

Wpł. 27.06.2023 r.  
RDITT M. Skowron

Prof. dr hab. Bogdan Lesyng  
Wydział Fizyki  
oraz Centrum Uczenia Maszynowego  
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 23.06.2023

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Tytuł rozprawy:

Algorithms for the analysis of molecular protein structures and drug-like ligands for modeling and simulation of residence time drug-molecular target

w języku polskim

(Algorytmy analizy struktur białkowych i ligandów lekopodobnych w celu modelowania i symulacji czasu przebywania leku w miejscu docelowym )

Autor rozprawy: Mgr inż. Magdalena Ługowska  
Promotorzy rozprawy: Prof. dr hab. inż. Marek Kimmel (Rice University)  
Dr inż. Marcin Pacholczyk (Politechnika Śląska)

Przedmiotem badań rozprawy jest rozwinięcie i przetestowanie wybranych teoretycznych modeli obliczeniowych przewidywania czasów przebywania ligandów w miejscach wiążących wybranych rodzin białek, ich bimolekularnych targetów oraz analiza możliwości sprawdzenia czy mogą one być stosowane w sposób uniwersalny, niezależnie od wielkości ligandów i rodziny badanych białek. W wielu przypadkach, takie czasy dobrze korelują się ze skutecznością molekuł leków *in vivo*, lepiej niż powinowactwa wiązania. Im bowiem dłuższy czas leku w jego miejscu wiążącym, tym większe prawdopodobieństwo jego skutecznego działania. Inaczej mówiąc, molekuly leków są farmakologicznie aktywne tak długo jak długo pozostają związane z receptorem. Dlatego wyznaczanie, lub przynajmniej szacowanie czasów przebywania ligandów w miejscach docelowych, tzw. *residence times* - typowo oznaczanych jako  $\tau$ , stało się popularnymi procedurami, zarówno eksperymentalnymi jak i teoretycznymi, oceny skuteczności potencjalnych leków. Czas przebywania związany jest z stałą szybkości dysocjacji relacją odwrotności,  $\tau = 1/d_{\text{diss}}$ . Czasy takie wraz z innymi parametrami kinetycznymi reakcji brane są pod uwagę w badaniach nad selekcją molekuł, kandydatów na potencjalne leki.

Jeżeli chodzi o badania eksperymentalne, bezpośrednie lub wspomagające, istnieją różne metody pomiaru czasu przebywania kompleksu receptor-ligand, takie jak:

- różnicowanie spektroskopowe - polegające na wykrywaniu zmian we właściwościach spektroskopowych ligandu lub receptora po związaniu, takich jak fluorescencja, absorpcja lub jądrowy rezonans magnetyczny, oraz monitorowaniu zaniku tych sygnałów w czasie,
- odzyskiwanie aktywności biologicznej - wykorzystujące test funkcjonalny przywrócenia aktywności receptora po usunięciu ligandu,
- metody separacji - obejmujące rozdzielanie związanych i wolnych ligandów środkami fizycznymi.

Jeżeli chodzi natomiast o badania teoretyczne problem jest trudniejszy, bowiem takie metody jak molekularna dynamika wymagają bardzo długich czasów symulacji, często technicznie nieosiągalnych, żeby zaobserwować zdarzenie wejścia i wyjścia ligandu do jego centrum wiążącego. Przedmiotem rozprawy doktorskiej była w związku z tym analiza i zastosowania dostępnych metod obliczeniowych, które pozwalają na zrozumienie i analizę kinetyki wiązania lub niewiązania ligandów, a także udoskonalenie wcześniejszych metod w celu wyznaczania czasów przebywania ligandów w celu. Są to metody dynamiki molekularnej (MD), wykorzystanie modeli Markowa i uczenia maszynowego (ML) oraz ich łączenie.

Autorka rozprawy opracowała w związku z tym wariant metody dynamiki molekularnej o nazwie  $\tau$ RAMD ( $\tau$ -Random Acceleration Molecular Dynamics), która z wykorzystaniem heurystycznej stochastycznej procedury znacząco przyspiesza proces wyjścia zadokowanego liganda z miejsca wiążącego, a moment wyjścia może być skorelowany z fizycznym czasem przebywania leku (*residence time*) w miejscu wiążącym.

Rozprawa o konwencjonalnej strukturze zawiera 107 stron, napisana jest poprawnie w języku angielskim. Wyniki rozprawy zostały w części opublikowane (lub są w druku) w następujących pracach:

- M. Ługowska, M. Pacholczyk, Revealing ligand unbinding kinetics using advanced computational methods: a review; *Current Protocols in Molecular Biology*; 2023 (under review); IF 2.74
- M. Ługowska, M. Pacholczyk, PDBrt: A free database of complexes with measured drug-target residence time [version 2; peer review: 1 approved, 1 approved with reservations]. *F1000Research* 2022, 10 (*Chem Inf Sci*):1236 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.73420.2>)
- T. Magdziarz, et.al., AQUA-DUCT: a ligands tracking tool, *Bioinformatics*, vol. 33, nr 13, 2017, s. 2045-2046, DOI:10.1093/bioinformatics/btx125, IF=5.481

oraz prezentowane w postaci 6-ciu konferencyjnych doniesień.



