



Kraków, 29.12.2018

dr hab. Maciej Szaleniec, prof. IKiFP
ncszalen@cyfronet.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. „Theoretical Studies of HIV-1 Enzymes”
Pani mgr inż. Agnieszki Krzemińskiej-Kowalskiej

Praca doktorska mgr. **inż. Agnieszki Krzemińskiej-Kowalskiej** została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Piotra Panetha jako promotora oraz dr inż. Katarzyny Świderek w roli promotora pomocniczego. Celem recenzowanej rozprawy było przebadanie enzymów odpowiedzialnych za wirulencję HIV-1, a w szczególności modelowanie mechanizmu reakcji proteazy asparaginowej oraz integrazy jak również opis oddziaływań inhibitorów z centrum aktywnym odwrotnej transkryptazy.

Informacje o pracy.

Cała praca liczy 123 strony plus dodatkowy załącznik prezentujący dorobek publikacyjny i konferencyjny doktorantki. Została podzielona na 6 rozdziałów: krótkiego wprowadzenia do tematyki badań modelowych nad enzymami HIV (rozdział 1), opisu stosowanej metodyki (rozdział 2), rozdziałów poświęconych proteazie, odwrotnej transkryptazie i integracji (odpowiednio rozdziały 3, 4 i 5) oraz podsumowania całości pracy (rozdział 6). Ponieważ rozdziały 3 i 4 zawierają oryginalne publikacje, doktorantka poprzedziła je własnym wstępem. Całość pracy zamyka spis cytowanej literatury (169 pozycji), spis dorobku doktorantki (8 publikacji z listy JCR, 10 wystąpień konferencyjnych) a także, co nietypowe, reprodukcje posterów konferencyjnych.

Ocena merytoryczna rozprawy.

Właściwą część pracy rozpoczyna wprowadzający rozdział pierwszy, który nakreśla obiekt badań oraz motywację podjęcia tematyki badawczej. Następnie autorka szybko przechodzi do rozdziału 2, gdzie omówione są stosowane metody teoretyczne, tj. symulacje metodami dynamiki molekularnej, obliczenia metodą QM/MM (zarówno w ujęciu subtraktywnym jak i addytywnym, opisano również różne metody terminacji części QM oraz połączenia wpływu elektrostatyki części MM na hamiltonian w części QM) i przede wszystkim metody badania mechanizmów enzymatycznych reakcji (poprzez eksploracje powierzchni energii potencjalnej czy wyznaczenie potencjału średnich sił metodami QM/MM MD i ich korekty za pomocą punktowych obliczeń QM(DFT)/MM). W tej części czytelnik zostaje zaznajomiony również z metodami obliczeń kinetycznych efektów izotopowych zarówno dla izotopowo podstawionych reagentów jak i dla tzw. ciężkiego enzymu (co pozwala oszacować wpływ efektów dynamicznych białka na proces katalityczny). W kolejnym podrozdziale następuje opis metod wyznaczania interakcji ligand-enzym, tj. metod wyznaczania entalpii swobodnej wiązania oraz wyznaczania przyczynków elektrostatycznych i vdW oraz metod wyznaczania Binding Isotope Effect. Generalnie rozdział ten jest bardzo dobry i wprowadza w sposób dość szczegółowy czytelnika w metodologię stosowaną w pracy. Jednocześnie nie kopiuje (nadmiernie) detali

technicznych przedstawionych w poszczególnych publikacjach (takich jak szczegółowe sposoby przygotowania modeli, metod minimalizacji energii i prowadzenia samych symulacji czy obliczeń QM/MM). Mam do tego rozdziału tylko jedną uwagę. Cytowany w podrozdziale 2.4 model „zamka i klucza” Emila Fishera ma już ponad 120 lat i w żaden sposób nie odzwierciedla ani rzeczywistości ani metodologii stosowanej w dokowaniu (a tym bardziej w zaawansowanych obliczeniach stosowanych przez doktorantkę, które zarówno uwzględniają elastyczność liganda jak i białka). Jak wykazały prace min. prof. Sokalskiego czy prof. Warshela potencjał elektrostatyczny enzymu pasuje najlepiej do ESP odkształconego reagenta co ma kluczowy wpływ na stabilizację ΔG^\ddagger . Zresztą w samych obliczeniach stosowanych przez doktorantkę, a opisanych niżej, ESP obliczano dla geometrii substratu, która została uzyskana w wyniku interakcji z białkiem.

