



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

**Autoreferat**

*Komputerowe metody określania struktur wybranych receptorów  
GPCR i modelowanie ich potencjalnych ligandów.*

**dr n. farm. Kamil J. Kuder**

**Kraków 2022**

## Spis treści

1.	Imię i nazwisko.....	2
2.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....	2
3.	Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	2
4.	Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). .....	3
4.1.	Tytuł osiągnięcia naukowego.....	3
4.2.	Zestawienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego .....	3
4.3.	Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania. ....	4
4.3.1.	Wprowadzenie i cel naukowy przeprowadzonych badań .....	4
4.3.2.	Założenia i cel badawczy .....	7
4.4.	Omówienie poszczególnych prac składających się na cykl .....	7
4.4.1.	Receptory adenozynowe (AARs).....	7
4.4.2.	Receptor sierocy GPR18.....	18
4.4.3.	Receptor H <sub>3</sub> histaminowy .....	31
4.4.4.	Receptor H <sub>4</sub> histaminowy .....	38
4.5.	Podsumowanie.....	42
4.6.	Bibliografia.....	44
5.	Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	47
5.1.	Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora .....	47
5.2.	Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora.....	49
5.3.	Otrzymane stypendia i nagrody za osiągnięcia naukowe.....	51
6.	Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę. 51	
6.1.	Działalność dydaktyczna .....	51
6.2.	Prace magisterskie.....	52
6.3.	Praca doktorska .....	52
6.4.	Opieka nad studentami.....	53
7.	Pozostałe informacje .....	53
7.1.	Konferencje naukowe.....	53
7.2.	Wyjazdy naukowe .....	53
7.3.	Szkolenia.....	53
7.4.	Działalność organizacyjna .....	54
7.5.	Udział w projektach badawczych.....	54
7.6.	Recenzje prac naukowych .....	56
7.7.	Recenzje projektów i grantów .....	56

## Autoreferat

### 1. Imię i nazwisko.

Kamil Jarosław Kuder

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.

**12.12.2011**

doktor nauk farmaceutycznych,

specjalność: chemia medyczna

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wydział Farmaceutyczny

**Tytuł rozprawy doktorskiej:** *Poszukiwanie ligandów receptorów H<sub>3</sub> i H<sub>4</sub> histaminowych*

**Promotor:** prof. Katarzyna Kieć-Kononowicz

**28.02.2005**

magister farmacji

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wydział Farmaceutyczny

**Tytuł pracy magisterskiej:** *Poszukiwanie nieimidazolowych antagonistów receptorów H<sub>3</sub> histaminowych*

**Promotor:** prof. Katarzyna Kieć-Kononowicz

### 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

**1.12.2014**

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych

stanowisko: adiunkt

**10.10. 2011 – 30.11.2014**

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych

stanowisko: asystent

**01.03. 2005 – 09.10.2011**

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii i Biotechnologii Środków  
Lecznicych

stanowisko: asystent, ½ etatu

**4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).**

**4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

*Komputerowe metody określania struktur wybranych receptorów GPCR i modelowanie ich potencjalnych ligandów.*

**4.2. Zestawienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**

Przedstawione osiągnięcie naukowe wynikające z art. 219, ust. 1, pkt. 2b ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce stanowi cykl 7 powiązanych tematycznie artykułów naukowych, z których 6 stanowią prace oryginalne, natomiast 1 artykuł jest publikacją przeglądową. Prace te zostały opublikowane w latach 2016–2022. Sumaryczny Impact Factor (IF) prac składających się na osiągnięcie naukowe wynosi: **25.778**.

**[H1] Kamil J. Kuder** \*§; Michał Załuski \*; Jakub Schabikowski; Gniewomir Latacz; Agnieszka Olejarz-Maciej; Piotr Jaśko; Agata Doroz-Płonka; Andreas Brockmann; Christa E. Müller; Katarzyna Kieć-Kononowicz. Novel, Dual Target-Directed Annelated Xanthine Derivatives Acting on Adenosine Receptors and Monoamine Oxidase B. *ChemMedChem*, 2020: Vol. 15, nr 9, s. 772-786; **IF = 3.446, MNiSW = 100**

**[H2] Kamil J. Kuder** §; Ilona Michalik; Katarzyna Kieć-Kononowicz; Peter Kolb. A Taxicab geometry quantification system to evaluate the performance of in silico methods : a case study on adenosine receptors ligands. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2020: Vol. 34, nr 6, s. 697-707; **IF = 3.686, MNiSW = 70**

**[H3] Kamil J. Kuder**; Tadeusz Karcz; Maria Kaleta; Katarzyna Kieć-Kononowicz. Molecular Modeling of an Orphan GPR18 Receptor. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2019 : Vol. 16, nr 10, s. 1167-1174; **IF = 1.169, MNiSW = 20**



