



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni  
im. Jerzego Habera  
Polskiej Akademii Nauk



Prof. dr hab. Tomasz Borowski

Kraków, 21.08.2019

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Rzęsikowskiej pt. "Conformational and methodological aspects of selected GPCRS' molecular docking studies for improvement of computer-aided drug design"**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr Katarzyny Rzęsikowskiej, przygotowana pod kierunkiem Prof. dr hab. Krzysztofa Lewińskiego oraz dr Justyny Kalinowskiej-Tłuścik na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie poświęcona jest badaniom obliczeniowym nad wspomaganym komputerowo projektowaniem leków, których punktem uchwytu są receptory sprzężone z białkami G (ang. GPCR). GPCR stanowią bardzo rozległą i ważną rodzinę receptorów metabotropowych aktywujących wewnątrzkomórkowe białko G w odpowiedzi na wiązanie neuroprzekaźnika docierającego do zewnętrznej powierzchni komórki oraz zaangażowanych w bardzo szerokie spektrum procesów fizjologicznych. Wspomagane komputerowo projektowanie leków (ang. CADD) jest bardzo istotnym elementem współczesnego podejścia stosowanego w poszukiwaniu nowych farmaceutyków, gdyż jego właściwe zastosowanie pozwala między innymi na wytypowanie potencjalnych ligandów danego białka i tym samym znacząco redukcję liczby związków do przebadania metodami doświadczalnymi. Dlatego też połączenie obu wątków uważam za bardzo trafne i wpisujące się w nowoczesny nurt badań.

Praca doktorska mgr Katarzyny Rzęsikowskiej zredagowana została w języku angielskim, na 124 stronach maszynopisu, według klasycznego układu formalnego obejmującego dwie zasadnicze części pracy tj. częścią literaturowo-teoretyczną (rozdziały 1 i 2, łącznie 32 strony) oraz część opisującą badania własne (rozdziały 3-6, łącznie 68 stron), uzupełnione o streszczenia w języku angielskim i polskim, cele pracy, wnioski oraz spis

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska  
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23  
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego  
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004  
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni  
im. Jerzego Habera  
Polskiej Akademii Nauk



Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiodący

cytowanej literatury. W rozdziale 1 („Introduction”) Autorka zwięźle przedstawia metody i narzędzia CADD, omawia ich zastosowania i sukcesy oraz prezentuje kluczowe informacje na temat GPCR, w tym ich klasyfikacje, strukturę, mechanizm aktywacji oraz aktualne wyzwania w poszukiwaniu leków wiążących się do receptorów z tej rodziny białek. Rozdział drugi dostarcza opisu stosowanych przez Autorkę metod, programów i algorytmów obliczeniowych: dopasowania sekwencji białek, konstrukcji drzewa filogenetycznego, modelowania homologicznego, dokowania molekularnego oraz metryk zastosowanych do oceny jego rezultatów, analizy topologicznej gęstości elektronowej (ang. quantum theory of atoms in molecules – QTAIM) oraz metody identyfikacji oddziaływań niewiążących (ang. non-covalent interaction analysis – NCI).

Stronę merytoryczną części literaturowej oceniam bardzo pozytywnie, aczkolwiek Autorka nie ustrzegła się pewnych niedociągnięć i drobnych błędów pisarskich, których średnia koncentracja nie przekracza jednego błędu na stronę, a więc nie jest zauważalnym obciążeniem dla studiującego zawartość pracy. Być może warte przedyskutowania w czasie obrony są jedynie dwa stwierdzenia z tej części rozprawy. Pierwsze pada na stronie 24 w opisie metody Monte Carlo: „If the new pose is more energetically favourable, it will be used to produce the following conformations.” i wydaje się sugerować, że tylko geometrie o energii niższej niż startowa są akceptowane w metodzie Monte Carlo. Drugie pojawia się na stronie 25 w opisie funkcji oceniającej i sugeruje że dokładne obliczenia powinowactwa do receptora mogłyby być zrealizowane: „... the available scoring functions approximate the energy rather than exact calculate the binding affinity.” Dyskusja różnych wkładów do entalpii swobodnej tworzenia kompleksu receptor-ligand oraz możliwych do zastosowania przybliżonych metod ich obliczania byłaby tutaj bardzo wskazana.

