane w Rozprawie jako synonim odwodornienia czy dehydrogenacji. Poszukiwałem więc w rozprawie odpowiednika Rysunku 1, w którym byłaby zilustrowana owa "synteza". Ponieważ, jak się okazuje, zarówno substraty jak i produkty reakcji prowadzonych przez badane w omawianym projekcie doktorskim dehydrogenazy są 3-ketosteroidami, nazwanie procesu katalizowanego przez te enzymy "syntezą" wydaje mi się niewłaściwe. Badane dehydrogenazy katalizują względnie niewielką przemianę w substratach. Być może moje zastrzeżenie co do nazwania tego "syntezą" wynika z tego, że nie jestem chemikiem.

- Na stronie 43 we fragmencie omawiającym kinetyczny efekt lepkości rozpuszczalnika znajdujemy następujące zdanie: *W obu przypadkach można wykluczyć wpływ procesów dyfuzyjnych na tworzenie i rozpad kompleksów E:S i E:P*. Rodzi to następujące pytanie: jaka jest zatem w przypadku, do którego odwołuje się mgr. Wójcik, fizyczna natura procesu prowadzącego, na przykład, do utworzenia kompleksu enzym:substrat i jak należy go nazwać?
- Wątpliwości moje budzi nazywanie strukturą czwartorzędową form dehydrogenaz jakie powstają w wyniku agregacji. Zgodnie z rekomendacją IUPAC *Quaternary structure means the defined organization of two or more macromolecules with tertiary structure such as a protein that are held together by hydrogen bonds and van der Waals and coulombic forces*. Moje rozumienie tej rekomendacji jest takie, że nazwa ta nie odnosi się do struktur powstających w przypadkowych procesach asocjacji, zachodzących w warunkach nadmiernego stężenia czy obecności czynników denaturujących. Oczywiście agregaty można opisywać za pomocą pojęć mających związek z ogólną nazwą struktura, ale mówienie o strukturze czwartorzędowej jest chyba niepoprawne.
- Trudno jest zrozumieć to co w Rozprawie odnosi się do kinetyki w stanie przedstacjonarnym badanej w spektrometrze zatrzymanego przepływu, gdyż Autorka nie pokazuje żadnych przebiegów czasowych, a jedynie pisze, że dopasowywano do nich funkcję mono (strony 55 i 64) lub dwueksponencjalną (strona 57), przy okazji używając nazwy *obserwowana szybkość* zamiast *obserwowana stała szybkości*. Nazwanie obserwowanej stałej szybkości  $\lambda$  wartością własną bez jakichkolwiek wyjaśnień jest moim zdaniem zupełnie niepotrzebnym wprowadzaniem wątków, w żadnym zakresie nie rozwijanych ani w Rozprawie, ani w publikacjach mgr. Wójcik. Pomiarów metodą zatrzymanego przepływu były wykorzystywane przy przygotowywaniu publikacji 2 i 3 z powyższej listy publikacji mgr. Wójcik. Wydaje się, że "krzywe postępu reakcji" zarejestrowane w spektrometrze zatrzymanego przepływu pojawiają się jedynie w pracy opublikowanej w ACS Catalysis dotyczącej dehydrogenazy KSTD1. Znajdujemy je tam na Rysunku S22. Znajdujemy tam w legendzie Rysunku zdanie: *Thick red lines represent the best predictions from the two equilibrium steps kinetic model*. Natomiast istota tego modelu nie jest przedstawiona ani w dodatki ani w artykule głównym. Co do analizy wiarygodności modelu dwueksponencjalnego wobec innych funkcji eksponencjalnych, to w pracy w ACS pojawia się m.in. określenia AICc (pewno chodzi o AIC od ang. Akaike Information Criterion, co znaczy małe "c" nie wiem), ale chyba tylko w odniesieniu do wyboru modelu reakcji w oparciu o wyniki pomiarów stacjonarnych, przy czym przedstawienie wykorzystania metody Akaike jest bardzo lakoniczne. W Rozprawie symbol AICc pojawia się raz, w Tabeli 16 na

stronie 116, bez jakichkolwiek wyjaśnień. Metodę Akaike można wykorzystać również w analizie danych pokazanych na Rysunku S22 w ACS Catalysis, ale interpretacja wyników w języku stałych szybkości elementarnych etapów zachodzących procesów jest pewno niełatwa z uwagi na to, że stałe szybkości w stanie przedstacjonarnym zależą od czasu. Problemy, na które wskazałem mają charakter techniczny. Recenzenci tak znaczącego czasopisma jak ACS Catalysis powinni jednak dopilnować by w zaakceptowanym do druku manuskrypcie ich nie było. Nawiasem mówiąc, na podstawie lektury Rozprawy i różnych publikacji do których zajrzałem przy okazji przygotowywania niniejszej recenzji, wygląda na to, że społeczność badaczy zajmujących się fizkochemicznymi badaniami dehydrogenaz jest zupełnie nieświadoma istnienia takich programów jak Kin-Tek Kennetha Johnsona czy Dyna-Fit Petra Kuzmicka, które powinny stanowić podstawę analizy eksperymentów równowagowych i kinetycznych. Ja używam Dyna-Fita, który jest darmowy dla użytkowników akademickich. Pożyteczny przykład wykorzystania tego programu w badaniach enzymów można znaleźć w artykule opublikowanym w Biochemistry 2016, 55, 5279-5288.

- Niektóre stężenia są podane w rozprawie jako stężenia procentowe (w/v). Zglądając do Wikipedii czytamy: *Stężenie procentowe – jeden ze sposobów wyrażenia stężenia substancji w mieszaninie (najczęściej w roztworze), poprzez przedstawienie ułamka masowego, ułamka objętościowego bądź innego w postaci procentowej.* I dalej mamy, pośród różnych innych możliwości, ”stężenie procentowe masowo-objętościowe”, o którym czytamy: *Wyrażone w procentach stężenie masowe (stosunek masy substancji do objętości roztworu) nazywane jest stężeniem procentowym masowo-objętościowym (procentem masowo-objętościowym). Oznaczane jest symbolem „% m/V” i określa liczbę części masowych substancji przypadających na 100 części objętościowych mieszaniny, przy czym najczęściej stężenie to wyrażane jest liczbą gramów substancji przypadającą na 100 ml roztworu. Stąd 0,9% m/V roztwór chlorku sodu (roztwór soli fizjologicznej) będzie zawierał 0,9 g NaCl w 100 ml roztworu. Zapis taki jest jednak nieprawidłowy z uwagi na to, że stężenie masowe jest wielkością mianowaną, a przy pomocy procentów wyraża się jedynie wartości bezwymiarowe. Dlatego też stężenie masowe powinno być wyrażane poprzez jednostkę, a nie procent masowo-objętościowy (% m/V).* Mgr. Wójcik wprowadzając po raz pierwszy stężenie procentowe wagowo-objętościowe w swojej rozprawie (str. 47) nie precyzuje w jakich jednostkach określane są masa i objętość. Zatem pozostawia to domysłem czytelnika. Oczywiście, można założyć, że jest tak jak w przytoczonym powyżej tekście z Wikipedii. Równie dobrze jednak można przyjąć, że Doktorantka używa w Rozprawie jednostek SI, gdyż w takich jednostkach jest podana lepkość roz-

tworu na stronie 120, a więc mielibyśmy liczbę kilogramów przypadającą na 1 metr sześcienny roztworu (a może powinniśmy wziąć 100 m<sup>3</sup>?), co zwiększa wartość procentową dziesięciokrotnie.

