



UNIwersYTET  
WARSAWSKI

Wydział Chemii



dr hab. Paulina M. Dominiak, prof. ucz.  
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Warszawski  
ul. Żwirki i Wigury 101  
02-089 Warszawa  
Tel.: 22 55 26 714  
E-mail: pdomin@chem.uw.edu.pl

Warszawa, dn. 12.09.2019

#### Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Rzęsikowskiej pt.  
„Conformational and methodological aspects of selected GPCRs' molecular docking studies for  
improvement of computer-aided drug design”  
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Lewińskiego  
oraz dr Justyny Kalinowskiej-Tłuścik na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego**

Jednym z celów zrównoważonego rozwoju współczesnego świata jest zapewnienie wszystkim ludziom dobrego zdrowia. Niewątpliwie, opracowywanie co raz to bardziej skuteczniejszych metod poszukiwania nowych leków jest jednym z ważniejszych sposobów realizacji tego celu. Przedstawiona praca doktorska dotyczy metod projektowania nowych leków wspieranych komputerowo (ang.: computed-aided drug design, CADD) stosowanych w procesie poszukiwania cząsteczek chemicznych oddziałujących w pożądanym sposób z białkami receptorowymi z rodziny GPCR. Białka GPCR należą do bardzo obszernej i różnorodnej rodziny białek transbłonowych i są zaangażowane w regulowanie wielu fizjologicznie ważnych procesów, takich jak np.: widzenie, odczuwanie smaków lub zapachów, regulacja hormonalna, czy uczenie się. Obecnie, ok. 1/3 leków na rynku celuje w białka GPCR. Jednocześnie, na całym świecie prowadzone są badania nad kolejnymi nowymi cząsteczkami modulującymi funkcje tych białek, z nadzieją na znalezienie skutecznych leków na cukrzycę, otyłość, chorobę Alzheimera i inne choroby centralnego układu nerwowego.

Wobec powyższego tematyka rozprawy mgr Katarzyny Rzęsikowskiej jest szczególnie ważna i aktualna.

Głównym celem rozprawy było zwiększenie skuteczności metod stosowanych w CADD, a dokładniej metod związanych z dokowaniem molekularnym, w kontekście ich zastosowania do białek GPCR.

Rozprawa jest napisana w języku angielskim i liczy 116 stron. Składa się z siedmiu rozdziałów obejmujących: Wstęp, Metodologię, cztery rozdziały prezentujące badania wykonane przez autorkę oraz Konkluzje. Dodatkowo na początku rozprawy załączone jest jej Streszczenie, a na końcu - Bibliografia. Informacje uzupełniające zostały dołączone w postaci elektronicznej na pendrive.

We Wstępie autorka prezentuje bardzo krótkie, dwu i pół stronicowe, ale bardzo zgrabne wprowadzenie do metod obliczeniowych stosowanych w projektowaniu leków. Uzasadnia jedynie dlaczego te metody są ważne, jakie są ich założenia oraz przedstawia ogólny zarys postępowania. Zwraca przy tym uwagę na istnienie dwóch różnych strategii: projektowanie leków w oparciu o strukturę celu, oraz projektowanie leków w oparciu o informacje dotyczące ligandów. Takie wprowadzenie w tym miejscu jest niezbędne, aby zdefiniować cele rozprawy. Natomiast szczegółowe opisy poszczególnych metod autorka słusznie przedstawia w kolejnym rozdziale. Szkoda jedynie, że nie umieściła do niego odnośnika. W kolejnej, najbardziej obszernej części Wstępu, obejmującej osiem stron, autorka szczegółowo opisuje białka GPCR. Sprawnie przedstawia klasyfikacje białek GPCR w oparciu o ich sekwencję, a potem omawia strukturę drugo- i trzeciorzędową najbardziej licznej i najlepiej poznanej strukturalnie klasy tych białek, klasy A. Następnie krótko omawia mechanizm aktywacji receptorów GPCR i transdukcji sygnału we wnętrzu komórki oraz wymienia problemy jakie badacze napotykają w procesie projektowania leków celujących w białka GPCR. Na końcu przedstawia szczegółowe cele rozprawy. Autorka zobowiązuje się odpowiedzieć na następujące pytania:

- Jaki wpływ mają różne metody konstrukcji modelu homologicznego, w tym wybór białka modelowego (template) na jakość uzyskanego modelu białka GPCR?
- Czy można zidentyfikować oddziaływania odpowiedzialne za specyficzność rozpoznawania ligandów przez receptor 5-HT<sub>7</sub> względem receptora 5-HT<sub>1A</sub>, czy analiza potencjału elektrostatycznego i oddziaływań niekowalencyjnych może w tym pomóc?
- Jakie są optymalne parametry procesu dokowania umożliwiające uzyskanie jak najbardziej dokładnych pozycji wiążących liganda?
- Czy istniejące funkcje oceniające można zmodyfikować, aby poprawić ich skuteczność w przewidywaniu siły wiązania?

