



Kraków, 30.11.2017

dr hab. Maciej Szaleniec, prof. IKiFP

m.szaleniec@cyfronet.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. „Metody analizy aktywności katalitycznej i projektowania biokatalizatorów oparte na teorii oddziaływań międzycząsteczkowych”

Pana mgr Wiktora Bekera

Praca doktorska mgr Wiktora Bekera została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej w Katedrze Inżynierii i Modelowania Materiałów Zaawansowanych pod kierunkiem prof. dr hab. Wacława Andrzeja Sokalskiego. Celem recenzowanej rozprawy było opracowanie sposobu zastosowania techniki pól katalitycznych do określenia wpływu mutacji na szybkość reakcji katalizowanej przez enzymy.

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej głównym aspektem było rozwijanie i testowanie różnych metodologicznych podejść do teoretycznego opisu różnicowej stabilizacji stanu przejściowego w oparciu o wybrane przykłady enzymatycznych reakcji katalitycznych a dopiero w drugim rzędzie pogłębienie wiedzy na temat właściwości katalitycznych oraz roli poszczególnych mutacji w konkretnych biokatalizatorach.

Informacje o pracy.

Cała praca liczy 102 strony, przy czym Doktorant zdecydował się na dość niekonwencjonalne rozmieszczenie treści: w zasadniczej 58-stronicowej części znajdują się cztery rozdziały (Wstęp, Metody, Wyniki, Podsumowanie), po której następuje 44-stronicowy Suplement składający się z ośmiu rozdziałów. Niekonwencjonalność takiego układu treści zasadza się w tym, że w suplemencie nie tylko w sposób istotny poszerzono opis metod z części zasadniczej (w szczególności opis metody SAPT, przegląd pojęć związanych z rozwinięciem multipolowym), ale również zamieszczono ważny dla pracy opisy metodologii (np. S5 Obliczenia ONIOM, S6 Reprezentacja Δ_s) czy nawet część wyników (m.in. testy dotyczące walidacji biblioteki multipoli atomowych dla aminokwasów, różne podejście do interpolacji multipoli z różnych konformacji; wyniki dotyczące różnej interpretacji dynamicznego pola katalitycznego).

We wstępnym rozdziale Doktorant, z dużą swadą i niewątpliwym obeznaniem w literaturze przedmiotu, przybliży czytelnikowi istotne wyzwania, jakie stoją przed biotechnologami poszukującymi biokatalizatorów do procesów, które nie zachodzą w Naturze, krótko streszcza historię projektowania *de novo* biokatalizatorów, oraz omawia hipotezy wyjaśniające pochodzenie wysokiej katalitycznej efektywności enzymów, w szczególności skupiając się na tak zwanej katalizie elektrostatycznej. W sekcji tej zamieszczono również



schematy reakcji katalizowanych przez izomerazę ketosteroidową (KSI) jak i eliminazę Kempa. W przypadku tego drugiego enzymu we wprowadzeniu znajduje się również krótkie podsumowanie literaturowe na jego temat. Rozdział ten kończy szczegółowy opis celów pracy.

W drugim, 11-stronicowym rozdziale „Metody” Doktorant opisuje kluczowe dla rozprawy koncepcje teoretyczne, między innymi takie jak różnicowa stabilizacja stanu przejściowego (DTSS), oddziaływania międzycząsteczkowe w przybliżeniu polaryzacyjnym oraz w oparciu o rachunek zaburzeń o adaptowanej symetrii (SAPT). Omawia też koncepcję pola katalitycznego jak również kumulatywnego atomowego rozwinięcia multipolowego (CAMM), stanowiącego główną oś całej rozprawy. W tym rozdziale opisano też krótko metodykę przeprowadzonych obliczeń QM/MM, poświęcając jeden akapit opisowi przygotowania modelu teozymu KE07 (eliminaza Kempa).

