

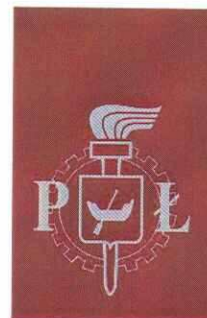
Łódź, 25.10.2018r.

PhD Thesis

Tytuł: Theoretical Studies of HIV-1 Enzymes

Autor: Agnieszka Krzemińska-Kowalska

Promotorzy: dr. inż. Katarzyna Świderek and Prof. dr. inż. Piotr Paneth



Streszczenie

Niniejsza rozprawa doktorska stawia sobie trzy główne cele: zbadanie mechanizmu reakcji katalizowanej przez proteazę (*ang.* Protease, PR), wskazanie specyficznych oddziaływań inhibitorów z odwrotną transkryptazą (*ang.* Reverse Transcriptase, RT) oraz opis mechanizmu reakcji zachodzącej w centrum aktywnym integrazy (*ang.* Integrase, IN). Wskazane enzymy są odpowiedzialne za cykl życia wirusa HIV-1 (*ang.* Human Immunodeficiency Virus), który namnażając się w komórkach gospodarza wywołuje zespół nabytego niedoboru odporności AIDS (*ang.* Acquired Immunodeficiency Syndrome). Realizacja powyższych celów wymagała sięgnięcia po narzędzia chemii obliczeniowej, w szczególności hybrydowe obliczenia kwantowo-mechaniczne (*ang.* Quantum Mechanics/Molecular Mechanics, QM/MM) pozwalające na opis złożonych układów biochemicznych.

Opis mechanizmu reakcji zrywania wiązania peptydowego katalizowanego przez asparginową proteazę wirusa HIV-1 wymagał rozważenia kilku możliwych ścieżek reakcji. Analiza uzyskanych barier energetycznych oraz obliczonych kinetycznych efektów izotopowych (*ang.* Kinetic Isotope Effects, KIEs) porównanych z literaturowymi wartościami eksperymentalnymi pozwoliła na wskazanie najefektywniejszej ścieżki reakcji oraz limitującej szybkość reakcji stanu przejściowego. Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że rola proteazy nie sprowadza się tylko do aktywowania cząsteczki wody pełniącej rolę nukleofila, ale również całe białko wytwarza pole elektrostatyczne w centrum aktywnym ułatwiające pęknięcie wiązania peptydowego. Badania nad mechanizmem działania proteazy uzupełniono o opis efektów dynamicznych uzyskanych w porównaniu do ciężkiego enzymu oraz opis kwantowego efektu tunelowania, których wpływ na katalizę w przypadku tego enzymu okazał się znikomy.

Do opisu oddziaływań odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 z zestawem inhibitorów, różne miejsca wiązania enzymu wraz z zadokowanymi wybranymi ligandami poddano długim dynamikom molekularnym MM MD (*ang.* Molecular Dynamics) oraz dynamikom QM/MM MD. Początkowo do sprawdzenia poprawności opisu użytych narzędzi teoretycznych

wykorzystano inhibitory należące do leków zatwierdzonych przez Agencję Żywności i Leków (*ang.* Food and Drug Administration, FDA), a następnie podobne analizy przeprowadzono dla szeregu pochodnych triazolowych. Dla zoptymalizowanych uprzednio podczas długich dynamik MM kompleksów ligand-białko, przeprowadzono analizy energii potencjalnych oddziaływań na podstawie dynamik QM/MM korzystając z teorii dekompozycji energii, dzięki czemu możliwe było przeanalizowanie oddziaływań ligandów z poszczególnymi aminokwasami. Wyznaczono swobodne energie wiązania za pomocą metody perturbacyjnej FEP (*ang.* Alchemical Free Energy Perturbation method) co pozwoliło na uszeregowanie ligandów względem ich powinowactwa do enzymu. Obliczone efekty izotopowe (*ang.* Binding Isotope Effects, BIEs) towarzyszące wiązaniu ligandów w enzymie, pozwoliły na rozróżnienie miejsc ich wiązania.

Tetramer integrazy wirusa HIV-1 koordynuje wirusowe DNA, dlatego też ważnym krokiem było zbadanie tych kluczowych oddziaływań. Szczegółowa analiza oddziaływań integraza-DNA pojawiających się w trakcie dynamiki MM, pozwoliła na potwierdzenie stabilności struktury i centrum aktywnego. Do opisu reakcji katalizowanych przez integrazę należało znaleźć odpowiedni poziom teorii, ze względu na złożoną budowę centrum aktywnego, dlatego przetestowano kilka metod półempirycznych (*ang.* semi-empirical methods) oraz dwa funkcyjały gęstości elektronowej (*ang.* Density Functional Theory, DFT). Zaprononowano trzy mechanizmy reakcji zrywania wiązania fosfodiesterowego pomiędzy dwoma nukleotydami (*ang.* 3'-end processing) w centrum aktywnym integrazy.

Szczegółowy opis mechanizmów reakcji proteazy oraz integrazy, jak również zbadanie oddziaływań inhibitorów z odwrotną transkryptazą uzupełnił braki w powszechnym zrozumieniu działania oraz sposobów inhibicji wirusa HIV-1 co pozwoli na racjonalne projektowanie leków nowej generacji.

Agnieszka
Krzysztof Kowalski