[H4] Ilona Michalik\*, **Kamil J. Kuder** \*§; Katarzyna Kieć-Kononowicz, Jadwiga Handzlik. Structure Prediction, evaluation and Validation of GPR18 Lipid Receptor Using Free Programs. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022: Vol. 23, nr 14, id. art. 7917; **IF = 6.208**, **MNiSW = 140**

[H5] **Kamil J. Kuder** §; Magdalena Kotańska; Katarzyna Szczepańska; Kamil Mika; David Reiner-Link; Holger Stark; Katarzyna Kieć-Kononowicz. Discovery of Potential, Dual-Active Histamine H3 Receptor Ligands with Combined Antioxidant Properties. *Molecules*, 2021 : Vol. 26, nr 8, id. art. 2300; **IF = 4.927**, **MNiSW = 140**

[H6] Dorota Łażewska; Enrique Dominguez-Alvarez; Katarzyna Kamińska; **Kamil J. Kuder**; Katarzyna Kieć-Kononowicz. Monocyclic and Fused Azines and Azoles as Histamine H4 Receptor Ligands. *Current Medicinal Chemistry*, 2016 : Vol. 23, nr 18, s. 1870-1925. **IF = 3.249**, **MNiSW = 35**

[H7] Dorota Łażewska; Szczepan Mogilski; Stefanie Hagenow; **Kamil J. Kuder**; Monika Głuch-Lutwin; Agata Siwek; Małgorzata Więcek; Maria Kaleta; Ulla Seibel; Armin Buschauer; Barbara Filipek; Holger Stark; Katarzyna Kieć-Kononowicz. Alkyl derivatives of 1,3,5-triazine as histamine H4 receptor ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2019 : Vol. 27, nr 7, s. 1254-1262; **IF = 3.073**, **MNiSW = 70**

\* prace o równocennym wkładzie autorskim

§ prace, w których występowałem w roli autora korespondencyjnego

### **4.3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

#### 4.3.1. Wprowadzenie i cel naukowy przeprowadzonych badań

##### Receptory GPCR jako współczesne cele terapeutyczne

Prezentowany powyżej cykl prac dotyczy wybranych aspektów komputerowo wspomaganego poszukiwania ligandów wybranych receptorów sprzężonych z białkiem G (*ang. G-Protein Coupled Receptors; GPCRs*). Stanowiąc ~3% ludzkiego proteomu, są największą i najbardziej zróżnicowaną nadrodziną receptorów błonowych. Zbudowane z siedmiu transmembranowych helis, pośredniczą w odpowiedzi na bodźce zewnątrzkomórkowe poprzez przekazywanie

informacji do wnętrza komórki pod wpływem różnych czynników. Transdukcja sygnału przez GPCRs rozpoczyna się zwykle od utworzenia kompleksu białko-ligand, który jednocześnie zmienia konformację receptora i aktywuje białko G, uruchamiając tym samym dalszą kaskadę reakcji, będącą kluczowym procesem w fizjologii człowieka. Proces ten, wpływa między innymi na podstawowe funkcje układu nerwowego, endokrynnego i sercowo-naczyniowego, a to z kolei decyduje o ogromnym potencjale terapeutycznym ligandów dla tych receptorów [1]. Szacuje się, że GPCRs są celem dla 30-50% leków wprowadzanych na rynek. Niezależnie od przyjętego systemu identyfikacji GPCRs, receptory dzielone są na mniejsze podgrupy w ramach klas w zależności od ich naturalnych ligandów [2]. W ramach badań stanowiących przedstawiony cykl, w głównej mierze skupiłem się na wybranych przedstawicielach 3 rodzin receptorów związanych z białkiem G: adenozynowych ([H1, H2]), histaminowych ([H5-H7]) i „odsieroconym” receptorze GPR18 ([H3, H4]). Krótka charakterystyka wybranych celów biologicznych została przedstawiona wraz z opisem poszczególnych składowych dokonania naukowego.

#### Wykorzystanie metod obliczeniowych we współczesnym projektowaniu leku

Proces wprowadzenia nowego leku na rynek, poza dużą dozą konkurencyjności wymaga również ogromnych nakładów czasowych (średnio 10-15 lat) i finansowych. Według danych z 2020r. koszt opracowania i wprowadzenia leku na rynek w przeciągu ostatniej dekady wzrósł ok.150% i szacuje się go (w zależności od źródła) na zakres od 314 milionów do ok. 2,8 miliardów USD [3]. Jednocześnie wskaźnik niepowodzeń w testach klinicznych z powodu braku skuteczności lub wystąpienia niepożądanych skutków ubocznych wzrósł do ok. 90%. Wprawdzie rozwój metod chemii kombinatorycznej czy skriningu wysokoprzepustowego (HTS) pozwala na obniżenie całościowych kosztów, wciąż jednak te zaawansowane techniki są czasochłonne i kosztowne. Skuteczną, efektywną i co najważniejsze w kwestiach rynkowych, tańszą alternatywą, okazały się szeroko rozumiane komputerowo wspomagane metody poszukiwania leku (*ang. Computer Aided Drug Design, CADD*), znajdujące zastosowanie na różnych etapach opracowywania nowych leków [4].