W rozdziale trzecim, „Wyniki”, znajduje się opis zasadniczej części prac badawczych przeprowadzonych przez Doktoranta. Przy czym należy zaznaczyć, że Doktorant zdecydował się prowadzić dyskusję uzyskanych wyników na bieżąco, zaś każda sekcja tematyczna zakończona jest wyróżnionym edytorsko wnioskiem. Sam rozdział zaczyna się od 5 pytań, na które w dalszej części pracy zostaje udzielona odpowiedź. Tak więc w pierwszej kolejności Doktorant rozważa w jaki sposób najefektywniej modelować rozkład ładunku reagującego układu reagent-katalizator (poprzez ładunki punktowe czy rozwinięcie multipolowe, a jeżeli tak to jakiego rzędu – analizę przeprowadzono na przykładzie reakcji hydrolizy fosalonu i syntezy H_2CO_3) oraz jak najefektywniej reprezentować otoczenie katalityczne oraz wyznaczać jego wkłady do DTSS (prace na przykładzie kinazy białkowej A). Następnie przechodzi do głównego tematu rozprawy czyli opisu wpływu mutacji na aktywność katalityczną izomerazy ketosteroidowej oraz eliminazy Kempa. Opis ostatniego tematu jest potraktowany ze szczególną uwagą i szczegółowością.

Rozdział 4, „Wnioski” to dwustronicowe podsumowanie wniosków zasygnalizowanych w rozdziale 3.

Druga nie mniej istotna część pracy, Suplement, składa się z 8 rozdziałów i dostarcza niezwykle istotnych dla zrozumienia pracy informacji na temat rozwinięcia multipolowego, metody SAPT, dynamicznego pola katalitycznego i przeprowadzonych przez Doktoranta testów (próby wskazania optymalnej konformacji aminokwasów na podstawie Δ_d), obliczeń ONIOM, zastosowaniu modelu ciągłego rozpuszczalnika w obliczeniach DTSS(CAMM) i walidacji tego podejścia dla subtylizyny, jak również szczegółowego opisu metodologii budowy biblioteki atomowych multipoli dla aminokwasów wraz z opisem przeprowadzonych testów.

Rozprawę zamyka spis cytowanej literatury, który zawiera 178 pozycji, spis rysunków i tabel oraz spis dorobki publikacyjnego doktoranta.

Zanim przejdę do merytorycznej analizy pracy pozwolę sobie na uwagę, że taki podział treści w mojej ocenie okazał się dość niefortunny. O ile wydzielenie szczegółowych dywagacji na temat metodyki SAPT jest uzasadnione (gdyż nie stanowi to tematu pracy), to już przeniesienie do suplementu opisu metod stricte dotyczącego tematu pracy (czyli rozwinięcia multipolowego czy obliczeń QM:MM) w istotny sposób utrudnia zrozumienie czytelnikowi całej rozprawy.



Ocena merytoryczna rozprawy.

Jak już wspomniałem pierwszy rozdział to dość krótki wstęp przybliżający tło badań dotyczących katalizy enzymatycznej oraz teorii opisujących efekt kinetyczny. W swej istocie konstrukcji rozdział ten jest swego rodzaju hybrydą zwyczajowego wprowadzenia literaturowego oraz prowadzonej przez Doktoranta dyskusji funkcjonujących w literaturze teorii na temat katalizy enzymatycznej (np. podrozdział **1.2.4 Krytyczna ocena**). Autorowi rozprawy nie można odmówić dużej swady oraz niezwykle dojrzałej orientacji w literaturze naukowej problemu. Czasem jednak czytelnik może odnieść wrażenie, że czyta nie rozprawę doktorską, ale pracę przeglądową. Wrażenie to potęgują częste skróty myślowe, bardzo syntetyczne omawianie niektórych kwestii oraz nagminne odsyłanie czytelnika do literatury, bez pogłębienia tematu (np. str 11, „zaproponowano szereg modeli mających tłumaczyć wpływ dynamiki białka na aktywność katalizacyjną, np. teorię drgań promujących [25,26]” – temat dalej nie rozwijany;). Taki zabieg skutkuje niejednokrotnie sytuacją, w której Doktorant prowadzi czasem szczegółowy dyskurs (jak w przypadku problemu z cyklofiliną A i jej mutacjami) w oderwaniu od szerszego opisu problemu i badanego modelu. Dla czytelnika rozprawy dyskurs jest zupełnie nieczytelny bez zapoznania się z wszystkimi przytoczonymi referencjami i nie pomagają tutaj nawet przypisy na dole strony, które chociaż wyjaśniają niektóre kwestie, często tylko dostarczają kolejnych odnośników literaturowych. Podejście takie jest dość nietypowe w pracy doktorskiej. Wszystkie te uwagi nie powodują jednak, że pierwszy rozdział źle się czyta, gdyż jest on napisany ze swadą i bardzo potoczyscie.