- Na stronie 36 mamy dziwną matematykę odnoszącą się do równania II i założenia stanu stacjonarnego. Są to równania XI – XIII. Po pierwsze równanie XI jest zapisane w postaci

$$\frac{[ES]}{dt} = 0$$

chyba chodziło Autorce o

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

dalej powinno być

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E]_f[S]_f - (k_{-1} + k_2)[ES]$$

z wprowadzonymi indeksami dolnymi  $f$ , które powinny się pojawić we wcześniejszych równaniach, albo ich nigdzie nie powinno być, które Autorka rozбивa na dwa oddzielne równania

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E]_f[S]_f$$

oraz

$$-\frac{d[ES]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

gdzie dodałem symbol wzięcia pochodnej nieobecny w Rozprawie, co formalnie daje w połączeniu z poprzedzającym równaniem, że

$$k_1[E]_f[S]_f = 0 \quad \text{oraz} \quad (k_{-1} + k_2)[ES] = -0$$

z czego o dziwo Autorka tworzy równanie XIV, a równie dobrze mogłaby utworzyć równanie

$$\frac{d[ES]}{dt} = -\frac{d[ES]}{dt}$$

Na koniec Autorka nazywa  $K_m$  stałą kinetyczną, choć nie ma ona w swoim wymiarze odwrotności czasu. W książce G. G. Hammesa, "Enzyme catalysis and regulation", na stronie 40 jest napisane: *The Michaelis constant is not an equilibrium constant, but a steady-state constant measuring the ratio  $[E][S]/X$  in the steady state* (u innych ten X to kompleks ES).

- na stronie 37 Autorka napisała, że stałą Michaelisa definiuje się jako stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji jest równa połowie maksymalnej szybkości reakcji enzymatycznej, uzyskanej w warunkach wysycenia substratem. To jest nieprawda. Stałą Michaelisa definiuje równanie XVI z poprzedzającej strony. Natomiast napotyka się w literaturze stwierdzenie przedstawione w Rozprawie, jako interpretację fizyczną stałej Michaelisa. Równanie XIX, podobne do równania X, nazwanego przez Autorkę równaniem MM, nie ma nazwy w Rozprawie, a często właśnie to równanie nazywane jest równaniem MM.
- Na stronie 14, rozdział 1.1.1 zaczyna się od zdania: *Steroidy są związkami szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie. Stanowią one podstawowy składnik komórek eukariotycznych (bakteryjnych, grzybiczych oraz zwierzęcych), a także roślinnych.* To drugie zdanie zawiera błędy rzeczowe: komórki bakteryjne nie są komórkami eukariotycznymi.

Tego typu usterek w Rozprawie jest więcej. Oprócz przedstawionych powyżej przykładów, mamy są też usterki, które mają one charakter niedociągnięć natury technicznej (jak brak cytowania dla niektórych stwierdzeń, niejednorodności w symbolach, np.  $\nu$  dla szybkości reakcji i dla częstości drgań), używanych nazw (jak mutaina zamiast mutanta) czy stosowania pewnych "skrótów myślowych" (jak na przykład używanie określenia entalpii swobodnej ( $\Delta G$ ) wiązania substratu z enzymem, gdy powinno się mówić o standardowej energii swobodnej Gibbsa, zwanej przez niektórych standardową entalpią swobodną), które utrudniają czytanie ze zrozumieniem.

## Merytoryczna ocena Rozprawy

W moim odczuciu, rozprawa doktorska mgr. Patrycji Wójcik jest w zasadzie pracą o  $\Delta^1$ -dehydrogenazie 3-ketostereoidowej z bakterii *S. denitrificans*, nazwanej w Rozprawie AcMB, z szerokim odniesieniem do  $\Delta^1$ -dehydrogenazy z bakterii *R. erythropolis*, nazwanej w rozprawie KSTD1, opartym zarówno o literaturę jak i o wyniki badań własnych, i z marginalnym odniesieniem do niewielkiej liczby innych  $\Delta^1$ -dehydrogenaz. Te odniesienia do innych  $\Delta^1$ -dehydrogenaz znajdujemy prawie wyłącznie w pierwszym rozdziale, jest też coś o nich na stronie 111. Mamy wiele rozdziałów z użyciem nazwy  $\Delta^1$ -KSTD, ale w rozdziałach tych jest o AcMB lub KSTD1. Z tego względu tytuł Rozprawy, *Bakteryjne  $\Delta^1$ -dehydrogenazy 3-ketostereoidowe – struktura, mechanizm reakcji i zastosowanie w biokatalitycznym odwodornieniu leków steroidowych*, wydaje mi się skrojony "na wyrost", gdyż zapowiada badania bakteryjnych  $\Delta^1$ -dehydrogenaz 3-ketostereoidowych w znacznie

szerszym ujęciu. Odnoszę jednak wrażenie, że mgr. Wójcik postrzega swoją Rozprawę właśnie jako pracę o bakteryjnych  $\Delta^1$ -dehydrogenazach w ogólności i tytuł został przez Nią przemyślany. Przykład rozdźwięku, pomiędzy tymi domniemywanymi przeze mnie intencjami i ograniczeniem w zasadzie do dwóch enzymów, widoczny jest w trzech miejscach w Rozprawie (strony 8, 101 i 109), gdzie Autorka pisze o weryfikacji hipotezy zakładającej, że *zdolność do odwodornienia C17-rozgałęzionych 3-ketosteroidów posiadają tylko nieliczne  $\Delta^1$ -KSTD*. Oczekiwałbym więc obszernej listy  $\Delta^1$ -dehydrogenaz 3-ketosteroidowych, nie posiadających tej zdolności i znacznie skromniejszej listy  $\Delta^1$ -dehydrogenaz 3-ketosteroidowych tę zdolność posiadających. Zamiast tego, mgr Wójcik proponuje weryfikację powyższej hipotezy wykonując pomiary kinetyczne dla Acmb i KSTD1 wobec androst-4-en-3,17-dionu i cholest-4-en-3-onu. Dla mnie *nieliczne* to przykładowo 5 na 100 lub też 1 na 10, więc dwa enzymy to stanowczo zbyt mało by można było mówić o weryfikacji takiej hipotezy.

Jak już wspomniałem, moje krytyczne uwagi dotyczą głównie spraw o charakterze technicznym, których wyeliminowanie wymaga żmudnych i czasochłonnych działań redaktorskich. Niewątpliwą wartością Rozprawy mgr. Wójcik jest to, że jest ona bardzo bogata pod względem liczby użytych w badaniach metod z dziedziny biologii molekularnej i fizykochemii. Jednocześnie mgr Wójcik zaznacza, które z przedstawianych w Rozprawie wyników były owocem pracy współautorów wspólnych publikacji, a zostały włączone do Rozprawy dla zachowania kompletności wywodów. Przyjąłem więc, że wszystkie pozostałe eksperymenty i analizy były wykonane przez mgr. Wójcik. Zakres prac wykonanych przez mgr. Wójcik przy realizacji Jej projektu doktorskiego obejmuje między innymi:

- opracowanie metodologii otrzymywania enzymu Acmb na drodze ekspresji w komórkach *Escherichia coli*, procesy oczyszczania i deagregacji uzyskanego białka;
- otrzymanie kryształów Acmb i określenie jego struktury z rozdzielczością atomową;
- pomiary aktywności Acmb i KSTD1 z wykorzystaniem spektrometrów UV-Vis i spektrometru zatrzymanego przepływu;
- przeprowadzenie charakterystyki biochemicznej i kinetycznej Acmb, w tym zbadanie zależności od temperatury i pH;
- analizę mechanizmu dehydrogenacji katalizowanej przez Acmb w oparciu o ukierunkowana mutagenezę, określenie kinetycznego efektu izotopowego i kinetycznego efektu lepkości rozpuszczalnika;



- przeprowadzenie analizy ilościowej steroidów metodami chromatografii i spektrometrii mas;
- optymalizację warunków reakcji dehydrogenacji katalizowanej przez AcMB

Zakres tych prac i liczba użytych metod analitycznych i biochemicznych imponuje. Ponadto widoczne jest, że mgr. Wójcik prowadzi swoje badania zgodnie z metodologiami opisywanymi w opublikowanych pracach innych autorów, które cytuje w swojej Rozprawie. Tak więc nie mam wątpliwości, że ta Rozprawa zasługuje na dopuszczenie jej Autorki do publicznej obrony tej Rozprawy. Chciałbym jednak tę merytoryczną ocenę Rozprawy poświęcić zagadnieniom, które są najbliższe moim zainteresowaniom naukowym i dydaktycznym. Są to zagadnienia związane z analizą mechanizmów procesów biomolekularnych, w tym zależności katalizy enzymatycznej od pH i roli dyfuzji w tworzeniu kompleksów spotkaniowych receptor-ligand. Poniższa dyskusja jest bardzo długa, ale mam nadzieję, że będzie dla mgr. Wójcik pożyteczną lekturą, bez względu na to czy przyjmie moje komentarze za słuszne czy też nie. Jest oczywiste, że nie we wszystkim muszę mieć rację.

### Zagadnienie mechanizmu reakcji dehydrogenaz - uwagi ogólne

Ponieważ nie jestem enzymologiem i ponadto sporo informacji z przeczytanych artykułów i książek gdzieś się zawierusza w mojej pamięci, zaskoczyło mnie nazywanie mechanizmu działania badanych przez mgr. Wójcik enzymów słowami "Ping Pong Bi Bi". To co miałem w pamięci to nazwa "ping-pong" bez dodatku "bi bi", w odniesieniu do oksydazy cholesterolowej opisanej w pracy *Single-Molecule Enzymatic Dynamics*, autorstwa H. Peter Lu, Luying Xun, X. Sunney Xie, w *SCIENCE* (282:1877-1882, 1998). Podobnie jak  $\Delta^1$ -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa, oksydaza cholesterolowa zawiera kofaktor FAD, który ulega redukcji podczas utlenienia cząsteczki cholesterolu. Powrót FADu do stanu utlenionego odbywa się poprzez reakcję z tlenem cząsteczkowym.

Wykonałem małe śledztwo i ustaliłem, że nazwę Ping Pong bi bi, jak również inne w tym duchu nazwy, wprowadził W. W. Cleland w publikacji zamieszczonej w *Biochimica et Biophysica Acta* (1963, 67:104-137) noszącej tytuł: *The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations.* W pracy Clelanda znajdujemy: *a reaction with two substrates and two products will be called Bi Bi and spoken of as being bireactant in both directions*. Brakuje nam jeszcze określenia "Pig Pong", które znajdujemy w dalszej części publikacji Clelanda. Mianowicie, na stronie 106, w ostatnim paragrafie, czytamy: *The order of addition of substrates and release of products within*

*the reaction sequence will be described as follows: Mechanisms where all substrates must add to the enzyme before any products are released will be designated "sequential". Such mechanisms will be called "Ordered" if the substrates add in obligatory order and the products leave similarly, and "Random" if the substrates do not react in obligatory order and alternate reaction sequences exist. When one or more products are released before all substrates have added to the enzyme, the enzyme will exist in two or more stable forms between which it oscillates during the reaction. **Such mechanisms will be called "Ping Pong", and if the mechanism is not obvious it will be further described by the use of Uni, Bi, Ter, to indicate the successive groups of substrate additions and product dissociations that occur.***

W świetle tej lektury, określanie mechanizmu badanej dehydrogenazy nazwą "Ping Pong bi bi" wydało mi się nieporozumieniem – dehydrogenaza z FADem zredukowanym nie przeprowadzi reakcji ze steroidem. Zatem mechanizm katalizy prowadzonej przez dehydrogenazę jest jasny i w pełni określony przez nazwę "Ping Pong", dalsze uszczegółowienie wprowadza jedynie niepotrzebne zamieszanie. Innymi słowy reakcja dehydrogenazy składa się z dwóch połówek, zarówno pierwsza połówka jak i druga połówka mają po jednym substracie i jednym produkcie. Enzym ma również dwie formy, jedna jest w stanie przeprowadzić pierwszą połówkę reakcji, a druga drugą.

Stosowanie nazwy "Ping Pong bi bi" dla opisu mechanizmu działania  $\Delta^1$ -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej przestało wydawać mi się nieporozumieniem, gdy w dalszej części pracy Clelanda odkryłem, że używa on tej nazwy dla określenia mechanizmu działania aminotransferaz (transaminaz) – enzymów katalizujących procesy transaminacji. Enzymy te są odpowiednikami dehydrogenaz czy oksydaz, tyle że mają inny koenzym. Pozostałem więc z zagadką czy jest jakiś enzym z kofaktorem, dla którego mechanizmu działania wystarcza nazwa "ping pong" bez dodatków. Ten wątek wprowadziłem do recenzji aby pokazać, że przywołanie publikacji Clelanda z 1963 roku miałyby dużą wartość dydaktyczną.

## **Zagadnienie zależności of pH**

Bardzo ważnym osiągnięciem mgr. Wójcik w realizacji projektu doktorskiego jest ustalenie metodami ukierunkowanej mutagenezy, że tyrozyna 363 pełni kluczową rolę dla procesu katalitycznego prowadzonego przez AcnB. Przy okazji zwrócmy uwagę, że Autorka pisze (strona 31) iż "Mutagenezą nazywa się technikę ...", co wprowadza w błąd. Mutageneza to zarówno spontaniczny jak i wywołany przez mutageny proces powstawania zmian – mutacji w DNA, nie jest więc żadną tech-

niką. Aby zdanie było poprawne musi zaczynać się: "Ukierunkowaną mutagenezą nazywa się technikę ...". Mutacje zostały przeprowadzone również dla tyrozyn 115, 118, 467 i 536 oraz glicyny 540, co pozwoliło mgr. Wójcik wnioskować o roli tych aminokwasów w katalizie dehydrogenazy AcnB. To co mnie najbardziej zainteresowało, to stwierdzenie, że tyrozyna 363 jest zdeprotonowana i że w tym stanie zdeprotonowanym stabilizuje ją tyrozyna 118. Nie ma mowy w Rozprawie o tyrozylinie 318 z dehydrogenazy KSTD1, odgrywającej rolę tyrozyny 363 w AcnB. W publikacji w ACS Catalysis, w której mgr Wójcik jest drugim autorem, rozważane są dwa alternatywne mechanizmy katalizy, jeden ze zdeprotonowaną i drugi z uprotonowaną tyrozyliną 318.