Zanim przejdę do omówienia mojej oceny merytorycznej rezultatów należy zaznaczyć, że rozdziały 3 i 4, składają się głównie z wieloautorskich publikacji. Badania dotyczące mechanizmu reakcji proteazy HIV-1 były przeprowadzone wspólnie przez doktorantkę jak i jej opiekuna pomocniczego, panią dr Katarzynę Świderek. Według informacji uzyskanych od doktorantki oraz oświadczeń autorskich załączonych do pracy osobistym wkładem pani mgr inż. Agnieszki Krzemińskiej-Kowalskiej są przede wszystkim obliczenia dynamiki molekularnej QM/MM oraz obliczenia PES i wyznaczenie optymalnego mechanizmu, obliczenia PMF z korektą spline, obliczenia BIE, EIE i KIE oraz wstępne obliczenia DFT potrzebne do przebadania efektów dynamicznych. Doktorantka brała udział również w charakterystyce efektów elektrostatycznych i wyznaczaniu ich wpływu na reakcję oraz uczestniczyła w pisaniu publikacji.

Celem rozdziału 3 było eksploracja potencjalnych ścieżek reakcji zaproponowanych w literaturze dla HIV-1 PR metodami symulacji MD bazującymi na potencjałach obliczonych metodą QM/MM oraz obliczeń pierwszorzędowego, drugorzędowego oraz enzymatycznego KIE (bezpośrednie połączenie z eksperymentem przeprowadzonym przez Schramma i wsp.) Enzymatyczny KIE miał pozwolić na przetestowanie hipotezy o roli dynamicznych efektów w katalizie. Ponadto przebadano elektrostatykę białka w celu zbadania jej wpływu na proces katalityczny (hipoteza alternatywna do hipotezy efektu dynamicznego).

W dwustronicowym stronicowym wstępie poprzedzającym publikację w JACS autorka omówiła część wyników pokazanych w publikacji bez wprowadzenia co do state-of-the-art oraz przedstawienia samego mechanizmu. Takie ułożenie treści niestety utrudnia czytelnikowi zrozumienie tego wstępu bez odwołania się do Schematu 1 w samej publikacji (w tekście brak tego odwołania). Również przedstawione na stronie 21 rysunki (Fig. 3.1 b i c) są bardzo nieczytelne ze względu na niewielki ich rozmiar (pomimo dużej ilości pustego miejsca). Podsumowując, sam wstęp zostawia spory niedosyt, który na szczęście zostaje wynagrodzony lekturą samej publikacji. Publikacja jest bowiem bardzo dobra i raportuje wyniki szczegółowej i metodycznej weryfikacji trzech, a w ostatecznym rozrachunku nawet czterech, mechanistycznych hipotez opisujących możliwe przebiegi hydrolizy wiązania peptydowego katalizowane przez proteazę HIV-1. Najbardziej energetycznie prawdopodobny okazuje się mechanizm dwuetapowy zakładający nukleofilowy atak aktywowanej cząsteczki wody na karbonylowy węgiel z jednoczesną protonacją grupy karbonylowej przez Asp(A), co prowadzi do powstania gemidiolowego produktu przejściowego. Etapem limitującym szybkość reakcji okazuje się rozpad wiązania peptydowego sprzężony z protonacją grupy aminowej przez drugą



z reszt kwasu asparaginowego. Wybór ścieżki reakcji jest również poparty obliczeniami kinetycznych efektów izotopowych uzyskanych dla znakowanego peptydu, które są porównane z wynikami analogicznego eksperymentu.

Ponieważ efekty dynamiczne i elektrostatyczne powstały przy mniejszym udziale doktorantki postanowiłem pominąć ich omawianie w recenzji. Lektura publikacji nasunęła mi kilka pytań, o których odpowiedź prosiłbym w czasie obrony:

Zaintrygował mnie opis sposobu zanurzania w wodzie białka do symulacji. Według opisu po wprowadzeniu cząsteczek wody przez LEAPa wszystkie cząsteczki wody w odległości 2.8 Å od ciężkich atomów zostały usunięte. Jaki był powód takiego postępowania? W późniejszych pracach nie stosowano takiej procedury.