W rozdziale Metodologia, liczącym 20 stron, autorka wnikliwie przedstawia metody oraz dostępne ich implementacje software'owe, którymi posługiwała się w swoich badaniach: uliniowanie sekwencyjne, drzewo filogenetyczne, modelowanie homologiczne, dokowanie ligandu do białka, topologiczna analiza gęstości elektronowej oraz analiza oddziaływań niekowalencyjnych przy użyciu zredukowanego gradientu gęstości elektronowej. Opis metod jest bardzo szczegółowy i świadczy o głębokiej znajomości większości narzędzi obecnie powszechnie stosowanych na świecie na polu

zagadnień badanych przez autorkę. Nasunęło mi się tu następujące pytanie szczegółowe. Na stronie 20, opisując metody stosowane do optymalizacji modelu strukturalnego otrzymanego w trakcie modelowania homologicznego autorka wspomina, że uwzględniane są takie oddziaływania niewiążące jak: oddziaływania elektrostatyczne, wiązania wodorowe i kontakty van der Waalsa. Również na stronie 25, przy opisie funkcji oceniających autorka pisze, że większość tych funkcji, obok oddziaływań elektrostatycznych bierze pod uwagę inne składowe, jak wiązanie wodorowe. Ponownie, na stronie 28 wiązanie wodorowe jest wymieniane jako niezależna składowa funkcji oceniającej, obok składowej elektrostatycznej. W dalszej części pracy z kolei autorka dyskutuje potencjał elektrostatyczny w kontekście możliwości utworzenia wiązań wodorowych (rozdział 4.7). Czy oddziaływania wodorowe jest oddziaływaniem zupełnie niezależnym od oddziaływań elektrostatycznych? Dlaczego w metodach stosowanych w polach siłowych wiązanie wodorowe jest wyodrębnione z puli oddziaływań elektrostatycznych? Pojawiła się też w tekście pewna nieścisłość. Mianowicie na stronie 22, w podrozdziale 2.4.1 autorka pisze „only translation is allowed”, a na stronie 23, w podrozdziale 2.4.2 – „three translational and three rotational degrees of freedom”. Czy brak wymienienia na stronie 22 rotacji jest poprawny? Na stronie 29, przy opisie analizy topologicznej zabrakło mi krótkiej dyskusji n. t. tego jakimi metodami można otrzymywać gęstość elektronowa badanego układu oraz jakiego oprogramowania można używać.

Po opisie metod, autorka przystępuje do przedstawienia swoich badań. W rozdziale 3 analizuje wpływ wyboru modelu strukturalnego (template) oraz strategii postępowania na jakość uzyskanego modelu homologicznego dwóch receptorów serotoniny: 5-HT<sub>7</sub> i 5-HT<sub>1A</sub>. Przez jakość rozumie nie tylko poprawność strukturalną uzyskanego modelu, ale przede wszystkim zdolność modelu do prawidłowego rozpoznania ligandów w obecności nieaktywnych cząsteczek w procedurze dokowania, oraz zdolność do odpowiedniego rozpoznania ligandów selektywnych względem białka 5-HT<sub>7</sub>. Po przeprowadzeniu bardzo wnikliwych badań autorka dochodzi do ważnego wniosku: w trakcie budowania modelu homologicznego należy sprawdzić wiele możliwych strategii i startowych modeli, włączając w to modele odległe ewolucyjnie. Nie można przewidzieć, które podejście będzie najbardziej odpowiednie dla badanego białka. Najwyraźniej metody stosowane w modelowaniu homologicznym nadal nie są w pełni uniwersalne. W wyniku przeprowadzonych badań autorka zaproponowała protokoły postępowania najbardziej odpowiednie dla białka 5-HT<sub>7</sub> i oddzielne dla białka 5-HT<sub>1A</sub>. I tu kolejne pytanie. Jakiej dokładnie metody autorka używała w celu weryfikacji poprawności stanu uprotonowania aminokwasów w modelach, które stosowała? Czy możliwość protonacji histydyny była też brana pod uwagę? Stan uprotonowania znacząco wpływa na badany później potencjał elektrostatyczny i oddziaływania międzycząsteczkowe.