Powszechny rozwój informatyki, umożliwiając efektywne wykorzystanie metod obliczeniowych na różnych etapach projektowania i badań nad lekiem, pozwala chociażby na przewidywanie położenia małych cząsteczek w trójwymiarowej reprezentacji struktury białka i szacowanie powinowactwa ligandów do białka docelowego ze znaczną dokładnością i wydajnością na poziomie molekularnym. Stanowi to ostateczną przewagę konkurencyjną narzędzi projektowania leków w oparciu o strukturę (*ang. Structure-Based Drug Design;*

SBDD) we wczesnych fazach odkrywania leku. SBDD to cykliczny proces projektowania i optymalizacji struktury chemicznej w celu zidentyfikowania związku odpowiedniego do badań klinicznych - kandydata na lek. Opiera się na wiedzy o trójwymiarowej strukturze leku, oraz o tym, jak jego kształt i ładunek powodują, że wchodzi on w interakcję z biologicznym celem, ostatecznie wywołując efekt medyczny. Rozpoczynając od znanej struktury docelowej, badania przeprowadzane *in silico* pozwalają nie tylko na identyfikację potencjalnych ligandów, lecz także poznanie możliwego wpływu elementów struktury na oddziaływanie z celem.

W rzeczywistości jednak istnieje ogromna dysproporcja pomiędzy ilością poznanych białek, a ich rozwiązanymi strukturami. Przykładowo, baza Uniprot (<http://uniprot.org>) w swoich zasobach ma ponad 560 tys. rekordów dla białek, podpartych danymi literaturowymi i przeanalizowanych przez człowieka. W kolejce do adnotacji czeka jeszcze ok. 231 mln rekordów – każdy z nich opisuje sekwencję jednego białka. W przeciwieństwie do tego, baza PDB (<http://rcsb.org>) zawiera rozwiązane struktury krystaliczne białek (za pomocą metod rentgenograficznych, NMR lub mikroskopii krioelektronowej) w liczbie niewiele ponad 195 tysięcy rekordów (niejednokrotnie kilka-kilkanaście struktur dla jednego białka; stan na 27.09.2022). Główną przyczyną takiej dysproporcji jest ogromna trudność w krystalizacji białek, zwłaszcza białek błonowych, głównie ze względu na trudności w oczyszczeniu i krystalizacji takich białek w porównaniu z innymi małymi białkami rozpuszczalnymi w wodzie. W przypadku GPCRs, do chwili obecnej tylko 136 członków tej ogromnej rodziny białek zostało rozwiązanych w postaci struktur krystalicznych [5, 6].

Bazując na fakcie, że region transmembranowy wszystkich GPCR jest dobrze zachowany (zakonserwowany), a także wiedząc, że większość miejsc wiążących ligandy w klasie A GPCR jest otwarta w kierunku regionu pozakomórkowego [7], z pomocą przychodzi modelowanie homologiczne - użyteczne narzędzie do projektowania ligandów w oparciu o strukturę. Jednakże dokładność modeli może być ograniczona, głównie w obszarze pętli zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych. Przyczyn takiego stanu rzeczy można szukać w wysoce zmiennych sekwencjach pętli, często odpowiadających niezaangażowanym regionom w nałożeniach sekwencji, a także ich lokalizacji na eksponowanej na rozpuszczalnik powierzchni białek, co skutkuje większą elastycznością konformacyjną. Co prawda ostatnie lata przyniosły zaskakujące rezultaty w przewidywaniu struktur białek z zastosowaniem algorytmów głębokiego uczenia (DeepMind/AlphaFold2), które szybko stały się standardem w generowaniu modeli homologicznych, jednak najświeższe doniesienia literaturowe i własne,

nieopublikowane badania pozwalają na zachowanie zasady ograniczonego zaufania w stosunku do użyteczności modeli AF2.

#### 4.3.2. Założenia i cel badawczy

Biorąc pod uwagę powyższe, nadrzędnym celem moich badań było określenie potencjalnych oddziaływań nowych ligandów dedykowanych poszczególnym celom biologicznym na poziomie molekularnym i możliwe poznanie wpływu poszczególnych elementów strukturalnych na ich aktywność biologiczną. W przypadku braku eksperymentalnie rozwiązanej struktury, moje badania w pierwszej kolejności skupiały się na wygenerowaniu rzetelnego modelu homologicznego. Dodatkowo, w przypadku ligandów celowanych na receptory adenozynowe, dokonałem próby stworzenia systemu liczbowego pozwalającego na przewidywanie selektywności względem poszczególnych celów. Całość przedstawionych badań została przeprowadzona za pomocą spektrum dostępnego oprogramowania i platform obliczeniowych.