Problemem części wstępu nie jest bowiem to co jest w nim napisane, ale to czego w nim nie ma. A nie zawarto w nim przeglądu stanu wiedzy na temat obiektów badań, na których testowano, weryfikowano i rozwijano główną metodę teoretyczną, czyli DTSS(CAMM). Chodzi mi w szczególności o opis prac dotyczących struktury centrum aktywnego i mechanizmu reakcji izomerazy ketosteroidowej i eliminazy Kampa, ale również strukturę centrum aktywnego i reakcję katalizowaną przez kinazę białkową A (schemat reakcji znajduje się dopiero w sekcji Wyniki – Rys 3.4), mutazę chrozymianową (skąpy opis w suplemencie), strukturę meniny (jeden rysunek w Suplemencie), czy w końcu reakcje z pracy Doktoranta opublikowanej w *Structural Chemistry* dotyczące w szczególności hydrolizy fosalonu (jeden rysunek w wynikach, struktury do odcyfrowania za pomocą szkła powiększającego). Na skutek braku tego wprowadzenia wiele z późniejszych wywodów i analiz było niejasnych co skutkuje licznymi pytaniami i prośbami o wyjaśnienie (*vide infra*). Zakładam, że celem pominięcia tych istotnych dla pracy szczegółów było skoncentrowanie uwagi czytelnika na samej metodzie DTSS(CAMM) a nie na enzymach, które służyły jako obiekty testowe. Efekt ten został niewątpliwie osiągnięty, jednak ze skutkiem negatywnym dla jakości odbioru pracy.

Rozdział poświęcony metodom rozpoczyna wyprowadzenie różnicowej stabilizacji stanu przejściowego oraz tłumaczy, jak to podejście można zastosować do reakcji wieloetapowych. Doktorant dowodzi, że w takim przypadku właściwe jest zastosowanie różnicowej energii stabilizacji produktu przejściowego (DISS) w miejsce DTSS. Jako uzasadnienie tego poglądu cytowane są prace Jeremy'ego Knowlesa (*Biochemistry*, 1976, 15, 5631-5640) oraz pracę Adriana J. Mulhollanda i W. Grahama Richardsa (*J. Phys. Chem. B* 1998, 102, 6635-6646). W pracy Knowlesa omawiane są dwa typy ewolucyjnej stabilizacji wewnętrznych stanów (kompleksu reagentów, stanów przejściowych, produktów przejściowych) w enzymie – tzw. „uniform binding of the internal states” oraz znacznie rzadszy



i trudniejszy do osiągnięcia „differential binding of the internal states”. Pierwszy ze sposobów stabilizacji zakłada takie samo obniżenie energii wszystkich wewnętrznych stanów w enzymie, drugi zaś zmiany we względnej stabilizacji stanów wewnętrznych na skutek subtelnych oddziaływań enzymu z danymi stanami wewnętrznymi (np. na skutek specyficznego oddziaływania wodorowego, które występuje wyłącznie dla danego stanu wewnętrznego). Generalnie zgadzam się z Doktorantem, że w przypadku występowania wysokoenergetycznego produktu przejściowego znajdującego się pomiędzy dwoma stanami przejściowymi, jego stabilizacja będzie korelować z jednoczesnym obniżeniem obu barier energetycznych, a co za tym idzie z obserwowaną szybkością reakcji. Efekt ten jest zgodny z postulatem Hammonda (stan przejściowy jest podobny do wyżej energetycznego stanu) oraz liniową zależnością energii swobodnej zaproponowaną przez Bronsteda i Hammetta. W mojej opinii, i jak wydaje mi się również w świetle pracy Knowlesa, nie jest to twierdzenie uniwersalne, gdyż produkt przejściowy może charakteryzować się energią mniejszą niż poprzedzający go produkt (czy też kompleks enzym-substrat). Zdarza się to często na szlaku wieloetapowych reakcji nieodwracalnych, gdzie dyssypacja energii następuje stopniowo w trakcie katalizowanej reakcji. W takim przypadku stabilizacja dla danego DISS nie byłaby dobrym parametrem do opisu zmian katalitycznej efektywności enzymu. **Czy wobec tego prawdą jest, że chociaż dla dwuetapowego mechanizmu reakcji obniżanie wysokoenergetycznego produktu liniowo koreluje z energią obu sąsiadujących barier to nadal istotnym aspektem poprawy katalitycznych właściwości enzymu jest stabilizacja obu barier energetycznych a nie energii produktu przejściowego. Prosiłbym o przedyskutowanie przez Doktoranta tej kwestii w czasie obrony.**