Następnie (rozdział 4) autorka skupiła się na, moim zdaniem, najtrudniejszym z zagadnień prezentowanych w rozprawie. Czy dzięki powszechnie stosowanym metodom można zaprojektować strategię, która umożliwi identyfikację cząsteczek, które będą wiązać się z białkiem docelowym nie tylko z dużą siłą, ale również z dużą specyficnością. To bardzo ważne zagadnienie, ponieważ związane jest ono z pojawianiem się niepożądanych skutków ubocznych leków, gdy nie są one wystarczająco specyficzne. Ponownie, po przeprowadzeniu bardzo obszernych i skrupulatnych testów autorka dochodzi do wniosku, że przy użyciu standardowych protokołów prawdopodobieństwo identyfikacji specyficznego ligandu jest bardzo niskie. Następnie autorka proponuje nowe podejście, mianowicie proponuje przeprowadzanie ilościowej analizy potencjału elektrostatycznego ligandu, będącego w konformacjach uzyskanych w trakcie testowych procedur dokowania, w celu wyodrębnienia najważniejszych różnic między selektywnymi i nieselektywnymi ligandami. Dodatkowo proponuje przeprowadzenie analizy oddziaływań międzycząsteczkowych w oparciu o zredukowany gradient gęstości elektronowej kompleksu ligand-białko, również po to, aby zidentyfikować różnice w profilach oddziaływania. W przypadku badanego przez autorkę układu takie podejście pozwoliło zidentyfikować w sposób ilościowy cechy potencjału elektrostatycznego oraz oddziaływania charakterystyczne dla ligandów selektywnych względem białka 5-HT<sub>7</sub> w obecności 5-HT<sub>1A</sub>. Zaproponowany przez autorkę protokół znacząco zwiększył prawdopodobieństwo identyfikacji selektywnych ligandów. Uważam tę część badań autorki za najważniejsze i najbardziej oryginalne osiągnięcie z pośród tych przedstawionych w rozprawie.

Mam tylko jedną uwagę do tego rozdziału. Ponieważ potencjał elektrostatyczny okazał się bardzo użyteczną właściwością badanych ligandów, brakuje tu bardziej szczegółowego opisu w jaki sposób dokładnie został wyodrębniony potencjał elektrostatyczny dla atomów przy użyciu metody QTAIM. Dodatkowo, czy był jedynie uwzględniany potencjał zmapowany na izopowierzchni gęstości elektronowej, czy jednak był brany pod uwagę potencjał obejmujący większy obszar (jaki?).

W pozostałych dwóch rozdziałach autorka przedstawia badania, w których bardziej szczegółowo testuje różne ogólnie dostępne warianty procedury dokowania, sprawdzając, które z nich pozwalają na uzyskanie najbardziej dokładnych przewidywań pozycji (rozdział piąty) i siły wiązania (rozdział szósty) ligandów białek GPCR.

Na przykładzie rodzin białek GPCR z klasy A ( $A_{2A}$ ,  $\theta_1$ ,  $\theta_2$ ) autorka wykazała, że moc próbkowania (zdolność do przewidzenia pozycji wiązania ligandu) silnie zależy od przyjętej strategii dokowania, przy czym największy wpływ ma wybór funkcji oceniającej. Okazało się, że dla badanych układów funkcja oceniająca ASP była najbardziej skuteczna. Dodatkowo autorka wykazała, że również metoda

generowania różnorodnych konformerów liganda ma znaczenie, a metoda zaimplementowana w programie OpenEye Omega jest najbardziej skuteczna i nie ma konieczności przeprowadzania kosztownych obliczeń metodami chemii kwantowej.