Standardową metodą badania mechanizmów reakcji enzymatycznych w kontekście udziału reszduów uczestniczących w równowagach kwasowo-zasadowych, jest metoda opisana na przykład w klasycznych już pracach K. F. Tiptona i H. B. F. Dixona, *Effects of pH on Enzymes*, opublikowanej w *Methods in Enzymology* (63:83–234, 1979) oraz W. W. Cleland, *The Use of pH studies to Determine Chemical Mechanism of Enzyme-Catalyzed Reactions*, opublikowanej w *Methods in Enzymology* (87:390–469, 1982). Natomiast wydaje się, że społeczność badaczy dehydrogenaz w ogóle analiz opisanych w przywoływanych artykułach z *Methods in Enzymology* nie prowadzi.

Aby rozważyć zależność katalizy enzymatycznej od pH w sposób przedstawiony w pracy Tiptona i Dixona oraz w pracy Clelanda, możemy rozważyć enzym, który ma w miejscu aktywnym dwa aminokwasy z protonowalnymi grupami bocznymi, z których jedna musi być zdeprotonowana, a druga musi być uprotonowana, aby zachodziła reakcja katalizowana przez ten enzym. Reakcję enzymu z dwiema grupami protonowalnymi przedstawia Rysunek 1.

Na Rysunku tym:

$$K_A^E = \frac{[\text{EH}^-][\text{H}^+]}{[\text{EH}_2]} \quad \text{i} \quad K_B^E = \frac{[\text{E}^{-2}][\text{H}^+]}{[\text{EH}^-]}$$

oraz

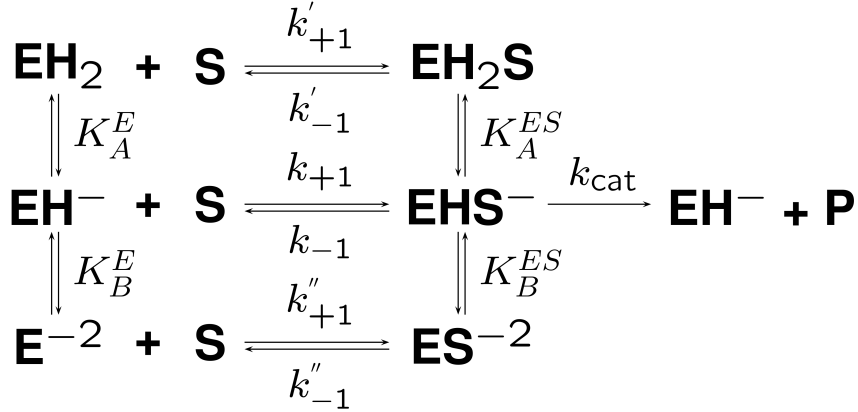
$$K_A^{ES} = \frac{[\text{EHS}^-][\text{H}^+]}{[\text{EH}_2\text{S}]} \quad \text{i} \quad K_B^{ES} = \frac{[\text{ES}^{-2}][\text{H}^+]}{[\text{EHS}^-]}$$

Szybkość reakcji określona jest równaniem

$$v = \frac{d[\text{P}]}{dt} = k_{cat}[\text{EHS}^-]$$

Zgodnie z prawem zachowania masy zachodzi

$$[\text{E}]_o = [\text{EH}^-] + [\text{EH}_2] + [\text{E}^{-2}] + [\text{EHS}^-] + [\text{EH}_2\text{S}] + [\text{ES}^{-2}]$$



Rysunek 1: Reakcje enzymu z dwiema grupami protonowalnymi.

Uwzględniając równowagi protonacyjne zamieniamy to na

$$[\mathbf{E}]_o = [\mathbf{EH}^-] \left( 1 + \frac{[\mathbf{H}]^+}{K_A^E} + \frac{K_B^E}{[\mathbf{H}]^+} \right) + [\mathbf{EHS}^-] \left( 1 + \frac{[\mathbf{H}]^+}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[\mathbf{H}]^+} \right)$$

Zmiana w czasie stężenia  $[\mathbf{EHS}^-]$  jest określona wzorem

$$\frac{d[\mathbf{EHS}^-]}{dt} = -(k_{cat} + k_{-1})[\mathbf{EHS}^-] + k_{+1}[\mathbf{EH}^-][\mathbf{S}]$$

W stanie stacjonarnym stężenie  $[\mathbf{EHS}^-]$  jest stałe więc z przyrównania prawej strony powyższego równania do zera dostajemy wyrażenie na wartość  $[\mathbf{EHS}^-]$

$$[\mathbf{EHS}^-] = \frac{k_{+1}[\mathbf{EH}^-][\mathbf{S}]}{k_{cat} + k_{-1}} = \frac{[\mathbf{EH}^-][\mathbf{S}]}{K_M}$$

a z równania na zachowania masy dostajemy

$$[\mathbf{EH}^-] = \frac{[\mathbf{E}]_o - [\mathbf{EHS}^-] \left( 1 + \frac{[\mathbf{H}]^+}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[\mathbf{H}]^+} \right)}{\left( 1 + \frac{[\mathbf{H}]^+}{K_A^E} + \frac{K_B^E}{[\mathbf{H}]^+} \right)}$$

Wstawiając to do poprzedniego równania mamy

$$[\mathbf{EHS}^-] = \frac{[\mathbf{E}]_o - [\mathbf{EHS}^-] \left( 1 + \frac{[\mathbf{H}]^+}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[\mathbf{H}]^+} \right)}{\left( 1 + \frac{[\mathbf{H}]^+}{K_A^E} + \frac{K_B^E}{[\mathbf{H}]^+} \right)} \frac{[\mathbf{S}]}{K_M}$$

i rozwiązując ze względu na  $[EHS^-]$  dostajemy

$$[EHS^-] = \frac{[E]_o[S]}{K_M \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^E} + \frac{K_B^E}{[H]^+}\right) + [S] \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[H]^+}\right)}$$

co przekształcamy do postaci

$$[EHS^-] = \frac{[E]_o[S] \cdot \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[H]^+}\right)^{-1}}{K_M \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^E} + \frac{K_B^E}{[H]^+}\right) \cdot \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[H]^+}\right)^{-1} + [S]}$$

i zależność szybkości reakcji od pH określa wzór

$$v(\text{pH}) = \frac{k_{cat} \cdot \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[H]^+}\right)^{-1} \cdot [E]_o[S]}{K_M \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^E} + \frac{K_B^E}{[H]^+}\right) \cdot \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[H]^+}\right)^{-1} + [S]}$$

mamy więc zależne od pH  $V_{max}^{app}$ ,  $K_M^{app}$  i  $k_{cat}^{app}$  oraz  $k_{cat}^{app}/K_M^{app}$ :

$$V_{max}^{app} = k_{cat} \cdot \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[H]^+}\right)^{-1} \cdot [E]_o$$

$$K_M^{app} = K_M \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^E} + \frac{K_B^E}{[H]^+}\right) \cdot \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[H]^+}\right)^{-1}$$

$$k_{cat}^{app} = k_{cat} \cdot \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[H]^+}\right)^{-1}$$

oraz

$$\frac{k_{cat}^{app}}{K_M^{app}} = \frac{k_{cat}}{K_M \left(1 + \frac{[H]^+}{K_A^E} + \frac{K_B^E}{[H]^+}\right)}$$

Jak widać niektóre z tych wielkości zależą od stałych protonacji zarówno w swobodnym enzymie jaki i w kompleksie enzym-substrat, a inne tylko od stałych w swobodnym enzymie lub w kompleksie. Oczywiście, możemy skonstruować inne modele i dla nich interpretować zależności kinetyki enzymu od pH, ale wydaje mi się, że tego typu postępowanie jak to opisane powyżej, powinno być standardem. Natomiast, mgr Wójcik ogranicza swoje analizy do dyskusji optymalnych wartości pH. Tak czyni wielu badaczy, na przykład autorzy cytowanych w Rozprawie prac [33, 38-42]. Fakt, iż optimum pH katalizy prowadzonej przez  $\Delta^1$ -dehydrogenazy znajduje się w zakresie od 7 do 10, według mgr. Wójcik jest argumentem na poparcie tezy, że w katalizie uczestniczy zdeprotonowana tyrozyna. Natomiast powyższa

dyskusja wokół Rysunku 1 sugeruje, że taka interpretacja położenia optimum wydajności katalitycznej na skali pH nie może być podstawą do wyciągania takich wniosków.