Jaki rodzaj interakcji pomiędzy częścią QM a MM był stosowany w obliczeniach przeprowadzonych pakietem fDYNAMO? (electrostatic czy mechanical embedding)? Czy czułość wyników na stosowaną metodę (AM1 vs. M06-2X) wynikała wyłącznie z różnicy w teorii czy też z potencjalnej wrażliwości gęstości elektronowej opisanej za pomocą metody pół-empirycznej względem obliczeń w oparciu o hybrydowy funkcjonal Minnesota 06 na polaryzację przez część MM? Innymi słowy czy różnice wynikają wyłącznie z różnicy w części QM czy też z różnic w możliwościach polaryzacji elektronów opisanych tak w końcu odmiennymi metodami?

W pracy wykazano, że oba stany protonacyjne (Asp25(A) i Asp25(B)) są praktycznie równie prawdopodobne (różnica energii 0.7 kcal/mol), a bariera przeniesienia protonu z udziałem H₂O między dwoma resztami wyniosła tylko 2.5 kcal/mol. Wiadomo również, że szacowane pK_a C-końcowej grupy karboksylowej (w wodzie) wynosi około 3.7 zaś grupy aminowej przy N-końcu wynosi około 8 (Protein Sci. 2009 Jan; 18(1): 247–251.). Oznacza to, że w przypadku większości proteaz powstający produkt kwasowy powinien być zdeprotonowany zaś proton, który jest umieszczany na grupie hydroksylowej, powinien przeskoczyć na grupę aminową. Czy doktorantka mogłaby rozważyć jakie potencjalne inne ścieżki reakcji są możliwe w świetle tego faktu (moja propozycja to np. transfer protonu z oxoanion intermediate z grupy hydroksylowej do aminowej z jednoczesnym rozerwaniem wiązania lub bardziej prawdopodobna reakcja z gemidiol intermediate). Czy doktorantka jest w stanie powiedzieć coś na temat energii EP' dla tak pary produktów z przeniesionym protonem (Ala₃-COO⁻ i ⁺H₃N-Ala₄) względem EP badanego w czasie doktoratu?

W pracy brak jest pełnego profilu energetycznego dla badanych reakcji, a na Figure 6 w publikacji pokazano tylko energie stanów przejściowych (jak mi nie mam liczonych względem poprzednich stanów stacjonarnych). O względnej energii stanów stacjonarnych dla produktów pośrednich można czasem dowiedzieć się z tekstu (np. „*OA intermediate is 15.9 kcal mol⁻¹ less stable than the GD intermediate, which in turn is also more stable than the MC by 3 kcal mol⁻¹*”); nie pozwala to jednak na prześledzenie całego profilu energii potencjalnej. Prosiłbym, aby w czasie obrony zostały przedstawione odpowiednie diagramy również pokazujące połączenie mechanizmu OA i GI (tj. protonację OI przez Asp25(A)). Obecność takich diagramów w pracy ułatwiłaby też czytelnikowi podążanie za wytłumaczeniem efektów elektrostatycznych i powiązanych z nimi energii przeniesienia protonów w badanym systemie.

Na koniec uwaga, która dotyczy się również rozdziału 4 - szkoda, że w pracy nie zamieszczono ważnych informacji, które znalazły się w Supplementary information (np. KIE obliczonych przy



pomocy AM1/MM). Z premedytacją materiałów tych nie ściągałem, bo oceniana jest praca doktorska bez dodatków dostępnych do ściągnięcia z sieci.

Rozdział czwarty poświęcony jest badaniu powinowactwa inhibitorów wobec odwrotnej transkryptazy (RT) HIV-1. Podobnie jak w poprzednim rozdziale krótki wstęp poprzedza trzy artykuły opisujące wyniki prac doktorantki. Prace te ukazały się w the Journal of Physical Chemistry B, Physical Chemistry Chemical Physics oraz Archives of Biochemistry and Biophysics. Trzy i pół stronicowy wstęp przybliżył problem projektowania nowych leków przeciwko celom w HIV metodą *in silico* i podkreśla rolę CADD w nieustającej walce z ciągle mutującym wirusem. Przedstawione są również dwie rozdzielne grupy inhibitorów RT, czyli nukleozydowe i nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy oraz struktury krystalograficzne RT w formie apo oraz w kompleksie z DNA i nienukleozydowym inhibitorem. Na kolejnych stronach dość szczegółowo omówiony został aktualny stan wiedzy dotyczący miejsc wiążących oba typy inhibitorów oraz metod badawczych, w tym w szczególności eksperymentalnych i teoretycznych prac wykorzystujących efekt izotopowy (binding isotope effect) do określenia oddziaływań białko-ligand.