W sekcji 2.5.1 pokrótce opisano bibliotekę rotamerów CAMM. W szczególności opisano tutaj bibliotekę Dymameonics, która była wykorzystywana w początkowych badaniach. Ponieważ „CAMMy” są jednym z głównych tematów rozprawy, zaskakująca jest niezwykła lakoniczność opisu tej części i niepotrzebnie przeniesiono części opisu do S.8.3. W mojej opinii byłoby to doskonałe miejsce, aby na przykład wyjaśnić stosowaną w rozdziale 3 notację dotyczącą poszczególnych rotamerów, a stosowaną min. w tabeli 3.3. i 3.4. Niestety nie udało mi się nigdzie w pracy odnaleźć stosownego opisu pozwalającego na rozpoznanie danych rotamerów, zaś czytelnik musi poszukiwać klucza do szyfru w pozycji [131]. **Natomiast na szczególną pochwałę zasługuje zamieszczenie autorskiej biblioteki CAMMów oraz poszerzonego modułu pymolecule na zewnętrznym serwerze. Każda praca narzędziowa, która udostępnia za darmo opracowaną metodę dla całego środowiska naukowego ma nieocenioną wartość, zarówno ze względu na możliwość weryfikacji metody na innych przykładach jak również ze względu na możliwość kontynuowania badań.**

Na stronie 31 znajduje się niespełna stronicowa sekcja dotycząca obliczeń metodą QM/MM. W sekcji tej brakuje bardzo wielu istotnych detali dotyczących przeprowadzonych przez Doktoranta obliczeń dla KE07, takich jak wielkość modelu, przyjęty ładunek całkowity, ładunek części QM, metoda wyboru protonacji reszt aminokwasowych w modelu, struktura 3D części QM (tę informację możemy znaleźć dopiero w sekcji S5 Rys. S6 chociaż bez wzmianki, że jest to część będąca w HL), sposób przydzielenia ładunku na link-atomy oraz równoważenia ładunku odciętych reszt w modelu, zakres elastyczności modelu, stopień solwatacji (ile cząsteczek wody z MD pozostawiono w modelu), czy prowadzono równoważenie konformacji (wielokrotną sekwencyjną optymalizację geometrii po obu stronach jedyne TSu) przy

wyznaczaniu stanu przejściowego, w jaki sposób uzyskano geometrię stanu przejściowego i czy potwierdzano ją za pomocą pełnej analizy wibracyjnej etc. **Uważam, że każda rozprawa naukowa, w szczególności teoretyczna, powinna dawać czytelnikowi możliwość weryfikacji zamieszczonych w niej rezultatów. Tak skąpy opis praktycznie uniemożliwia przetestowanie otrzymanych przez Doktoranta wyników i stanowi nikłą pomoc dla kolejnych pokoleń badaczy, którzy będą ową tematyką się zajmować.** W rozdziale tym nie znalazłem również informacji na temat metodologii zastosowanej dla KSI, chociaż jak zrozumiałem, obliczenia QM:MM były prowadzone przez grupę profesora Mullholanda. Tym niemniej dla porządku powinny zostać tutaj przytoczone przynajmniej podstawy zastosowanej metodologii (model, stosowana metoda teoretyczna), szczególnie że na rys. 3.8 został przedstawiony tylko jeden profil energetyczny z 3 dostępnych w pracy [145].