Opierając się na modelu przedstawionym na Rysunku 1, dla którego parametry charakteryzujące zależność aktywności enzymu od pH mają kształt krzywej dzwonek, a takie zależności znajdujemy w Rozprawie na Rysunku 38, widzimy, że dla aktywności ważna jest deprotonacja w okolicy pH=6 i że deprotonacja w okolicy pH 9 prowadzi do utraty zdolności enzymu do katalizy. Również obserwowana stała szybkości reakcji oznaczona na Rysunku 39 symbolem  $\lambda_1$  wydaje się mieć charakter krzywej dzwonek jako funkcja pH, z pierwszą deprotonacją poniżej pH 7.5. To podważa słuszność hipotezy o udziale w reakcji zdeprotonowanej tyrozyny. Z drugiej strony, mgr Wójcik pokazuje i jest to bardzo wartościowy wynik, że optimum pH  $\Delta^1$ -dehydrogenacji katalizowanej przez AcnB zmierzone w stanie stacjonarnym silnie zależy od zastosowanego akceptora elektronowego i waha się w zakresie od 6.5 do 9.0, co próbuje tłumaczyć oddziaływaniami między tym drugim substratem (akceptorem elektronowym) a zredukowanym FADem, stanowiącym integralną część enzymu. Mgr Wójcik pisze na stronie 99 następująco: *Ciekawa jest obecność dwóch optimumów pH, które można zaobserwować na Rys. 38A, w przypadku użycia mieszaniny dwóch akceptorów elektronowych. Pierwsze maksimum wydaje się być związane z reutlenianiem enzymu przez DCPIP (pH 6,5), a drugie przez PMS (pH 8,0–9,0). Zjawisko to może być związane z oddziaływaniami elektrostatycznymi pomiędzy akceptorem a zredukowanym FAD. Według literatury w pH 6,5 zredukowany flawohydrochinon nie posiada ładunku ( $pK_a = 6,7$ ), natomiast w pH 8,0–9,0 występuje w postaci anionu  $FADredH_2^-$  (Rys. 41) [139].* Mgr Wójcik nie ma racji pisząc, że skoro  $pK_a$  wynosi 6.7, to w pH 6,5 mamy do czynienia wyłącznie ze stanem uprotonowanym. Wartość  $pK_a=6.7$  oznacza, że w pH 6.7 mamy po 50% każdego stanu i że w pH 5.7 populacja stanu uprotonowanego osiąga 90%. Model na Rysunku 1 może być zastosowany w analizie wyników pokazanych na Rysunku 38 w Rozprawie:  $pK_a$  widoczne w okolicy pH 6, odnosi się do FADu, co wymaga zaakceptowania w modelu przedstawionym na Rysunku 1, że grupy enzymu uczestniczące w katalizie nie muszą być grupami należącymi do aminokwasów obecnych w łańcuchu polipeptydowym białka. Mogą to być jak się okazuje również kofaktory. Natomiast sprawą otwartą pozostaje identyfikacja residuum, którego deprotonacja w pH w okolicy 9 prowadzi do utraty aktywności enzymu.

Ciekawe są również wyniki pokazane na Rysunku 39 na stronie 98, przedstawiające zależność od pH w zakresie 7.5-10 dwóch obserwowanych stałych szybkości  $\lambda_1$  i  $\lambda_2$  otrzymanych z eksperymentów zatrzymanego przepływu. Mgr. Wójcik przypisuje detekcję dwóch obserwowanych stałych szybkości reakcji obecności dwóch form

białka – zdeagregowanego i zagregowanego. Jak pisze: *Dla pierwszego, szybszego z procesów, optimum pH wyniosło 9,0. Z kolei wolniejszy proces postępował najszybciej w pH 7,5. Gdyby zsumować stałe uzyskane dla obu procesów, całkowita szybkość reakcji pozostaje niezmienna w zakresie pH 7,5–9,0. Dopiero wzrost pH do 10,0 powoduje niewielki spadek aktywności  $A_{cmB}$ .* Mgr. Wójcik nazywa te obserwowane stałe szybkości reakcji wartościami własnymi szybkości redukcji FAD, ale nie przedstawia żadnego uzasadnienia dla takiej interpretacji. Jak już wspomniałem, przywoływanie pojęcia wartość własna jest w kontekście materiału przedstawionego w Rozprawie niepotrzebnym otwieraniem nowych wątków. Wystarczyłoby po prostu napisać, że fitowanie przebiegów czasowych sygnałów rejestrowanych w eksperymencie zatrzymanego przepływu wymagało sumy dwóch funkcji eksponencjalnych. Jeśli piszę o uzasadnienie interpretacji parametrów  $\lambda_i$  jako wartości własnych, to mam na myśli postępowanie analogiczne do przedstawionej poniżej analizy reakcji enzymatycznej przebiegającej wg. mechanizmu Michaelis-Menten w warunkach pseudo-pierwszego rzędu, bez założenia stanu ustalonego, natomiast przy przyjęciu, że stężenie substratu jest tak duże, iż w praktyce pozostaje stałe.

W klasycznej kinetyce MM zaniedbującej efekty dyfuzyjne, mamy do rozwiązania następujący układ sprzężonych nieliniowych równań różniczkowych:

$$\begin{aligned} \frac{dc_{ES}}{dt} &= -\frac{dc_E}{dt} = k_1 c_E c_S - (k_{-1} + k_{cat}) c_{ES} \\ \frac{dc_S}{dt} &= -k_1 c_E c_S + k_{-1} c_{ES} \\ \frac{dc_P}{dt} &= k_{cat} c_{ES} \end{aligned}$$

Układu tego nie da się rozwiązać w sposób analityczny. Przyjmijmy, że  $(c_E(t), c_{ES}) \ll c_S(t) \approx c_{S,0} \equiv s_e = \text{const.}$  Wtedy musimy usunąć z naszego układu równanie na  $dc_S/dt$  i wprowadzić  $s_e$  do pierwszego równania:

$$\begin{aligned} \frac{dc_{ES}}{dt} &= k_1 s_e c_E - (k_{-1} + k_{cat}) c_{ES} \\ \frac{dc_P}{dt} &= k_{cat} c_{ES} \end{aligned}$$

Z zasady zachowania masy mamy

$$c_E + c_{ES} = c_{E,0}$$

możemy więc w pierwszym równaniu wprowadzić  $c_E = c_{E,0} - c_{ES}$  i zapisać

$$\begin{aligned} \frac{dc_{ES}}{dt} &= -(k_1 s_e + k_{-1} + k_{cat}) c_{ES} + k_1 s_e c_{E,0} \\ \frac{dc_P}{dt} &= k_{cat} c_{ES} \end{aligned}$$