Ze względu na konstrukcję pracy rozdział ten jest dość skrótowy, w wyniku czego nieuchronnie stosowane są pewne uproszczenia. Ponieważ autorka dysertacji stara się unikać powtarzania treści zawartych w późniejszych publikacjach, czytelnik nie dowiaduje się na tym etapie jak zmienia się konformacja białka na skutek wiązania poszczególnych ligandów (ani czym są dokładnie domeny określane nazwą „Finders” i „Thumb”). Brak jest również bardziej szczegółowych rysunków centrów aktywnych i ich kompleksów z inhibitorami (tutaj być może pomocna jest okładka pracy, gdzie rysunek jest bardzo duży, aczkolwiek może to być zarówno centrum odpowiedzialne za aktywność polimerazy jak i RNazy H). Nie poprawia sytuacji rysunek 4.2, który jest bardzo mały i brak na nim opisu, które centrum wiązania jest które (można to wywnioskować jedynie poprzez przypisanie obliczonych efektów BIE do danych miejsc wiążących). Brak ten jest szczególnie uciążliwy, gdy w publikacjach omawiane są szczegółowo interakcje wpływające na istnienie BIE. Rysunki takie zostały umieszczone w Supplementary materials publikacji (np. Fig. S2 pracy J Phys Chem B) ale z niezrozumiałych dla mnie przyczyn nie zostały dołączone do pracy. Bardzo bym prosił, aby te informacje pojawiły się w czasie prezentacji w czasie obrony lub odpowiedzi na moje pytania.

Doktorance nie udało się też uniknąć pewnych drobnych, nieprecyzyjnych sformułowań. Np. na stronie 38 napisała:

‘However, HIV enzymes have high mutations capability and consequently they are getting immune to currently used antivirals’

Same enzymy oczywiście nie mają zdolności do mutacji tylko wirus HIV taką zdolność posiada ze względu na częste pomyłki odwrotnej transkryptazy. Również nieodpowiednim terminem jest słowo „odporny” (immune) na związki przeciwwirusowe w kontekście enzymu. Właściwym było by tutaj określenie „resistant”, gdyż termin „odporny” dotyczy organizmów wyższych (od bakterii w górę). Nawet w przypadku wirusów stosuje się termin „drug-resistant strain”, gdyż wirusy nie posiadają aktywnego systemu odpornościowego.



Innym przykładem takiego skrótu myślowego jest zdanie

„Thus, there is a need for developing novel resistant drugs”.

Domyślam się, że doktorantce nie chodziło o „nowe odporne leki” tylko leki zdolne przełamać nabytą dzięki mutacji oporność – wyjaśnia to już sam tytuł cytowanej publikacji [107] „Drug resistance mutations for surveillance of transmitted hiv-1 drug-resistance”, w której autorzy analizują rozprzestrzenianie się w populacji chorych wirusów z genami powodującymi oporność wirusa na leki przeciwwirusowe i wysoce polimorficzne miejsca w genomie wirusów wpływające na wiązanie nukleozydowych inhibitorów RT.

Rozdział 4 jest niejako centralną częścią pracy, której doktorantka poświęciła bardzo wiele uwagi. Ponownie zanim przystąpię do jego omawiania zaznaczę udział autorski w doktorantki. Wg. informacji przedstawionych przez doktorantkę (która jest komplementarna do tych przedstawionej w oświadczeniach pozostałych autorów) jej wkład w prace z J Phys Chem B (poza przeglądem literaturowym, pisaniem Introduction, metodologii oraz opisie wyników) to symulacje MD oraz QM/MM, lokalizacja minimów i obliczenie BIE, oraz wyznaczenie energii wiązania metodą perturbacji energii swobodnej jak również analiza i opracowanie tych wyników. Wkład w pracę w PCCP to zaplanowanie przeprowadzonych eksperymentów, analogiczne obliczenia jak poprzednio oraz dodatkowo obliczenia BIE z i bez uwzględnienia funkcji translacyjnych i rotacyjnych, wykonanie obliczeń MEP oraz istotny udział w pisaniu pracy i procesie redakcyjnym. Na koniec jej rola w pracy w Arch. Biochem. Biophys była bardzo podobna jak w PCCP z uwzględnieniem wykorzystania struktur początkowych uzyskanych przez dr Frączka. Tak więc bez wątplenia pani Agnieszka jest „pierwszym autorem” wszystkich tych prac.