Rozdział 3 poświęcony jest wynikom uzyskanym przez doktoranta. Rozpoczyna się on od analizy różnych modeli elektrostatycznych, jakie można zastosować do reprezentacji ładunku układu reagującego (wyrażonego jako potencjał elektrostatyczny reagentów MEP), a co za tym idzie do wyznaczenia pól katalitycznych. W części tej Doktorant porównuje MEP obliczony na podstawie ładunków punktowych otrzymanych z fitowania gęstości elektronowej metodą Mertza-Kollmana z MEP obliczonym na podstawie CAMM o różnym poziomie rozwinięcia (od rozwinięcia monopolowego, aż po rozwinięcie 32-polowe). W rozdziale tym analizowany jest RMSD potencjału elektrostatycznego, której to sposobu liczenia nie zdefiniowano niestety operacyjnie (została ona zdefiniowana w pracy 130: „root-mean-square deviation of the MEP estimated from atomic multipole expansions relative to the ab initio restricted Hartree–Fock value on the Connolly surface”). Również reprezentacja graficzna przytoczonych przykładów (rysunek 3.1) została sporządzona bardzo niekorzystnie – niewielkie grafiki cząsteczek (mniejsze niż w pracy 130) praktycznie uniemożliwiają czytelnikowi śledzenie reakcji hydrolizy fosalonu, chociaż generalnie przekaz wykonanych analiz jest dość czytelny – metoda ładunków MK sprawdza się lepiej w przypadku reakcji hydrolizy fosalonu i gorzej od CAMM od rozwinięcia kwadrupolowego w górę dla reakcji syntezy kwasu węglowego (IV). Na podstawie przedstawionych wyników Doktorant wyciąga wniosek, że modele oparte o CAMM mają charakter uniwersalny i dobrze oddają potencjał elektrostatyczny układu niezależnie od jego ładunku całkowitego, podczas gdy ładunki MK sprawdzają się jedynie w przypadku układów obdarzonych trwałym ładunkiem. Wniosek ten mógłby wydawać się odrobinę zbyt daleko posunięty, gdyby opierał się wyłącznie na przytoczonych w rozprawie dwóch przykładach. W pracy 130 dostępnych jest jednak więcej przykładów (zasadowa hydroliza dementonu-S (ładunek -1) gdzie RMSD MEP obliczonego z ładunków MK zachowywał się tak jak w przypadku hydrolizy fosalonu oraz izomeryzacja rodnika HCN, gdzie powtórzyła się sytuacja z syntezą H₂CO₃). Prawdę mówiąc nie rozumiem, czemu wszystkich wyników nie można było przytoczyć w pracy doktorskiej, aby wywód był bardziej przekonujący. W sekcji tej wykazano również, że obliczenie energii oddziaływań dla modelowego układu obarczone było mniejszym błędem dla 32-polowych CAMM oraz DMA (Distributed Multipole Analysis? – brak rozwinięcia skrótu – dopiero w opisie rys 3.3. nazwane „multipolami Stone’a”). Niestety nie skomentowano, jak metoda radzi sobie w niższych rozwinięciach i jaka jest przewaga podejścia Stone’a nad CAMM (zaobserwowano niższy błąd dla DMA L=5) oraz czy w ogóle taka przewaga występuje.

Kolejnym krokiem było wyznaczenie różnicowej energii stabilizacji stanu przejściowego w oparciu o metodę kumulatywnych multipoli atomowych zarówno obliczonych z pola katalitycznego jak i z biblioteki aminokwasów na podstawie reakcji fosforylacji katalizowanej przez kinazę białkową A. Metodami referencyjnymi były DTSS obliczone na poziomie MP2 oraz metoda Fragment Molecular Orbital opracowanej przez Kazuo Kitaure. Ponieważ modelowy układ był naładowany, uzyskano dużą zgodność DTSS obliczanej zarówno na podstawie ładunków jak i multipoli atomowych z wielkościami obliczonymi bardziej zaawansowanymi metodami. W sekcji tej zabrało informacji jakiego rzędu rozwinięcie CAMM było stosowane (czy było to graniczne rozwinięcie heksadekapolowe?). Prosiłbym również o uzupełnienie Fig. 3.5 i 3.6 o wartości współczynnika determinacji liniowej (R^2 Pearsona) dla wartości DTSS obliczonej różnymi metodami w odniesieniu do wartości z metod referencyjnych (odpowiednio MP2 i FMO). **Przedstawione na koniec tej sekcji wnioski nasuwają oczywiście pytanie, czy dla układów nie obdarzonych ładunkiem możliwe jest uzyskanie podobnych zgodności DTSS (czy też może lepszych)?**