Jest to niejednorodny układ liniowych równań różniczkowych pierwszego rzędu, który możemy przedstawić w następującej postaci macierzowej

$$\begin{pmatrix} \frac{dc_{ES}}{dt} \\ \frac{dc_P}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(k_1 s_e + k_{-1} + k_{cat}) & 0 \\ k_{cat} & 0 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} c_{ES} \\ c_P \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} k_1 s_e c_{E,0} \\ 0 \end{pmatrix}$$

Rozwiązujemy najpierw układ jednorodny metodą Eulera szukając rozwiązań w postaci

$$c_{ES} = \chi_{ESE} e^{\lambda t} \quad \text{i} \quad c_P = \chi_{PE} e^{\lambda t}$$

skąd, po podstawieniu rozwiązania do układu jednorodnego, mamy

$$\begin{pmatrix} \frac{d\chi_{ESE} e^{\lambda t}}{dt} \\ \frac{d\chi_{PE} e^{\lambda t}}{dt} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} (k_1 s_e + k_{-1} + k_{cat}) & 0 \\ -k_{cat} & 0 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \chi_{ESE} e^{\lambda t} \\ \chi_{PE} e^{\lambda t} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

Obliczamy pochodne, dzielimy równania obustronnie przez  $e^{\lambda t}$  i porządkujemy zapis:

$$\begin{pmatrix} (k_1 s_e + k_{-1} + k_{cat}) + \lambda & 0 \\ -k_{cat} & \lambda \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \chi_{ES} \\ \chi_P \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

Równanie charakterystyczne ma zatem postać

$$\lambda(k_1 s_e + k_{-1} + k_{cat} + \lambda) = 0$$

skąd mamy dwa pierwiastki

$$\lambda_1 = 0 \quad \text{i} \quad \lambda_2 = -(k_1 s_e + k_{-1} + k_{cat})$$

I to są właśnie parametry, które możemy nazwać wartościami własnymi. Jeśli mgr Wójcik chciałaby odwoływać się do koncepcji wartości własnych przy przedstawianiu wyników swoich badań, to powinna zaprezentować w Rozprawie jakiś odpowiednik powyżej przedstawionych rozważań.

W końcu z badaniami zależności od pH wiąże się wyznaczanie punktu izoelektrycznego białek (pI) i ciekawym wynikiem przedstawionym przez mgr. Wójcik jest spora różnica pI między monomerem dehydrogenazy AcMB (pI=8.6) i agregatem (około pI=4.7-5.2), oryginalnie badanie w pracy nr 5 na liście publikacji mgr. Wójcik (BBA General Subjects, 2019). W Rozprawie w zasadzie nie ma interpretacji tego faktu. Dyskusja przesuwania pI wskutek agregacji jest przedstawiona w pracy w BBA-GS w rozdziale: *Shift of isoelectric point upon aggregation*. Brak takiej dyskusji w Rozprawie może świadczyć o tym, że rozważania te nie były



autorstwa Doktorantki lecz innych współautorów z tej publikacji. Natomiast, rozważania przedstawione w publikacji w BBA GS moim zdaniem sporo by zyskały gdyby autorzy zbadali jak duże musiałyby być przesunięcia  $pK_a$  jonizowalnych reziduwów w dehydrogenazie Acmb w agregacie w stosunku do monomeru, aby zaobserwować przesunięcie  $pI$  z 9 do 5. A być może przesunięcie to wynika z uwięzienia jonów o ładunku ujemnym w agregatach? Na te pytania można chyba dość łatwo odpowiedzieć wykonując odpowiednie obliczenia z wykorzystaniem dostępnych programów do elektrostatyki molekularnej

### Zagadnienie zależności od lepkości ośrodka

Wydaje się, że głównym źródłem z jakiego korzystała mgr Wójcik w Rozprawie przy analizie kinetycznego efektu lepkości rozpuszczalnika (KSVE) jest referencja 98 (G. Gadda i P. Sobrado, *Biochemistry* 57:3445-3453, 2018). Natomiast jeśli chodzi o publikacje mgr. Wojcik, to zagadnienie KSVE jest rozważane jedynie w publikacji z ACS Catalysis. Rozważania te dotyczą wyłącznie dehydrogenazy KSTD1. W Rozprawie cytowane są jeszcze dwie prace przy okazji omawiania zagadnień KSVE, ale nie są one cytowane w ACS Catalysis.

Gadda i Sobrado wyznaczają  $k_{cat}$  oraz  $k_{cat}/K_m$  dla różnych wartości lepkości rozpuszczalnika  $\eta$ , a następnie definiują dla nich odpowiednie znormalizowane parametry kinetyczne  $k$  ( $k_{cat}$  lub  $k_{cat}/K_m$ ):

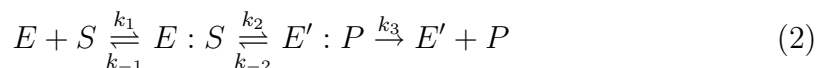
$$\frac{(k_{cat})_0}{k_{cat)_\eta} \quad \text{oraz} \quad \frac{(k_{cat}/K_m)_0}{k_{cat}/K_m)_\eta}$$

Te znormalizowane parametry kinetyczne  $k$  są następnie przez nich analizowane jako liniowe funkcje lepkości właściwej  $\eta_{rel} - 1$

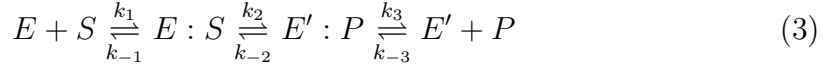
$$\frac{(k)_0}{(k)_\eta} = m(\eta_{rel} - 1) + 1 \quad (1)$$

gdzie  $\eta_{rel}$  jest lepkością względną czyli stosunkiem lepkości rozpuszczalnika z dodanym czynnikiem zwiększającym lepkość do lepkości samego rozpuszczalnika bez dodatku tego czynnika. W Rozprawie pokazany jest powyższy wzór z  $(k_{cat})_0/(k_{cat})_\eta$  po lewej stronie, jako równanie XXX.

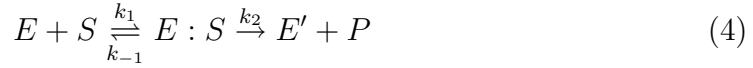
Gadda i Sobrado nie pokazują wyprowadzenia tych liniowych zależności. Pokazują natomiast, choć bez wyprowadzenia, związki tych parametrów kinetycznych ze stałymi szybkości w równaniu reakcji enzymatycznej, analogicznym do równania XXV z Rozprawy:



które jest rozszerzeniem klasycznego równania reakcji enzymatycznej Michaelisa-Menten. Dla kompletności przytoczmy jeszcze dwa analogiczne równania z Rozprawy, Równanie I:



i Równanie II:



Idąc śladem wywodów Gaddy i Sobrado, mgr Wójcik przyjmuje, że drugorzędową stałą szybkości tworzenia kompleksu pomiędzy cząsteczką enzymu i cząsteczką substratu można opisać za pomocą równania Smoluchowskiego:

$$k_1 = 4\pi N_0 r_0 (D_A + D_B)$$

gdzie  $N_0$  jest liczbą Avogadro,  $r_0$  – sumarycznym promieniem reagujących cząsteczek, a  $D_X$  współczynnikiem dyfuzji cząsteczki  $X$ . To nie jest poprawnie przedstawiony wzór Smoluchowskiego, choć jest to forma podana w pracy G. Gadda i P. Sobrado, cytowanej jako pozycja 98 w Rozprawie. Chodzi tu o to, że równanie powinno być zapisane w jakimś powszechnie przyjmowanym układzie jednostek, np. SI lub cgs.