Praca w J Phys Chem B skupia się na analizie oddziaływań leków NNRTI z hydrofobowym centrum allosterycznym i porównaniu ich oddziaływań z lekami NRTI blokującymi centrum RNazy H. Do wyznaczenia BIE zastosowano obliczenia metodą QM/MM MD zaś interakcje inhibitor-białko obliczono metodą alchemicznej perturbacji potencjału swobodnego (również stosując formalizm QM/MM MD głównie na poziomie AM1). Dzięki temu uzyskano kontrybucje elektrostatyczne i vdW odpowiedzialne za stabilizację inhibitorów w wodzie i w białku oraz różnice $\Delta\Delta G$ związane z przeniesieniem liganda z roztworu do centrum aktywnego białka. Obliczenia te wyraźnie wykazują odmienny typ interakcji ligandów w hydrofilowym centrum RNazy (przewaga oddziaływań elektrostatycznych, wyniki z pracy Świderek i in. z 2012 roku bez udziału doktorantki) i hydrofobowym centrum allosterycznym (przewaga oddziaływań hydrofobowych). Udało się również wykazać diagnostyczny charakter BIE w rozróżnieniu miejsca interakcji danego liganda z białkiem (odwrócony efekt izotopowy dla ^{15}N lub ^{18}O podstawionych leków NRTI w przypadku interakcji z centrum RNazy).

W czasie czytania tej publikacji nasunęły mi się następujące pytania:

W części System Setup wspomniano, że po 2 ns symulacji NTV przeprowadzono „długą symulację” MM MD, po której nastąpiło 200 ps symulacji metodą QM/MM MD. Bardzo proszę o doprecyzowanie długości symulacji, jaka była wymagana do uzyskania stabilnego kompleksu RT z inhibitorami.

Prosiłbym o pokazanie grafik z suplementu, które pokazują różnice w wiązaniu się L_{NA} w centrum RNazy (Figura S2).



W pracy obliczono również istotne drgania angażujące atomy tlenu w ligandach. O ile BIE były obliczane dla szeregu struktur z dynamiki, brak informacji dla jakiej struktury były obliczane analizy wibracyjne (wszystkich, jednej wybranej?). Prosiłbym o doprecyzowanie i wyjaśnienie, do jakiego stopnia konformacyjne zmiany wpływały na te wyniki? A może widma są uśrednionym wynikiem obliczeń dla różnych konformacji? Pytanie to jest niejako dodatkowe, gdyż analiza wibracyjna ligandów była domeną pani dr Świderek.

W kolejnej pracy (PCCP) doktorantka kontynuuje swoje badania nad interakcją inhibitorów z RT. W pracy tej wykazano, że nowy inhibitor z grupy NNRTI (nazywany w pracy L-1) oddziałuje zarówno z hydrofobowym centrum allosterycznym ($\Delta\Delta G^{\text{bind}} -29.2$ kcal/mol) jak i z centrum RNazy H ($\Delta\Delta G^{\text{bind}} -36.5$ kcal/mol). W pracy przeprowadzono również szczegółową analizę struktur wiązania tego inhibitora w obydwu miejscach wiążących, rozkładów potencjałów elektrostatycznych i BIE. Obliczono, że normalny ^{18}O -BIE występuje dla kompleksu L1-centrum allosteryczne dla atomów tlenu podstawnika sulfonamidowego oraz odwrócony dla centrum RNazy.