### 4.4. Omówienie poszczególnych prac składających się na cykl

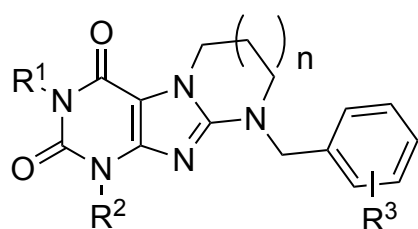
#### 4.4.1. Receptory adenozynowe (AARs)

Adenozyna jest ważnym regulatorem homeostazy mózgu, serca, nerek i innych narządów. Fizjologicznie z czterema różnymi podtypy receptorów adenozynowych: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> i A<sub>3</sub>. Selektywna interakcja z podtypami receptorów adenozyny (AR) daje bardzo szerokie możliwości terapeutyczne, obejmujące zaburzenia OUN, regulację właściwości elektrofizjologicznych serca, choroby układu odpornościowego i zapalne, wzrost komórek, astmę, niewydolność nerek i urazy niedokrwienne [8]. A<sub>1</sub>AR i A<sub>3</sub>AR są sprzężone z białkami G<sub>i</sub>, co skutkuje zahamowaniem cykazy adenylanowej (i spadkiem stężenia komórkowego cAMP), natomiast A<sub>2A</sub>- i A<sub>2B</sub>AR stymulują enzym poprzez sprzężenie z białkami G<sub>s</sub>. Niemniej jednak w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych mogą brać udział także inne szlaki drugiego posłańca. Zarówno powszechne rozmieszczenie AAR, jak również różne odpowiedzi komórkowe mediowane przez modulację AR, a w szczególności ich role w chorobach, czynią je potencjalnymi celami biologicznymi dla terapeutycznego zastosowania (nie)selektywnych ligandów dla różnych podtypów. Ligandy receptorów adenozyny są obecnie opracowywane jako obiecujące środki w zaburzeniach OUN (choroba Parkinsona, Alzheimera, epilepsja, niedokrwienie) [9]. Jak dotychczas udało się rozwiązać struktury krystaliczne dla dwóch z czterech podtypów receptorów adenozynowych: A<sub>1</sub>AR i A<sub>2A</sub>AR. Ponadto, A<sub>2A</sub>AR został współkryształizowany z kilkoma ligandami, zarówno agonistami, jak i antagonistami i służy jako modelowy AR z dobrze zdefiniowanym ortosterycznym regionem wiązania liganda.

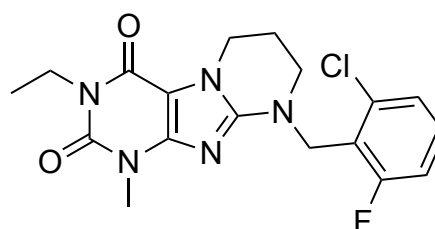
**Publikacja [H1]**

**Kamil J. Kuder** \*§; Michał Załuski \*; Jakub Schabikowski; Gniewomir Latacz; Agnieszka Olejarz-Maciej; Piotr Jaśko; Agata Doroz-Płonka; Andreas Brockmann; Christa E. Müller; Katarzyna Kieć-Kononowicz. Novel, Dual Target-Directed Annelated Xanthine Derivatives Acting on Adenosine Receptors and Monoamine Oxidase B. *ChemMedChem*, 2020: Vol. 15, nr 9, s. 772-786;

W niniejszej publikacji opisano pochodne pirymido- i diazepino[2,1-*f*]purinedionu jako ligandów o podwójnym celu, łączących aktywność antagonistyczną receptora adenosynowego A<sub>2A</sub> z blokadą monoaminooksydazy B (MAO-B), o schemacie ogólnym przedstawionym na Rysunek 1.



R<sup>1</sup> - alkil, allil  
 R<sup>2</sup> - alkil  
 R<sup>3</sup> - mono- i di- halogen / OH  
 n = 1, 2



**13e**  
 hA<sub>2A</sub> K<sub>i</sub> = 264 nM  
 hMAO-B IC<sub>50</sub> = 242.67 nM

*Rysunek 1.* Ogólna struktura ligandów otrzymanych w ramach publikacji [H1] (lewy panel) i struktura najaktywniejszego związku - 13e (prawy panel).

Na podstawie badań opublikowanych przez Załuskiego i wsp. [10, 11] zaprojektowana została nowa seria ligandów oparta na szkielecie 1,3-dimetyloksantyny z anelowanym pierścieniem pirymidyny lub diazepiny połączonym z wiązaniem *f*, oraz z zastosowaniem różnych podstawników alkilowych w pozycjach N1- i N3 oraz podstawionych cząsteczek benzyłowych w pozycji N9 (N10 dla pochodnych diazepiny). Celem zaproponowanych modyfikacji strukturalnych było sprawdzenie ich wpływu na aktywność i selektywność dla badanych celów. Zaprojektowane ligandy zostały otrzymane na drodze siedmio- (pochodne pirymidyny) lub trzyetapowej (pochodne diazepiny) syntezy, a ich struktury zostały potwierdzone analizami NMR i MS. Wszystkie z 20 otrzymanych struktur zostały poddane testom biologicznym na powinowactwo w kierunku do wszystkich podtypów receptorów adenosynowych (badania wykonane w ramach współpracy z Uniwersytetem w Bonn, w grupie Prof. Christy E. Müller) i w kierunku inhibicji MAO-B i dla wybranych struktur MAO-A.