Jeśli wyprowadzamy wzór Smoluchowskiego wyrażając stężenia w liczbie cząsteczek na  $\text{cm}^3$ , wtedy otrzymamy

$$k_1 = 4\pi r_0 (D_A + D_B)$$

wyrażone w jednostkach  $\text{cm}^3(\text{molekuła})^{-1}\text{sek}^{-1}$  (w domyśle na jedną molekułę cząsteczki uznanej za receptor). Liczba Avogadro pojawia się we wzorze Smoluchowskiego, gdy  $k_1$  chcemy wyrazić w jednostkach  $\text{M}^{-1}\text{sek}^{-1}$ . Wymaga to pomnożenia poprzedniego  $k_1$  przez  $10^{-3}N_0$ , gdyż jedna molekuła to  $1/N_0$  mola, a w litrze jest  $1000 \text{ cm}^3$ , czyli wzór Smoluchowskiego przyjmuje postać

$$k_1 = 4\pi 10^{-3} N_0 r_0 (D_A + D_B)$$

i wtedy  $k_1$  jest wyrażone w  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Przy okazji można wspomnieć, że wzór na stałą szybkości dysocjacji, współgrający ze wzorem Smoluchowskiego, wyprowadził Manfred Eigen, w pracy *Über die Kinetik seher schnell verlaufender Ionenreaktionen in wässriger Lösung*, Z. physik. Chem., tom 203, str. 176-200, 1954:

$$k_{-1} = \frac{3(D_A + D_B)}{r_0^2}$$

Otrzymujemy zatem stałą równowagi tworzenia kompleksu cząsteczek A i B w postaci:

$$K_{ass} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{4\pi(D_A + D_B)r_0}{\frac{3(D_A + D_B)}{r_0^2}} = \frac{4}{3}\pi r_0^3$$

w jednostkach [ $\text{cm}^3/(\text{molekuła})$ ]. Mnożąc tę stałą przez liczbę Avogadro  $N_0$  i dzieląc przez 1000 ( $\text{cm}^3$  na litr) dostajemy stałą równowagi w jednostkach  $1/M$ .

Mgr. Wójcik zauważa, że stałe szybkości  $k_1$ ,  $k_{-1}$  i  $k_3$  są wrażliwe na lepkość ośrodka i że zwykle zakłada się, iż etap katalizy ( $k_2$ ,  $k_{-2}$ ) pozostaje niezależny od lepkości medium reakcyjnego. Wprowadza tym trochę zamieszania, gdyż w ten sposób opuszcza swój wzór XXV i przechodzi do wzoru I ze strony 34, a więc należałoby dyskusją objąć również stałą szybkości  $k_{-3}$ . Możemy się już teraz domyślać, że Równanie (1) zostało wyprowadzone w oparciu o znajomość zależności od lepkości stałych szybkości obecnych w przyjętym równaniu reakcji enzymatycznej.

Następnie mgr. Wójcik pisze, że badając kinetyczny efekt lepkości rozpuszczalnika w katalizie enzymatycznej (KSVE) można wyznaczać parametry kinetyczne, np. stosując przybliżenie Michaelisa-Menten dla enzymu jednosubstratowego: stałej Michaelisa ( $K_m$ ) i stałej katalitycznej ( $k_{cat}$ ) w przypadku kinetyki mierzonej w stanie stacjonarnym, w roztworach o różnej lepkości. Ale tu wątek mechanizmu Michaelisa-Menten jest urwany i bez jakiegokolwiek komentarza Doktorantka przechodzi do zagadnienia badania KSVE dla reakcji opisanej Jej schematem XXV, czyli tutaj równaniem (2), dla którego, bez podania referencji czy jakiegos uzasadnienia podaje wzory na stałą katalityczną  $k_{cat}$  i odpowiednik drugorzędowej stałej szybkości  $k_{cat}/K_m$ , czyli wzory XXVII i XXVIII w Rozprawie:

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_{-2} + k_3} \quad (5)$$

oraz

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_1 k_2 k_3}{k_{-2} k_{-1} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3} \quad (6)$$

Tak zresztą czynią też Gadda i Sobrado. Analogiczne wzory, wprawdzie bez referencji, ale z klarownym uzasadnieniem pojawiają się w pracy C. Blikstad i M. Widersten'a, *Functional characterization of a stereospecific diol dehydrogenase, FucO, from Escherichia coli: Substrate specificity, pH dependence, kinetic isotope effects and influence of solvent viscosity*, opublikowanej w Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (66:148-155, 2010). Rozważają oni mechanizm podobny do tego przedstawionego w Równaniu (2), ale z dodanym jeszcze jednym na końcu etapem nieodwracalnym, a wprowadzając te równania piszą tak: *The steady-state*

rate equation for this reaction results in expressions for  $k_{cat}$  (Eq. (1)) and  $k_{cat}/K_M$  (Eq. (2)).

Oparte na założeniu *steady-state* wyprowadzenie znajdujemy w H. Gutfreund "Kinetics for the Lie Sciences" (str. 82). Punktem wyjścia u Gutfreunda jest Równanie (3). Wyprowadzenie równań kinetycznych dla tego równania reakcji jest oparte na dwóch uproszczeniach. Po pierwsze, że stężenie substratu jest zasadniczo stałe. A po drugie, że stężenie produktu jest zasadniczo zerowe. Z tymi uproszczeniami możemy zapisać

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 c_E(t) c_S(t) - (k_{-1} + k_2) c_{ES}(t) + k_{-3} c_{EP}(t) \quad (7)$$

oraz

$$\frac{dc_{EP}}{dt} = k_2 c_{ES}(t) - (k_{-2} + k_3) c_{EP}(t) \quad (8)$$

Gutfreund nie używa znaku prim. W Równaniu (8) podstawiamy  $c_{ES}$  przez wyrażenie na tę wielkość jakie możemy otrzymać z Równania (7), a następnie eliminujemy stężenie swobodnego enzymu korzystając z równania zachowania masy

$$c_E(t) = c_E(0) - c_{ES}(t) - c_{EP}(t)$$

Dostajemy z tego

$$c_{EP} = \frac{k_1 k_2 c_S(0) c_E(0) - dc_{ES}/dt}{k_2 c_S(0) (k_{-2} + k_2 + k_3) + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3} \quad (9)$$

Jeśli podstawimy wyrażenie na  $c_{EP}$  do równania na szybkość reakcji  $\frac{dc_P}{dt} = \nu = k_3 c_{EP}$ , to mamy  $C_{EP} = \nu/k_3$  i gdy przyjmijemy warunek *steady state*  $dc_{ES}/dt = 0$ , to otrzymamy

$$\frac{\nu}{c_E(0)} = \frac{k_1 k_2 k_3 c_S(0)}{k_1 c_S (k_2 + k_{-2} + k_3 + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3)} \quad (10)$$

To równanie można przerobić do formy równania MM

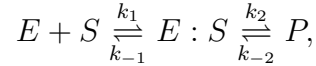
$$\frac{\nu}{V_{max}} = \frac{c_S}{K_M + c_S}$$

i stąd biorą się wzory pokazane w Równaniach (5) i (6).