Ostatnia praca z cyklu HIV-1 RT (Arch. Bioch. Biophys.) skupia się na dalszych badaniach pochodnych inhibitora L-1 (zastąpienie grupy sulfamidowej karboksylową lub amidową oraz zastąpienie pierścienia tiofenowego grupą metylową). We wprowadzeniu zdefiniowano aż siedem centrów interakcji leków z odwrotną transkryptazą zlokalizowanych przez Bauman i innymi metodą krystalograficznej analizy przesiewowej kompleksów z fragmentami ligandów (J. Med. Chem. 2013), jednak prace modelowe poszerzono tylko dla 3 z nich, które wykazywały aktywność inhibicyjną (tzw. miejsca Knuckles, NNRTI Adjacent oraz Incoming Nucleotide Binding). Szczegółowe obliczenia energetyki wiązania metodą FEP przeprowadzono dla L-3 (pochodnej z grupą karboksylową i metylową), gdzie wykazano preferencyjne wiązanie do centrum aktywnego RNazy względem miejsca allosterycznego a w trzeciej kolejności do centrum Knuckles. Ligand ten wykazał również istotny ^{18}O -BIE dla atomu karbonylowego w centrum cząsteczki i za każdym razem w centrum RNazy i polimerazy efekt ten był odwrócony co wiązało się z mocniejszym wiązaniem atomu O w enzymie.

Podsumowując, rozdział 4 jest naprawdę bardzo dobrym przykładem niezwykle systematycznej i skrupulatnej analizy skomplikowanych obliczeń, które w bardzo ciekawy sposób dostarczają informacji o oddziaływaniach leków z enzymem. Co najważniejsze, obliczenia te dostarczają bezpośrednich możliwości weryfikacji wyników poprzez testy izotopowe, gdyż weryfikacja ΔG^{bind} jest niezwykle trudna (standardowo mierzone IC50 po pierwsze nie dyskryminuje miejsca wiązania, to jeszcze uwzględnia zablokowanie aktywności enzymu a nie samą stałą równowagi interakcji ligand-miejsce aktywne). W pracach przewija się temat eksperymentalnej weryfikacji obliczeń. Niestety wartość eksperymentalnego BIE ostatecznie się w nich nie pojawia. Wielka szkoda, gdyż nasuwa się pytanie – jak wielki jest błąd pomiaru BIE dla ciężkich atomów? Czy przewidywane BIE (np. 1.01) są w stanie być wiarygodnie odróżnione eksperymentalne od 0.994 czyli efektów szacowanych dla L-1 i interakcji z centrum allosterycznym i RNazy? Oraz czy możliwe jest wykonanie takiego eksperymentu, gdzie obserwowany efekt izotopowy będzie pochodzić ze zdefiniowanego centrum, a nie będzie ważoną superpozycją efektów integracji z wszystkimi dostępnymi (5?) centrami?

Przedostatni rozdział 5 poświęcony jest ostatniemu z celów terapeutycznych – tj. integracji HIV-1. Jest to enzym odpowiedzialny za inkorporację wirusowego DNA (wytworzonego z RNA przez



RT) do DNA leukocytowego, dzięki czemu w procesie mitozy dochodzi do powielenia również wirusowego kodu genetycznego. Co najważniejsze, nie występuje on w naszych komórkach i dlatego stanowi niezwykle cenny cel potencjalnych działań terapeutycznych ze względu na możliwość ograniczenia efektów ubocznych. W odróżnieniu od poprzednich części ten rozdział nie zawiera prac opublikowanych i ma bardziej tradycyjną, monograficzną formę.