Żaden z badanych związków nie wykazywał powinowactwa do podtypów  $A_1$ ,  $A_{2B}$  ani  $A_3$  w najwyższym badanym stężeniu, ani też w kierunku MAO-A. Analiza zależności struktura-aktywność pozwoliła na obserwację, że wprowadzenie annelowanego pierścienia diazepamu powoduje utratę aktywność w kierunku badanych celów biologicznych. Spośród różnych podstawionych grup aromatycznych przy N9 lub N10 jedynie cząsteczki 2-bromobenzylowe (**15a**) i 2-chloro-6-fluorobenzylowe (**13e**, **14b**, **15b**, **16b**) okazały się pozytywnie wpływać na powinowactwo do  $A_{2A}AR$  przy porównywalnych stężeniach, nie miały jednak znaczącego wpływu na inhibicję MAO-B. Zwracając uwagę na podstawniki w pozycjach N1- i N3, zaobserwowano, że wydłużenie podstawnika N3-metylowego związku do etylowego, lub propylowego powodowało nieznaczne zmniejszenie powinowactwa w kierunku  $A_{2A}AR$ , względem struktury odniesienia o podstawniku metylowym np. **13e** vs. **14b** ( $hA_{2A}AR K_i = 264$  nM vs. 504 nM). Niestety, w przypadku MAO-B wydłużenie podstawnika N3 o jedną grupę metylenową (**13e**) spowodowało zwiększenie siły hamowania, w porównaniu z N1,N3-dimetylowym analogiem **3b** (MAO-B  $IC_{50} = 243$  nM i 570 nM, odpowiednio). Dalsze wydłużenie podstawnika N3 do propylu powodowało spadek aktywności inhibicyjnej. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku usztywnienia podstawnika propylowego do propargylowego – w przypadku  $A_{2A}AR$  dało to najsilniejszy ligand z tej grupy, **15b** ( $A_{2A}AR K_i = 207$  nM), jednocześnie skutkując zmniejszeniem aktywności hamującej MAO-B.

Dodatkowo dla najbardziej obiecującej struktury **13e** (9-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-3-etylo-1-metylo-6,7,8,9-tetrahydropiryrido[2,1-f]puryno-2,4(1H,3H)-dion;  $hA_{2A}AR K_i = 264$  nM,  $hMAO-B IC_{50} = 243$  nM) i **16b** (9-(2-bromo)-3-etylo-1-etylo-6,7,8,9-tetrahydropiryrido[2,1-f]puryno-2,4(1H,3H)-dion;  $hA_{2A}AR K_i = 238$  nM,  $hMAO-B IC_{50} = 1460$  nM) wykonano wstępne badania w kierunku potencjalnych interakcji typu lek-lek (*ang. drug-drug interaction DDI*), jednak w stężeniu 10  $\mu$ M oba ligandy hamowały aktywność izoform cytochromu P450: CYP3A4, 2D6 i 2C9, a które są najważniejsze w metabolizmie leków. Dodatkowo związki te wykazały również wysokie powinowactwo do Pgp, co może skutkować zmniejszonym wchłanianiem jelitowym i przenikaniem przez barierę krew-mózg. Ponadto związki te okazały się średnio-stabilne metabolicznie (**13e** – znaleziono 5 metabolitów, 41,8% pozostających w mieszaninie reakcyjnej; **16a** - 3 metabolity, 74,8% pozostających w mieszaninie reakcyjnej) i wykazały niski potencjał hepatotoksycznym (badania na komórkach hepatoma HepG2).

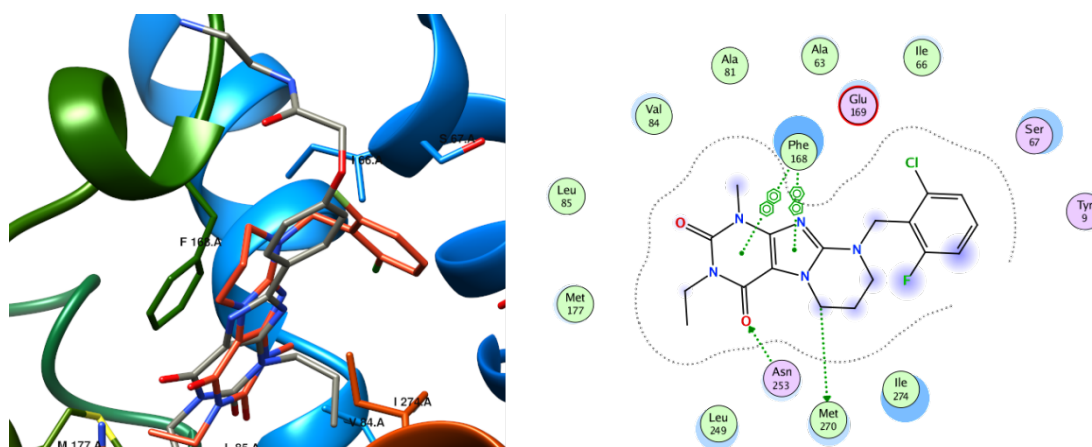
W części obliczeniowej, stanowiącej mój główny wkład w niniejszą pracę, otrzymana biblioteka ligandów została zadokowana do sztywnych struktur krystalicznych przewidywanych celów biologicznych:  $A_1AR$  (PDB ID: 5N2S),  $A_{2A}AR$  (PDB ID: 3REY),