Ogólnym celem pracy, przedstawionym w podrozdziale 1.3, jest poprawa wiarygodności wyników dokowania molekularnego do zastosowania w CADD. Do osiągnięcia tego ogólnego celu Autorka planowała dojść poprzez realizację czterech celów szczegółowych, które związane były z badaniami nad wybranymi receptorami GPCR i mającymi umożliwić udzielenie odpowiedzi na następujące pytania:

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska  
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23  
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego  
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004  
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351



1. Czy sposób konstrukcji modelu homologicznego, w tym wybór struktury wzorcowej, ma wpływ na jakość otrzymanego modelu receptora GPCR?
2. Czy da się zidentyfikować specyficzne oddziaływania między ligandami a receptorami, które wyróżniają ligandy aktywujące receptor 5-HT<sub>7</sub> i nie wiążące się do 5-HT<sub>1A</sub>?
3. Jaki zestaw parametrów obliczeniowych i sposób generacji geometrii startowej ligandów jest optymalny pod względem predykcji geometrii kompleksu receptor-ligand?
4. Jaki jest wpływ wyboru funkcji oceniającej (ang. scoring function) na jakość wyników dokowania?

Każdemu z tych pytań szczegółowych poświęcony jest oddzielny rozdział rozprawy, odpowiednio rozdziały 3 do 6.

Rozdział 3 opisuje studium nad zależnością między wartością predykcyjną modelu homologicznego, która oceniana jest na podstawie wyników dokowania dużej grupy związków do otrzymanego modelu, a strategią konstrukcji modelu (jedno lub dwuetapowa) i podobieństwem sekwencji do zastosowanej struktury wzorcowej. Do konstrukcji modeli receptorów 5-HT<sub>1A</sub> i 5-HT<sub>7</sub> wykorzystano struktury receptorów 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , oraz D<sub>3</sub>. W mojej ocenie bardzo interesującymi obserwacjami poczynionymi przez Autorkę w tej części rozprawy są: 1) iż procedura jednoetapowa zadziałała nieco lepiej dla pierwszego z badanych receptorów, a dwuetapowa dla drugiego; 2) zaobserwowana korelacja między wynikami uzyskiwanymi dla modeli pełnych i częściowych (w procedurze 2-etapowej) sugeruje, że struktura obszaru transmembranowego ma kluczowe znaczenie dla wartości predykcyjnej modelu, oraz 3) brak wyraźnej zależności między podobieństwem sekwencji modelowany receptor – struktura wzorcowa a wartością predykcyjną otrzymanego modelu. Dodatkowo, bardzo intrygującą i jednocześnie sprzeczną z intuicją jest obserwacja, że grupując wyniki dla procedury dwuetapowej pod względem użytej struktury wzorcowej



dla pętli EL2 modele o najwyższej zdolności predykcji to te skonstruowane w oparciu o struktury o najniższym podobieństwie dla tego regionu białka. Czy Autorka mogłaby się pokusić przynajmniej o spekulacyjne wytłumaczenie tej niespodziewanej zależności ?

W rozdziale 4 Autorka opisała swoje próby konstrukcji modeli, które byłyby w stanie identyfikować ligandy selektywne względem receptorów 5-HT<sub>1A</sub> i 5-HT<sub>7</sub>. Ponieważ wyniki dokowania dla grupy 24 ligandów (zbiór treningowy) wykazały całkowity brak korelacji między doświadczalnie wyznaczoną stałą wiązania a otrzymaną wartością funkcji oceniającej, Autorka podjęła się zbudowania modelu farmakoforowego dla receptora 5-HT<sub>7</sub> opierającego się o rozkład potencjału elektrostatycznego wokół cząsteczki liganda, konkretniej na 12 sferach o promieniu 1.5 Å centrowanych na pozycjach atomów węgla tworzących rdzeń selektywnych ligandów, oraz analizę oddziaływań niewiążących między ligandem a kluczowymi resztami aminokwasowymi wyścielającymi kieszeń wiążącą. Niewątpliwym sukcesem tego modelu jest znaczący odsetek poprawnie zidentyfikowanych ligandów selektywnych względem receptora 5-HT<sub>7</sub> spośród sporych zbiorów związków wykorzystanych do weryfikacji tego modelu (Tabela 4.3 str 70). Rodzi się tutaj jednak pytanie na ile uniwersalny może być zaproponowany model. Czy można się spodziewać, że zadziała również dla selektywnych ligandów receptora 5-HT<sub>7</sub>, które będą się różnić schematem budowy od selektywnych ligandów wchodzących w skład zestawu treningowego ? Nieco światła na ten problem mogłaby rzucić prezentacja struktur selektywnych ligandów wchodzących w skład wszystkich czterech zestawów wykorzystanych w badaniach (treningowy, testowy, 1A-aktywne, 7-aktywne) oraz specyfikacja, które z nich zostały wybrane przez model do wynikowego zestawu związków.