We wstępie do badań, po utworzeniu modelu wirusowej integrazy (bazując na strukturze inregrazy z Prototype Foamy Virus ze względu na brak pełnej struktury z IN HIV), przeprowadzono 60 ns symulację MD w kompleksie z DNA co pozwoliło przebadać stabilność centrum aktywnego oraz zidentyfikować istotne interakcje wodorowe między białkiem a resztami nici DNA. Dynamika centrum aktywnego była szczególnie istotna ze względu na 3 hipotezy mechanistyczne weryfikowane przez doktorantkę, które zakładały hydrolizę wiązania fosfoestrowego przez cząsteczkę wody aktywowaną przez A) grupę fosforanową, B) resztę Asp177 oraz C) grupę fosforanową sąsiedniego nukleotydu. W tej części pracy doktorantka skupiła się przede wszystkim na przebadaniu alternatywnych ścieżek z zastosowaniem metody QM/MM i QM/MD (metodą PMF) przy jednoczesnym testowaniu wielu różnych metod półempirycznych (AM1, AM1d i PM3) i DFT (funkcjonały B3LYP, M06-2X, MPW1PW91). Rozdział ten jest bardzo ciekawy, jednak niestety nie daje odpowiedzi, który z mechanizmów jest najbardziej prawdopodobny (choć można się domyślać, że pierwszy). Fakt ten wynika z bardzo dużych rozbieżności zarówno energetycznych jak i mechanistycznych uzyskanych dla symulacji z udziałem metod półempirycznych jak i DFT. Niestety doktorantka zdążyła przeprowadzić obliczenia wyższymi metodami tylko dla pierwszego mechanizmu, stąd nie można porównać wyników uzyskanych tylko metodami półempirycznymi dla pozostałych. Wykazała jednak, że metody oparte o AM1 są najbliższe obliczeniom z użyciem funkcjonału M06-2X. Wychodząc z takiego założenia można przypuszczać, że mechanizm „substrate assisted” będzie zarówno kinetycznie jak i termodynamicznie najbardziej prawdopodobny.

Również w tej części można dopatrzeć się kilku drobnych niejasności bądź usterek. Np. nie wiadomo czy „initial geometry after 60 ns of MD simulation” pochodziła z ostatniej klatki czy też została jakoś inaczej wyselekcjonowana? (jak rozumiem do dalszych dynamik QM/MD i obliczeń mechanizmu metodą PES DFT/MM). Brakuje dobrych oznaczeń atomów na rysunkach z mechanizmami, do których autorka odnosi się w tekście co trochę utrudnia śledzenie przebiegu wywodu. Rys. 5.10 jest niepotrzebnie bardzo mały, przez co nie sposób jednoznacznie odczytać skali energii, a jednocześnie brak jest dwuwymiarowych rzutów profili PES i PMF, które umożliwiłyby porównanie energetyki procesów między mechanizmami (są jednak tabele). Podobnie Rys. 5.11 jest bardzo mały i nieczytelny, brak w nim wiązań koordynacyjnych z magnezem, a czarna linia mająca pokazać istotne odległości bardziej utrudnia orientację niż pomaga. Z niejasnych przyczyn nie przedstawiono struktur uzyskanych dla pozostałych mechanizmów (choćby dla AM1). Brak również porównania na rysunku struktur RC i TSów dla różnych metod co utrudnia czytelnikowi zrozumienie istotności różnic między metodami (same tabele z odległościami trochę pomagają). W tabeli 5.5. można było się pokusić o obliczenie ΔG dla M06-2X na podstawie poprawek z analizy wibracyjnej (zamiast z PMF). Tabela 5.7 została umieszczona w następnym podrozdziale, co jest dość konfundujące. Na stronie 96 w opisie mechanizmu PM3 ligand H_2O ulega deprotonacji i atakuje atom fosforu nie jako grupa OH^- ale wciąż jako H_2O . Są to jednak naprawdę drobne sprawy, które nie wpływają na bardzo pozytywny odbiór tej części pracy.



Na końcu pracy następuje podsumowanie, które w zgrabny sposób rekapituje całość dysertacji.

Podsumowanie.

Materiał przedstawiony w pracy, w mojej ocenie, wystarczy na co najmniej dwa doktoraty z chemii teoretycznej. Chylę czoło przed ogromem pracy obliczeniowej, jaka włożono w przedstawione w tej dysertacji badania. O jakości uzyskanych wyników świadczy zresztą uznanie świata naukowego – większość pracy jest opublikowana w prestiżowych lub bardzo prestiżowych periodykach naukowych.

Na podstawie powyższej sformułowanych faktów stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska „Theoretical Studies of HIV-1 Enzymes”, z naddatkiem 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 pani mgr inż. **Agnieszki Krzemińskiej-Kowalskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę ponadprzeciętną ilość materiału naukowego przedstawionego w rozprawie, dorobek publikacyjny daleko przekraczający zwyczajowe osiągnięcia doktorantów oraz zaawansowany aparat metodologiczny wypracowany przez doktorantkę wnoszącą do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej o wyróżnienie pracy pani mgr inż. **Agnieszki Krzemińskiej-Kowalskiej**.

Dr hab. Maciej Szaleniec prof. IKiFP PAN