Metoda  $\tau$ RAMD została zastosowana do 5-ciu różnych systemów białkowych do oszacowania względnego czasu przebywania. W szczególności zastosowanie  $\tau$ -RAMD dla 70 różnych ligandów HSP90 pokazało, że dla 55 z nich istnieje silna korelacja pomiędzy średnią długością trajektorii dysocjacji a zmierzonym eksperymentalnie czasem przebywania. Ponadto w celu walidacji metody przeprowadzono badania dla 11 inhibitorów białka InhA, a także 3 ligandów białek ENR, EGFR i HIV-1.

Wyniki  $\tau$ RAMD wykazują dobrą lub silną korelację z doświadczalnie wyznaczonym czasem przebywania dla ligandów o podobnej strukturze, natomiast dla zróżnicowanego strukturalnie zestawu ligandów metoda okazała się mieć jednak dość niską skuteczność - zatem jej zastosowanie w procesie identyfikacji potencjalnych leków będzie raczej ograniczone. Analiza głównych składowych (PCA) pozwoliła zidentyfikować czynniki odpowiedzialne za zróżnicowanie czasów przebywania ligandów. Autorka rozprawy zidentyfikowała niektóre szczególne oddziaływania van der Waalsa oraz niektóre oddziaływania hydrofobowe.

Bez wątpienia wartościowym elementem pracy doktorskiej jest stworzenie bazy danych kinetycznych PDBrt dostępnej ogólnie pod adresem internetowym <https://pdbrt.polsl.pl/>.

Jeżeli chodzi o uwagi krytyczne to metoda  $\tau$ RAMD stanowi raczej niewielkie udoskonalenie, analogicznych, poprzednio referowanych w literaturze metod (patrz np. R. C. Wade et al., *JCTC*, 14,7, 2018; A. Cavalli et al., *J. Med. Chem.*, 59, 15, 7167–7176, 2016; M. Vanmeert et al., *Processes*, 9, 71, 2021).

Jeżeli chodzi o bazy danych kinetycznych, to w literaturze istnieje kilka innych baz, np. BindingDB (<https://www.bindingdb.org/rwd/bind/index.jsp/>), PLBD (<https://plbd.org/db/>) czy PLAS-5k (<https://www.nature.com/articles/s41597-022-01631-9/>), które zawierają jeżeli nie bezpośrednio czasy rezydencji to niektóre z nich zawierają np. stałe szybkości dysocjacji. Warto byłoby wymienić te bazy danych w pracy doktorskiej, ewentualnie również porównać ich zawartości i/lub funkcjonalności z nowo stworzoną.

Patrząc szerzej na tematykę doktoratu, wydaje mi się że istotniejszy postęp w uzgodnieniu wyników teoretycznych symulacji tego typu jak prezentowanych w pracy doktorskiej oraz badań eksperymentalnych może nastąpić przez uwzględnienie spektroskopowych danych monitorowania dynamik pojedynczych enzymów (patrz np. H. Peter Lu et al. *Science* 282, 1877, 1998 i późniejsze prac), jak również np. danych spektroskopowych z wykorzystaniem technik relaksacyjnych (np. S. E. Halford, *Biochem. J.* 149, 411-422, 1975, J.M. Antosiewicz and M. Długosz, *J. Phys. Chem.*, B 2018 122 (50), 11817-11826 i inne równoległe lub późniejsze prace). Wtedy można byłoby dokonać walidacji teoretycznych metod nie tylko szacując średnie czasy rezydencji ale również czasowe rozkłady prawdopodobieństw tych wielkości, co znacznie wzbogaciłoby wiedzę o fizyce tych procesów.

Zakładam, że Doktorantka będzie mogła ustosunkować się do moich uwag w czasie obrony doktoratu.

Na zakończenie chciałbym podkreślić, że większość wyników rozprawy została opublikowana w recenzowanych czasopismach i/lub prezentowana na konferencjach, forma doktoratu jest poprawna a Doktorantka posiada doświadczenie w realizacji dość złożonych procesów symulacyjnych i analizy wyników, co wymaga również dobrych umiejętności programistycznych.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Ługowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego związanego z naukami inżynieryjno-technicznymi. Zarówno rozprawa jak i dorobek publikacyjny dowodzą, że Doktorantka ma ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie informatyka techniczna i telekomunikacja i potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe w wykorzystaniem metod informatycznych. Recenzowane dzieło spełnia ustawowe (tj. ustawa – ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Ługowskiej do dalszych etapów postępowania prowadzącego do uzyskania stopnia naukowego doktora w dyscyplinie informatyka techniczna i telekomunikacja.



Prof. dr hab. Bogdan Lesyng