Rozdział 5 opisuje wyniki obszernie zakrojonych i systematycznych testów, w których Autorka sprawdzała, na ile dobór parametrów dokowania oraz sposób przygotowania startowej geometrii liganda wpływają na dokładność otrzymywanej struktury kompleksu receptor-ligand. Jako obiekty badań posłużyły trzy receptory z rodziny GPCR: A<sub>2A</sub>, β<sub>1</sub> i β<sub>2</sub>, przetestowano 32 różnych wariantów doboru parametrów prowadzenia obliczeń oraz 7 metod generowania geometrii startowych ligandów. Jako bardzo ciekawą uważam



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni  
im. Jerzego Habera  
Polskiej Akademii Nauk



obserwację, iż optymalizacja cząsteczek ligandów z uwzględnieniem modelu rozpuszczalnika jest metodą dającą najślabsze wyniki dokowania, zwłaszcza w zakresie RMSD 0.7 – 1.5 Å (Rys. 5.5 str 85).

W rozdziale 6 opisane są wyniki badań przeprowadzonych przez Autorkę celem sprawdzenia, czy wykorzystanie funkcji oceniającej sparametryzowanej dla konkretnego białka, podrodziny lub rodziny białek wpływa na poziom poprawnej identyfikacji aktywnych ligandów w przebiegu dokowania molekularnego. Doktorantka przebadła 24 białka należące do 13 podrodzin klasy A GPCR, a uzyskane wyniki numeryczne niezbieżnie pokazują, że zastosowanie funkcji oceniającej dedykowanej danemu receptorowi bardzo znacząco poprawia poziom identyfikacji aktywnych ligandów (Tabela 6.2 str 94). Na uwagę zasługuje również fakt, iż doktorantka sama napisała program wykorzystujący algorytm genetyczny do optymalizacji postaci (wag) funkcji oceniającej programu AutoDock4.2.

Podobnie jak dla części literaturowej, stroną merytoryczną i redakcyjną tej części rozprawy oceniam bardzo pozytywnie. Z obowiązku recenzenta wymieniam tu jedyne dwa większe zauważone niedociągnięcia. Na początku strony 39 pojawia się niepełne zdanie, którego znaczenie nie jest jasne. Na stronie 91 Autorka przytacza wzór łączący stałą wiązania z wartością entalpii swobodnej dla tego procesu, jednakże w tekście używa pojęcia energii.

Przedstawione powyżej uwagi krytyczne mają jedynie charakter dyskusyjny i nie wpływają na ogólną pozytywną ocenę merytoryczną pracy doktorskiej Pani Katarzyny Rzęsikowskiej. Ilość cennych informacji teoretycznych i rzetelnie opisanych wyników własnych potwierdza, że Autorka dogłębnie przestudiowała literaturę i trafnie dobiera materiał i metody do badań. W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że Pani Katarzyna Rzęsikowska otrzymała wartościowe wyniki, wykazała się dużymi umiejętnościami w projektowaniu i wykonaniu badań oraz dobrze przeprowadziła interpretację uzyskanych wyników.

Za szczególnie interesujące osiągnięcia tej rozprawy uważam:

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska  
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23  
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego  
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004  
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351

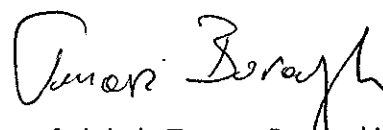


Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni  
im. Jerzego Habera  
Polskiej Akademii Nauk

KNOW | Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiedzy

1. nowatorskie połączenie obliczeń potencjału elektrostatycznego i analizy oddziaływań niewiążących (NCI) w konstrukcji heurystycznego protokołu do identyfikacji selektywnych ligandów receptora 5-HT<sub>7</sub>,
2. wykazanie, że spośród testowanych parametrów wybór funkcji oceniającej ma największe znaczenie dla jakości wyników dokowania,
3. wykazanie, że zmiana wag w definicji funkcji oceniającej jest bardzo skuteczną metodą zwiększenia jej dokładności względem wybranego receptora.

W związku powyższym stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone ustawą o stopniach i tytule naukowym i wnioskuję o dopuszczenie Pani Katarzyny Rzęsikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Tomasz Borowski

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska  
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23  
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego  
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004  
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351