



Warszawa, dn. 28.05.2019

Prof. dr hab. Sławomir Filipek,  
Wydział Chemii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych,  
Uniwersytet Warszawski,  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
Tel. 22-55-26405,  
E-mail: sfilipek@chem.uw.edu.pl

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej mgr. Wiktorii Jedwabny, pt.**

**Analysis of the interactions in protein binding sites**  
**as a tool aiding inhibitory activity prediction**

Rozprawa jest napisana po angielsku i liczy 134 strony. Obejmuje 369 odnośników literaturowych, co wskazuje na bardzo duży wkład Doktorantki w wyszukanie, uporządkowanie i analizę tych prac. Rozprawa jest oparta na 6-ciu publikacjach: w *J. Phys Chem. B* (2014), *Med. Chem. Comm.* (2017), *J. Comput.-Aided. Mol. Des.* (2017), *Molecules* (2018), *Theor. Chem. Acc.* (2018), oraz *J. Mol. Model.* (2018). Doktorantka jest pierwszą autorką we wszystkich tych publikacjach co dowodzi ogromnego wkładu pracy włożonego w otrzymanie i wyczerpującą analizę wyników. Szkoda jednakże, że te publikacje nie zostały zebrane na jednej liście, co może utrudniać ocenę wkładu pracy doktorantki. Rozprawa jest bogato zilustrowana i zawiera 33 schematy, wykresy oraz rysunki struktur molekularnych, a także 34 tabele, z czego 13 z nich znajduje się w dodatkach A-D do rozprawy. Zamieszczona długa lista używanych skrótów znakomicie ułatwia czytanie rozprawy i odnajdywanie się w zawiłościach stosowanych metod teoretycznych oraz badanych układów białko-ligand.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa nie ma charakteru klasycznej rozprawy doktorskiej z podziałem na Wstęp, Metody, Wyniki i Dyskusję, a jest odzwierciedleniem wyników otrzymanych i opublikowanych w ww. publikacjach, dlatego dysertacja ta jest podzielona na 4 główne rozdziały: wstęp z podaniem celów rozprawy (4 strony), wstęp literaturowy metodologiczny (21 stron), uzyskane wyniki i ich dyskusja (sześć podrozdziałów na 54 stronach), opis rozszerzenia stosowanej funkcji  $D_{as}$  (5 stron), oraz Podsumowanie



(8 stron). Dodatki A-D przedstawiające głównie rozległe tabele z otrzymanymi szczegółowymi danymi przedstawione są na 16 stronach.

W części literaturowej Doktorantka zwięźle przedstawia założenia stosowanych metod obliczeniowych a w tym rachunek zaburzeń oraz jego odmiany: o adaptowanej symetrii (*Symmetry-Adapted Perturbation Theory* - SAPT) oraz mieszana metoda wariacyjno-perturbacyjna (*Hybrid Variation-Perturbation Theory* – HVPT). Aby porównywać obliczenia nieempiryczne z modelowaniem molekularnym opisana jest także w skrócie metoda dokowania ligandów oraz funkcje oceniające stosowane dla takiego dokowania. Z uwagi na ważność poszczególnych członów w wyrażeniu dla nieempirycznej energii oddziaływania przedstawione zostały człon elektrostatyczny w rozwinięciu multipolowym w jego różnych odmianach oraz człony korelacyjne, dyspersyjne i wymienne. Doktorantka opisuje także funkcję  $D_{as}$  będącą sumą członów dyspersyjnych oraz wymiennie-dyspersyjnych. Funkcja ta jest wykorzystywana przez Doktorantkę jako prosty nieempiryczny model do obliczenia energii oddziaływania w układzie ligand-białko w celu oceny aktywności inhibicyjnej badanych ligandów. Przedstawione opisy są zwięźle lecz w zupełności wystarczające do zorientowania się z tematyce prowadzonych badań i do śledzenia wyników opisanych w kolejnych rozdziałach. Jak przedstawiono w celach pracy, zaproponowany model MED obejmujący oddziaływania elektrostatyczne w rozwinięciu multipolowym oraz funkcję  $D_{as}$  miał być prosty ale wystarczający aby uzyskać dobrą korelację z wynikami doświadczalnymi inbibicji badanych białek, a okazał się lepszy od większości empirycznych funkcji oceniających stosowanych zarówno w programach komercyjnych jak i tych będących w domenie publicznej.