Kolejno Doktorant przechodzi do analizy wpływu mutacji w pobliżu centrum aktywnego na aktywność katalityczną izomerazy keto steroidowej (KSI). **Wraz z analizą wpływu mutacji na KE07 jest to zdecydowanie najlepsza i najciekawsza część tego doktoratu.** Dla szeregu struktur poddanych mutacjom udało się przewidzieć DISS za pomocą metody CAMM i wykazać liniową korelację z obserwowaną $\Delta G^{\#app}$ obliczoną na podstawie eksperymentalnie zmierzonej k_{cat} . Niestety odbioru tej części nie ułatwiają bardzo małe i skąpo opisane rysunki (3.8 i 3.9). To tutaj właśnie widać brak odpowiedniego wprowadzenia w rozdziale 1 i dlatego trudno jest w pełni docenić tę część pracy. Ponadto jeżeli k_{cat} wyznaczano metodami eksperymentalnymi (brak odniesienie do źródła) wyznaczone wartości były z pewnością obarczone błędem który eksponentalnie propaguje się na błąd $\Delta G^{\#app}$. Dlatego w korelacji z Rys 3.9b należałoby zaznaczyć zakresy błędów wartości $\Delta G^{\#app}$. Być może wtedy wszystkie punkty znalazłyby się w granicy przedziału ufności i nie byłoby potrzeby wyłączać z korelacji jednego punktu mutacji. Niezależnie od tego parametry przedstawione na wykresie 3.9b powinny też zawierać błędy regresji lub w opisie powinny pojawić się błędy estymacji $\Delta G^{\#app}$. W analizie tej brak również porównania z DTSS dla TS2, które akurat w przytoczonym profilu ma większy wpływ na kinetykę reakcji niż uwzględniona w analizie TS1. Wykazanie, że obie DTSS są skorelowane z DISS byłoby bardziej przekonujące dla wyводу. Można sobie bowiem wyobrazić taką sytuację, gdzie wysokoenergetyczny produkt przejściowy o neutralnym ładunku jest otoczony przez rodnikowy TS z jednej strony oraz naładowany (np. karbokationowy) TS z drugiej strony i wtedy efekty mutacji mogłyby być zupełnie różne dla różnych barier a DISS byłby reprezentatywny tylko dla jednej z nich.

Następnie poddana zostaje ewaluacji zdolność predykcji $\Delta G^{\#app}$ przez DISS obliczoną za pomocą różnych metod (w tym HF i SAPT). Z rysunku 3.10 można wywnioskować, że wszystkie metody jakościowo są zgodne, ale nie można ustalić czego dotyczy linia trendu (zależności dla jednej metody? Wszystkich metod?) i tym razem nie podano również współczynników korelacji, błędów estymacji ani nawet współczynników regresji (parametry statystyczne byłyby bardzo ciekawym indykatorem mocy predykcyjnej danej metody względem metody tak kosztownej jak SAPT). Oczywiście analizę taką należałoby prawidłowo sporządzić po uwzględnieniu wszystkich pomiarów k_{cat} lub jak wspomniano już wyżej rozrzutów $\Delta G^{\#app}$.



Ponadto w opisie rysunku 3.11 brak ponownie opisu danych metod (np. ΔE_{elest} (FF) pojawia się chyba po raz pierwszy).

W części tej nie udało się również uniknąć pewnych niezręczności czy niejasności.

Na stronie 41 znajduje się następujące zdanie: „Rysunek 3.10 pokazują relacje pomiędzy DISS uzyskanymi różnymi metodami a barierą eksperymentalną (struktury MD).” – nie jest jasne jaki związek „bariery eksperymentalne” mają ze strukturami z symulacji metodą dynamiki molekularnej (podejrzewam jakiś skrót myślowy).