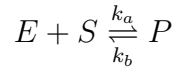
Mgr. Wójcik nie wyjaśnia dlaczego nie opisała KSVE dla prostego modelu Michaelisa-Menten. Możemy się domyślać, że nie zrobiła tego, gdyż nie pokazali tego Gadda i Sobrado. Nie pokazała też wyprowadzenia Równania (1), ani nie przywołała pracy Gaddy i Sobrado wprowadzając swoje równanie XXX. Powinna

jednak w dziele takim jak Rozprawa doktorska coś w tej kwestii uczynić, aby nie zostawiać czytelników ze wzorem zawieszonym w próżni.

Oparcie analizy zależności kinetyki enzymatycznej od lepkości dla modelu MM znajdujemy na przykład w pracy A. C. Brouwer i J. F. Kirsch, *Investigation of Diffusion-Limited Rates of Chymotrypsin Reactions by Viscosity Variation*, *Biochemistry*, 21:1302-1307, 1982. A w niej mamy wyprowadzenie na zależność od lepkości dla reakcji opisanej równaniem dokładnie odpowiadającym Równaniu (4)



Gdy rozważymy ją również jako reakcję jednoetapową :



możemy łatwo wyprowadzić związek obserwowanej stałej szybkości  $k_a$  ze stałymi szybkości reakcji dwuetapowej:

$$k_a = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$$

Brouwer i Kirsch zauważają, że stałe szybkości  $k_1$  oraz  $k_{-1}$  zależą od lepkości  $\eta$  zgodnie z równaniami

$$k_1^0 \eta^0 = k_1 \eta \quad \text{oraz} \quad k_{-1}^0 \eta^0 = k_{-1} \eta$$

skąd

$$k_a = \frac{k_1^0 \eta^0}{1 + \frac{k_{-1}^0 \eta^0}{k_2 \eta}}$$

Odwrotność tej relacji

$$\frac{1}{k_a} = \frac{1}{k_1^0 \eta^0} + \frac{k_{-1}^0}{k_1^0 k_2}$$

pokazuje liniową  $1/k_a$  zależność od lepkości względnej.

Zajrzymy też do prac J. M. Schurra, *Biophysical Journal*, 10:700-716 i 717-727, 1970. Rozważał on reakcję enzymatyczną w postaci równania analogicznego do Równania (4):



z tym, że zamiast poprzednio używanych stałych szybkości  $k_1$  i  $k_{-1}$  (patrz np. Równanie (4)) napisaliśmy  $k_f$  i  $k_b$ , które opisują tworzenie kompleksu enzym-substrat

jako wynikającego z dyfuzji i pewnych strukturalnych przemian, które zachodzą po zetknięciu się cząsteczek, a przed zajściem właściwej reakcji chemicznej katalizowanej przez enzym. Schurr wyprowadził dla  $k_f$  i  $k_b$  następujące związki

$$k_f = \frac{k_1 k_d}{k_1 + k_d} \quad i \quad k_b = \frac{k_{-1} k_d}{k_1 + k_d}$$

w których to wyrażeniach

$$k_d = 4\pi(R_A + R_B)(D_A + D_B)$$

jest dyfuzyjną stałą szybkości dla znalezienia się cząsteczek dyfundujących ze względny współczynnikiem dyfuzji  $D = D_A + D_B$  w odległości  $R = R_A + R_B$  (przyjętej jako odległość charakteryzująca wstępną formę kompleksu),  $k_1$  jest wewnętrzną stałą szybkości dla przemiany strukturalnej prowadzącej do formy gotowej do zajścia reakcji chemicznej, a  $k_{-1}$  jest wewnętrzną stałą szybkości dla przemiany strukturalnej prowadzącej od formy gotowej do zajścia reakcji chemicznej do formy, z której zachodzi dyfuzyjnie kontrolowane rozejście się cząsteczek. Dla prostoty przyjęliśmy formy równań na  $k_f$  i  $k_b$  właściwe dla sytuacji nieobecności długozasięgowego potencjału oddziaływania między cząsteczkami  $U(r)$ , który wnosi prędkość unoszenia (dodatnią lub ujemną) do procesu dyfuzyjnego zetknięcia się cząsteczek.

Jeśli  $k_d \gg k_1$  to  $k_f = k_1$  i  $k_b = k_{-1}$  i mamy “klasyczne” zachowanie układu enzym-substrat ze stałą Michaelisa

$$K_M^{class} = \frac{k_{cat} + k_{-1}}{k_1}$$

wyprowadzając równanie na  $K_M$  ze stałymi szybkości  $k_f$  i  $k_b$  dostaniemy

$$K_M = \frac{k_{cat} + k_b}{k_f} = \frac{k_{cat} + \frac{k_{-1} k_d}{k_1 + k_d}}{\frac{k_1 k_d}{k_1 + k_d}} = \frac{k_{cat}(k_1 + k_d) + k_{-1} k_d}{k_1 k_d} = K_M^{class} + \frac{k_{cat}}{k_d}$$

Można teraz zapytać jaką zależność od lepkości dla

$$\frac{(k_{cat}/K_M)_0}{(k_{cat}/K_M)_\eta}$$

przewiduje powyższe równanie. Przyjmujemy, że zależność od lepkości tkwi tylko w  $k_d$ . Otrzymujemy:

$$\frac{(k_{cat}/K_M)_0}{(k_{cat}/K_M)_\eta} = \frac{\frac{k_{cat}}{K_M^{class} + \frac{k_{cat}}{k_d^{\eta_0}}}}{\frac{k_{cat}}{K_M^{class} + \frac{k_{cat}}{k_d^\eta}}} = \frac{K_M^{class} + \frac{k_{cat}}{k_d^\eta}}{K_M^{class} + \frac{k_{cat}}{k_d^{\eta_0}}}$$

Jak pamiętamy zależność od lepkości tkwi we współczynniku dyfuzji

$$D_X = \frac{kT}{6\pi\eta r_X}$$

Wstawiając to wyrażenie do wzoru na względne  $k_{cat}/K_M$  zapewne po niełatwych przekształceniach moglibyśmy się przekonać czy dostaniemy liniową zależność od lepkości właściwej. A być może uzyskanie liniowego związku wymaga wyjścia poza model reakcji MM?

Gdyby choć próba takiej analizy została przedstawiona w Rozprawie podniosłoby to ogromnie jej wartość poznawczą. Nie mniej jednak, nawet bez tych sugerowanych przeze mnie ulepszeń i z różnymi mankamentami, z których nie wszystkie przedstawiłem w recenzji, Rozprawa doktorska mgr. Wójcik pozostaje solidnym wkładem w badania  $\Delta^1$ -dehydronaz 3-ketosteroidowych.

## Wnioski końcowe

W moim odczuciu tekst Rozprawy przygotowany przez mgr. Wójcik nie jest w wystarczającym stopniu przemyślany pod kątem niesprawiania czytelnikom kłopotu z przeczytaniem go ze zrozumieniem bez konieczności częstego zaglądania do literatury. Takie problemy zauważają czytelnicy, którzy, tak jak ja, nie są specjalistami w dziedzinie pracy naukowej Autorki. Z drugiej strony, Rozprawa jest dziełem przebogatym pod względem opisanych metod badawczych i podjętych problemów badawczych. Przygotowanie tej recenzji dało mi okazję nauczenia się wielu nowych dla mnie rzeczy.

Reasumując, przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Patrycji Wójcik stanowi sformułowanie oryginalnego problemu naukowego i przedstawia jego rozwiązanie oparte na aktualnej i rzetelnej wiedzy, a tym samym spełnia kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. z późn. Zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk, w Krakowie o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jan Antosiewicz