MAO-B (PDB ID: 2V5Z), MAO-A (PDB ID: 2Z5X). Spośród szeregu dostępnych struktur dla A<sub>2A</sub>AR i MAO podczas wyboru kierowałem się ich stanem aktywności, rozdzielczością i strukturą związanych w kompleksie ligandów.

Dla wszystkich dokowanych ligandów, w przypadku A<sub>1</sub>AR nie udało mi się znaleźć prawidłowych pól dla zastosowanego protokołu dokowania. Może to być spowodowane obliczonym trybem, w którym wiązanie wodorowe z kluczową<sup>1</sup> N254<sup>6,55</sup> poprzez grupę karbonylową przy C2 wymuszało przesunięcie umiejscowienia liganda w kierunku TM2 (*ang. transmembrane domain*; domena transmembranowa) w wąskiej kieszeni utworzonej przez F171(EL2, *ang. extracellular loop*, pętla zewnątrzkomórkowa) i L250<sup>6,51</sup>.

W przypadku A<sub>2A</sub>AR wszystkie ligandy wykazały podobne wzorce interakcji, tworząc kluczowe wiązanie wodorowe z N253<sup>6,55</sup> poprzez grupę karbonylową w pozycji C4 purynedionu. Annelowane pierścienie heterocykliczne, niezależnie od rozmiaru, znajdowały się w wąskiej kieszeni utworzonej przez F168<sup>45,52</sup> i E169 (EL2) z jednej strony oraz przez aminokwasy TM7: M270<sup>7,35</sup> i I274<sup>7,39</sup> z drugiej, stabilizowane odpowiednio poprzez wiązania typu  $\pi$ -stacking i oddziaływania hydrofobowe z oboma tymi aminokwasami. Podstawniki N3-alkilowe zajmowały małą hydrofobową podkiesznię utworzoną przez L249<sup>6,51</sup> i M177<sup>5,38</sup> po bokach i zamkniętą od dołu przez H250<sup>6,52</sup>. Nie udało się natomiast znaleźć znacznych różnic w oddziaływaniach pomiędzy różnie podstawionymi ugrupowaniami benzyłowymi a resztami bocznymi aminokwasów podkieszni utworzonej pomiędzy TM2, TM7 i TM1, a w którą kierowały się wspomniane ugrupowania, stabilizowane przez oddziaływania hydrofobowe (Rysunek 2).



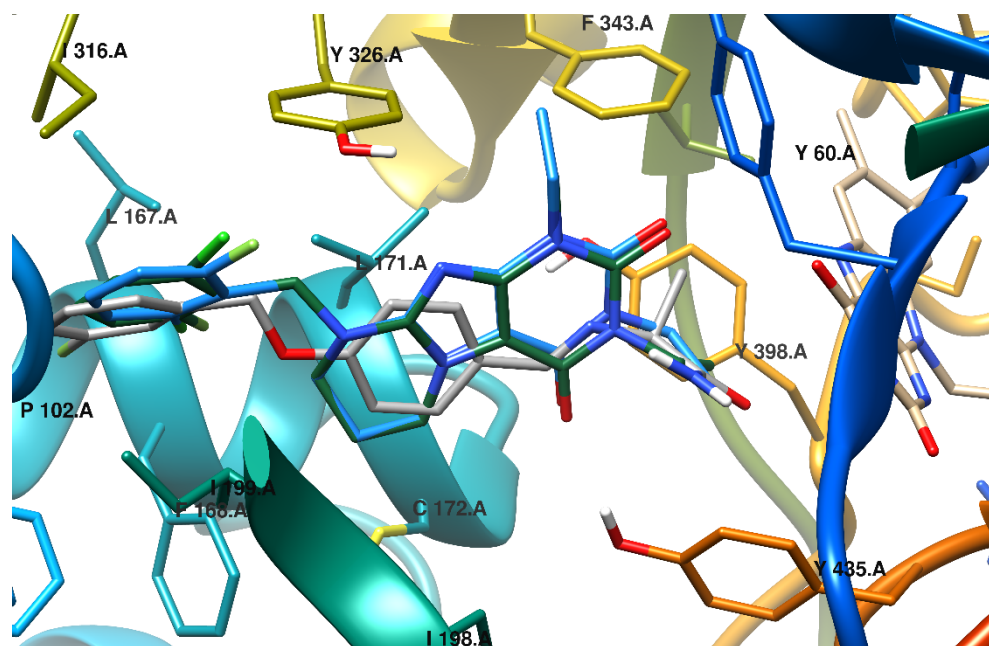
Rysunek 2. Obliczony tryb wiązania dla liganda 13e (pomarańczowy) i współkrystalizowanego z białkiem liganda XAC (ciemnoszary) w ortosterycznej kieszeni A<sub>2A</sub>AR (3REY), z odpowiadającym mu diagramem interakcji ligand-receptor (odpowiednio lewy i prawy panel). Fragment EL3 i częściowo TM7 zostały usunięte dla większej przejrzystości obrazu.