W tymże samym akapicie na str. 41 dotyczącym wyjaśnienia, dlaczego DISS obliczone dla mutacji Tyr14Ser nie przewiduje prawidłowo ΔG^{app} podano dwie wartości $T\Delta S^{\#}$ - „odpowiednio -4.2 i -7.5 kcal/mol [146]”. Nie bardzo wiadomo, czego dotyczy słowo „odpowiednio” i w jaki sposób odnosi się to do omawianego przypadku, ani dlaczego tłumaczy to zniżenie DISS(CAMM) akurat o „ok. 1 kcal/mol”. **Proszę o ponowne przeprowadzenie wyводу tak aby całe rozumowanie było klarowne.**

Ostatnia część pracy poświęcona eliminacji Kempa jest w istocie najlepszą sekcją. Doktorant przeanalizował 13 kolejnych mutacji oryginalnego teozymu, które wprowadzono na drodze ukierunkowanej ewolucji. Dzięki obliczeniom w oparciu o DTSS(CAMM) możliwe było wyznaczenie przyczynków dla każdej mutacji z uwzględnieniem różnych konformacji danego aminokwasu. Zastosowanie opracowanej metodologii pozwoliło więc ocenić zakresy wpływu na DTSS poszczególnych mutacji (z uwzględnieniem możliwych konformacji danych reszt) oraz powiązać efekt wprowadzanych mutacji z eksperymentalnie wyznaczoną ΔG^{exp} . Przy okazji badań nad konformacją, udało się zauważyć istotny aspekt wzajemnego oddziaływania reszt naładowanych, co wpływa w istotny sposób na przyjmowaną przez nich konformację. Tak więc sama analiza wyodrębnionych wkładów danych reszt i wyznaczenie optymalnych konformacji (z punktu widzenia DTSS) nie jest wystarczająca do oceny prawdziwej sytuacji w centrum katalitycznym w związku z dalekozasięgowym działaniem oddziaływań elektrostatycznych i ich wpływem na przyjmowaną konformację. Przy okazji drobna uwaga edytorska w tabeli 3.3. i 3.4 nie podano wymiaru energii (a jedynie opis określający graniczną wielkość bezwzględnej energii DTSS pozwala się domyślić, że w tabeli również energie są przedstawiane w kcal/mol). **Przedstawiona tutaj argumentacja rodzi pewną wątpliwość. Otóż skoro położenie tak odległych od siebie reszt ma wpływ na konformację istotnych dla DTSS naładowanych aminokwasów a stosowana metoda nie uwzględnia większości białka (tylko wybrane aminokwasy włączone do analizy, białko brane pod uwagę tylko jako zawada steryczna eliminująca część rotamerów), to czy analiza wybierająca „optymalne” rotamery nie jest poniekąd obciążona istotnym błędem poprzez zaniedbanie oddziaływań elektrostatycznych dla poszczególnych aminokwasów? Jeżeli dobrze rozumiem procedurę opisaną na stronie 52 i 53 metoda opracowana przez Doktoranta nie sprawdza, czy wybrany rotamer ma wysoką energię ze względu na swoje mikrootoczenie a jedynie wyliczana jest energia oddziaływań. Bardzo prosilibym o przedyskutowanie tej kwestii w trakcie obrony.**

Bardzo interesujący jest również wynik symulacji, który wykazał, że dla danego białka zestaw występujących konformacji badanych aminokwasów różni się od tego, jaki scharakteryzowano jako najbardziej stabilne w bazie Dynameonics. Niestety opis tych populacji, przedstawiony na Rys. 3.15, ponownie pozbawiony jest szczegółowej legendy umożliwiającej odcodowanie rotamerów, zaś opis w tekście, choć szerszy, nie jest poparty odpowiednim przedstawieniem