Model oddziaływań MED został przetestowany dla pięciu białek: hydrolaza amidów kwasów tłuszczowych (FAAH) z 22 inhibitorami; menina z 18 inhibitorami zastępującymi oddziaływanie menina-MLL (*mixed lineage leukemia*); reduktaza pterydyny 1 pasożyta *Trypanosoma brucei* z 6 inhibitorami; receptor efrynowy A2 z 15 inhibitorami; oraz fosfodiesteraza 5 (PDE5) z 5 inhibitorami podstawionymi szeregiem halogenów F, Cl, Br, I. Przedstawione wyniki zostały opisane w szeregu wymienionych powyżej publikacji i pokazują, że zastosowanie modelu MED dla układów zawierających podobne ligandy ze zmieniającymi się podstawnikami prowadzi do uzyskania bardzo dobrych korelacji z wynikami doświadczalnymi aktywności biologicznych. Ograniczenie do szeregu podobnych ligandów jest uwarunkowane obliczaniem poprawki solwatacyjnej z przybliżonego modelu, a która nie może być wyznaczona z członów energetycznych. Zastosowane układy badawcze są



reprezentatywne dla oddziaływań enzym-inhibitor i obejmują serie ligandów hydrofobowych w przypadku białka hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych, ligandy polarne oraz zawierające atomy fluoru w przypadku białka meniny, ligandy aromatyczne oraz zawierające atomy chloru jako inhibitory reduktazy pterydiny, ligandy naładowane ujemnie zawierające grupę karboksylową jako inhibitory receptora efrynowego A2, oraz serię pochodnych halogenów dla fosfodiesterazy 5. Dla wszystkich tych serii ligandów zastosowana metoda MED okazała się być w większości przypadków lepszą od zastosowanych 19-tu empirycznych funkcji oceniających.

Dla struktur krystalicznych nie stosowano optymalizacji położenia aminokwasów w miejscu wiążącym ligand, a dla modeli badanych białek zastosowano częściową optymalizację tj. ograniczenie zmian położenia tylko dla aminokwasów w miejscu aktywnym leżących w odległości poniżej 4 Å od liganda. Metoda ta jest wystarczająca dla uzyskania struktur dla dokowania serii ligandów i porównywania z empirycznymi funkcjami oceniającymi. Nie stosowano również klasycznego dokowania ligandów do miejsca aktywnego enzymu, co mogło by poprawić uzyskane wartości energii oddziaływania z ligandem dla tych programów. Stosowane obecnie procedury dokowania pozwalają także na dokowanie giętkie uwzględniające zarówno cząsteczkę liganda ale także aminokwasy w miejscu aktywnym. Obliczenie energii oddziaływania w ten sposób trwa dłuższej ale i tak będzie wielokrotnie szybsze od stosowanej metody nieempirycznej MED. Interesujące byłoby zatem porównanie uzyskanych w ten sposób wyników, skorelowanych z aktywnościami biologicznymi, z metodą MED.

W podsumowaniu Doktorantka dokonuje całościowej oceny stosowanej metody MED w porównaniu do użytych metod empirycznych oraz przedstawia w punktach uzyskane wyniki dla poszczególnych białek podając także w jakiej publikacji te wyniki zostały opisane. Dla białka FAAH publikacja [197] nie zawiera jednakże aktualnego nazwiska Doktorantki – co nie zostało skomentowane. Z kolei dla białka meniny jest wymieniona tylko jedna publikacja [281] natomiast Doktorantka jest również pierwszą autorką publikacji [339] z tego samego tematu.

Z obowiązku recenzenta wymienię bardzo nieliczne uchybienia, znajdujące się w rozprawie. Na stronie 47 na rys. 3.9 przedstawiono wykres zależności przewidywanych i empirycznych wartości potencjału inhibicji ( $pIC_{50}$ ) dla siedmiu nowych inhibitorów. Najślabszy z nich o nr 7 jest klasycznym przykładem punktu na wykresie typu *outlier* i może być usunięty z wykresu ale wtedy współczynnik korelacji drastycznie spadnie. Ten przypadek



nie został przedyskutowany w rozprawie. Z kolei brak pokazanych całościowych struktur białek, także w reprezentacji powierzchni molekularnej, utrudnia zorientowanie się gdzie leży miejsce wiązania liganda, czy we wnętrzu białka czy na jego powierzchni, i jak głębokie jest to miejsce wiążące. Ma to wpływ na oszacowanie energii solwatacji. Lepsze oszacowanie tej energii być może pozwoliło by na zastosowanie metody MED nie tylko dla serii ligandów ale także dla dowolnych ich układów. Odnośniki literaturowe 1 i 241 są identyczne.

Podsumowując, rozprawa jest napisana bardzo dobrym językiem naukowym oraz znakomitym językiem angielskim. Wyżej wymienione niedociągnięcia nie przesłaniają znaczącej wartości naukowej rozprawy oraz bardzo dobrego przygotowania merytorycznego Doktorantki. Opisane w rozdziale 4 rozszerzenie funkcji  $D_{as}$  na 6 dodatkowych pierwiastków mogących występować w inhibitorach może znakomicie ułatwić praktyczne zastosowanie metody MED do badania układów ligand-białko. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia zatem warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), dlatego przedkładam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr. Wiktorii Jedwabny do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wkład pracy oraz uzyskane i opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym wyniki wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy.

Sławomir Filipek