<sup>1</sup> liczby w indeksie górnym oznaczają numerację wg. Ballesteros-Weinsteina [62]

W następnej kolejności, oceniłem stabilność obliczonych kompleksów za pomocą krótkich, 600 ps symulacji dynamiki molekularnej. Kompleksy okazały się stabilne przez całą symulację, zachowując kluczowe oddziaływania, a także energię potencjalną ( $U$ ) układu atomowego na stałym poziomie  $\sim 1000$  kcal/mol. Jedynie w przypadku ligandów nieaktywnych (np. **13d** i **20a**), w trakcie nawet krótkiej symulacji następowało albo całkowite rozerwanie kluczowego wiązania wodorowego, albo utworzenie w jego miejsce wiązania wodorowego z ugrupowaniem karbonylowym w pozycji C2, co skutkowało przesunięciem rdzenia purynodionu w kierunku TM2. Powyżej opisane wyniki są pierwszym przypadkiem wykorzystania symulacji dynamiki molekularnej w moich badaniach.

Z drugiej strony, dokowanie do sztywnej formy struktury krystalicznej MAO-A nie dało prawidłowych pól dokowania dla żadnego z ligandów – udało się uzyskać pozy tylko dla 5 ligandów, jednak o niedopuszczalnej orientacji w miejscu aktywnym MAO-A, co skutkowało licznymi zawadami sterycznymi i brakiem interakcji, tym samym racjonalizując brak powinowactwa ligandów w testach biologicznych.

W wyniku dokowania do sztywnej formy MAO-B, natomiast, udało mi się przypuszczalnie opisać interakcje dla badanego zestawu: ligandy kierowały się podstawionym fragmentem aromatycznym w stronę wnęki wejściowej, natomiast rdzeń purynodionu mieścił się pomiędzy klatką utworzoną przez Y435 i Q206 z jednej strony oraz Y398 i L171 z drugiej, co jest zgodne z naszymi wcześniejszymi ustaleniami [11]. Z drugiej strony, podstawniki przy N1



Rysunek 3. Potencjalne tryby wiązania związków **13e** (ciemnozielony) i **16b** (niebieski) oraz współkrystalizowanego SAF (szary) w miejscu aktywnym MAO-B. Reszty 200-208 zostały usunięte dla jasności obrazu.



annelowanego rdzenia purynodionu skierowane były w stronę F343, a sam rdzeń był stabilizowany przez  $\pi$ - $\pi$  stacking z Y326, mającym odgrywać istotną rolę w wiązaniu inhibitora MAO-B. Ponadto zaobserwowano dodatkową stabilizację poprzez wiązania halogenowe pomiędzy chlorem a grupą hydroksylową Y326. Co więcej, obliczone tryby wiązania pozwoliły na wyjaśnienie różnic w powinowactwie dla niektórych homologów strukturalnych, np.: aktywnego **13e** i nieaktywnego **16b**. Zaobserwowałem, że podstawnik etylowy w pozycji N1 może wywoływać przeszkodę steryczną z Y326 i/lub F343 (Rysunek 3). Taka przeszkoda może być również powodem braku aktywności analogów azepanu, w których protonowany azot kolidował z łańcuchem bocznym L171 i wymuszał przeciwną orientację tej podgrupy pochodnych w kieszeni enzymatycznej, skutkując utratą kluczowych oddziaływań. W przypadku MAO-B sprawdziłem również ewentualny wpływ zmian konformacyjnych łańcucha bocznego i/lub szkieletu po związaniu liganda w miejscu aktywnym wykorzystując protokół indukowanego dopasowania (*ang. induced fit*). Niewielkie zmiany konformacyjne powodowały pojawienie się dodatkowego oddziaływania białko-ligand, poprzez utworzenie wiązania wodorowego pomiędzy wodorem grupy hydroksylowej Y435 a tlenem karbonylowym N6, dla najbardziej aktywnych ligandów. Pochodne zawierające w swojej strukturze annelowany pierścień diazepam, ze względu na jego wielkość były bądź przesunięte w kierunku wejścia do miejsca aktywnego, a więc odsunięte od klatki aromatycznej i jej możliwych oddziaływań, albo ustawione w sposób odwrotny (podstawniki benzytowe skierowane w kierunku kofaktora FAD).