Ostatecznie, autorka zbadła różne dostępne jej funkcje oceniające. Wykazała, że żadna z nich nie jest w stanie odpowiedzieć na pytanie, które z badanych ligandów wiążą się bardzo silnie, średnio lub słabo z wybranymi białkami GPCR należącymi do klasy A. W zasadzie, żadna z testowanych metod nie była w stanie skutecznie zidentyfikować ligandy o największym powinowactwie. W tej sytuacji autorka zaproponowała, napisała program i przeprowadziła procedurę optymalizacji wag przypisanych do każdego z komponentów energii wiązania wyliczanych przez funkcje oceniającą. Po wyznaczeniu wag optymalnych dla każdej z badanych podrodziny białek GPCR, autorka była w stanie zwiększyć skuteczność przewidywania siły wiązania. To drugie, najważniejsze moim zdaniem osiągnięcie autorki. Zwraca ono uwagę na potrzebę rozwoju nowych funkcji oceniających. W tym miejscu brakuje mi nieco dyskusji n. t. tego, które komponenty energii po optymalizacji wag zyskały większy wkład do energii całkowitej niż miały w oryginalnym schemacie, czy zawsze to były te same komponenty w zależności od podrodziny. Byłaby to cenna informacja dla osób budujących tego typu funkcje oceniające. Wyniki po raz kolejny pokazują, że procedury stosowane w CADD nie są uniwersalne, muszą być z dużą uwagą optymalizowane dla badanego układu. Autorka po raz kolejny udowadnia, że świetnie porusza się w metodologii stosowanej w CADD i jest w stanie przeprowadzać tego typu optymalizacje w sposób rzetelny i wiarygodny. Czy tego typu optymalizacja nie prowadzi jednak do niebezpieczeństwa, że procedury zostaną zoptymalizowane w oparciu o zbyt wąski zestaw testowy, w związku z czym będą ślepe na rozpoznanie nieznanymi do tej pory rodzajów ligandów i sposobów ich oddziaływania z białkiem docelowym? To pytanie ogólne, dotyczące wszystkich badaczy działających w obrębie dziedziny CADD. Ciekawa jestem zdania autorki.

Na koniec nasunęła mi się jeszcze jedna ogólna uwaga. Brakuje mi nieco komentarza w każdym z rozdziałów n. t. tego czy podobne badania były już wykonywane przez innych badaczy w przypadku białek GPCR lub innych, i jeżeli tak, do jakich wniosków dochodzili badacze. Jeżeli takich badań nie było, brakuje jasnego wypowiedzenia się, że dane podejście jest nowe, niespotykane do tej pory w literaturze.

Rozprawa napisana jest bardzo starannie, poprawnym językiem angielskim. Obarczona jest bardzo małą ilością błędów edytorskich:

- strona 17, wiersz 6 od dołu: jest napisane „is generate”, powinno być „is generated”;

- strona 32, rysunek nr 2.1: brakuje opisu czym jest kolorowa skala na wykresie i w jakich jednostkach jest ona wyrażona;
- strona 34, wiersz 2 od dołu: jest napisane „the lowest resolution”, bardziej zręcznie byłoby napisać „the best resolution”;
- strona 62, podpis do rysunku nr 4.6: Zdanie „The non-polar H atoms were omitted for figure clarity” jest mylące. Po pierwsze, na rysunkach A-D są obecne wszystkie atomy (w tym atomy wodoru), pod drugie, na schematach cząsteczek nie ma żadnych atomów wodoru, również tych polarnych związanych z atomami azotu.

Dostrzeżone przeze mnie drobne błędy czy nieścisłości nie mają wpływu na wartość naukową pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Autorka wykazała się głęboką znajomością metod powszechnie stosowanych w procesie komputerowego wspomaganie projektowania leków oraz ogólną wiedzą na temat białek GPCR. Autorka bardzo skrupulatnie i dogłębnie zbadała wpływ wielu czynników na jakość uzyskiwanych wyników na poszczególnych etapach projektowania ligandów wiążących się z docelowym białkiem GPCR z dużym powinowactwem i, co najważniejsze, z dużą specyficznością. Zaproponowała oryginalny sposób na zbudowanie protokołu postępowania umożliwiającego identyfikację ligandu o pożądanej specyficzności i wykazała jego skuteczność na przykładzie białek 5-HT<sub>7</sub> i 5-HT<sub>1A</sub>. W tym celu użyła analizy potencjału elektrostatycznego liganda wyznaczonego dla wybranych pozycji uzyskanych procesie dokowania ligandu do białka oraz analizy oddziaływań międzycząsteczkowych w oparciu o zredukowany gradient gęstością elektronowej kompleksu białko – ligand. Udowodniła, że jest w stanie pracować z dużą ilością danych, świetnie je dokumentować, skutecznie je analizować i wyciągać interesujące i użyteczne w praktyce wnioski. Zrealizowała wszystkie zakładane na wstępie cele badawcze.

Wobec powyższego stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595) wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2017, poz. 1789), rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego: w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 19 stycznia 2018 r. (Dz. U. z 30 stycznia 2018 r., poz. 261)) i na tej podstawie wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie pani mgr Katarzyny Rzęsikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam uwagę, że zgodnie z art. 13.6 w/w Ustawy, przedstawiona rozprawa doktorska powinna być opatrzona streszczeniem w języku polskim. Takie streszczenie zwyczajowo dołączane jest do rozprawy przedstawianej recenzentowi do oceny, a z pewnością musi zostać przedstawione na dalszych etapach przewodu doktorskiego.



Paulina Dominiak