graficznym (poza Rys. 3.14, który niestety ze względu na wybrany rzut nie pozwala ocenić w pełni konformacji Arg202 – zresztą przedstawiono na nim P6, P7 i P8 a omawiane różnice dotyczą P1, P5 i P7. Niepokojący jest również wniosek Doktoranta, bazujący na odmienności wyników z MD i samej bazy. Jeżeli 30 ns symulacje nie są wystarczające do wyznaczenia najbardziej prawdopodobnych konformacji interesujących nas aminokwasów to czy można mówić o stosowalności CAMM na obecnym poziomie możliwości obliczeniowych? Raczej bym wskazał na fakt, że symulacje MD uwzględniają nie tylko konformację łańcucha głównego, ale również lokalne otoczenie aminokwasów, które wpływa na dostępną przestrzeń fazową potencjalnych konformacji (zarówno sterycznie jak i elektrostatycznie, *vide supra*) i w oczywisty sposób odzwierciedla unikatową sytuację każdego aminokwasu w danym białku o danej konformacji. Tak więc wydaje się, że referencja „Baza” z Rys. 3.15 powinna brać zdecydowanie pod uwagę konformację łańcucha głównego Arg202, a i tak ze względu na jego umiejscowienie na pętli i względną swobodę ruchu należy się spodziewać zmian preferencyjnych konformacji (nie wspominając już o dynamicznie zmieniającym się otoczeniu). **Proszę aby Doktorant poruszył tę kwestię w czasie obrony.**

W sekcji tej pojawiają się również analizy wiążące DTSS (obliczone za pomocą analizy MMPBSA) ze stabilizacją stanu przejściowego, które wykazują ujemną korelację (a nie „antykorelację”) z różnicową stabilizacją stanu przejściowego. Rozumiem, że Doktorant odnosi się do stabilizacji TSS jako energii wiązania substratu w konformacji TS bez referencji do energii kompleksu ES. Dla każdego enzymologa teoria TSS zawsze odnosi się do ES i dlatego stabilizacja TS względem ES zawsze da taką samą korelację co DTSS (w istocie są one tym samym, jeżeli przyjmiemy taką samą referencję za odniesienie). **Bardzo bym prosił o komentarz czy moje domysły w tym temacie są słuszne.**

Na koniec tego rozdziału Doktorant podaje syntetyczny algorytm pozwalający na przewidywanie wpływu mutacji na aktywność katalityczną oraz podkreśla istotny aspekt analizy wzajemnego wpływu wprowadzanych mutacji na ich konformację oraz wypadkowy efekt stabilizacji DTSS.

Ostatni rozdział 4, Podsumowanie, ponownie zbiera osiągnięcia pracy, podkreślając, że technika pól katalitycznych stanowi dobre narzędzie do teoretycznego projektowania nowych biokatalizatorów a w szczególności do analizy nieaddytywnych efektów wielokrotnych mutacji zaś zastosowanie atomowych momentów multipolowych dla rotamerów aminokwasów pozwala na skuteczne i szybkie modelowanie tych efektów w ramach metody różnicowej stabilizacji stanu przejściowego.

Podsumowanie.

W ostatnich czasach w literaturze widać kryzys wiary w racjonalne projektowanie enzymów, w szczególności w obliczu niewątpliwych sukcesów metody kierowanej ewolucji. Z punktu widzenia biotechnologa optymalizującego białko czasem szybsze jest zastosowanie robota typu HT do mutacji sekwencji genetycznej i jej klonowania oraz testowania nowych wersji enzymu niż prowadzenie bardzo skomplikowanych metodologicznie obliczeń i symulacji, których zgodność z eksperymentem będzie i tak wątpliwa. Praca pana mgr Bekera ma szansę przyczynić się do zmiany tego trendu i dostarczyć bardzo szybkiej i koncepcyjnie prostej metody, co najmniej jakościowego (ale i ilościowego), przewidywania wpływu mutacji



na aktywność katalityczną enzymów. Być może w dalszej perspektywie za jej pomocą będzie można przewidywać zmianę mechanizmu reakcji lub zmianę spektrum substratowego (zakładając znajomość struktury TS dla różnych substratów czy dla alternatywnych ścieżek reakcji). Na pewno wielkim wyzwaniem dla opracowanej metody będzie w przyszłości zmierzenie się z prospektywnym problemem badawczym czyli aprioryczne zaplanowanie mutacji i ich weryfikacja w laboratorium.

Na podstawie powyższej sformułowanych faktów stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska „Metody analizy aktywności katalitycznej i projektowania biokatalizatorów oparte na teorii oddziaływań międzycząsteczkowych”, 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 pana mgr Wiktora Bekera do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Maciej Szaleniec prof. IKiFP PAN