Podsumowując, badania opisane w publikacji [H1] pozwoliły na identyfikację nowego, podwójnego liganda A<sub>2A</sub>AR i MAO-B (**13e**), a analiza zależności struktura-aktywność została uzupełniona i częściowo wytłumaczona badaniami dokowania molekularnego w oparciu o wcześniej opublikowane struktury rentgenowskie białek docelowych.

## Publikacja [H2]

**Kamil J. Kuder** §; Ilona Michalik; Katarzyna Kieć-Kononowicz; Peter Kolb. A Taxicab geometry quantification system to evaluate the performance of in silico methods : a case study on adenosine receptors ligands. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2020: Vol. 34,

Pomimo, że wszystkie z aktywnych ligandów opisanych w publikacji [H1] wykazywały znaczną selektywność w kierunku receptora A<sub>2A</sub>AR, ze względu na wysoką homologię pomiędzy poszczególnymi białkami z tej podrodziny problem nieselektywności, a w związku z tym możliwych działań niepożądanych jest dosyć często spotykany. W rzeczywistości

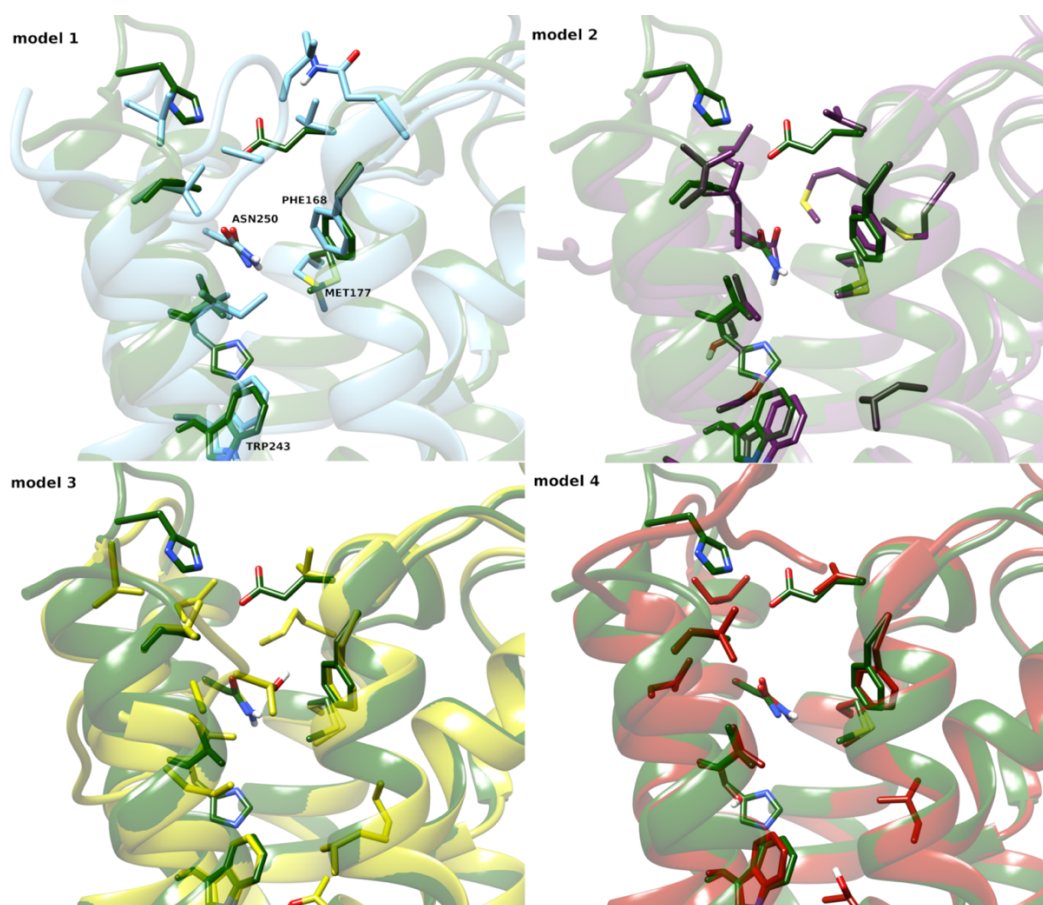
przewidywanie selektywności ligandów do podtypów określonych receptorów za pomocą metod *in silico* nadal pozostaje wyzwaniem dla osób modelujących [12]. Dlatego też znalezienie liganda, który jest rozpoznawany przez tylko jedną kieszeń wiążącą, a odrzucany przez wszystkie pozostałe podtypy, w dużej mierze zależy od jakości struktur i modeli białkowych użytych do badań, a także procedury dokowania i analizy danych.

Aby zmierzyć się z tym problemem, we współpracy z Uniwersytetem Philipsa w Regensburgu, w ramach projektu: „*In Silico* screening to determine the subtype selectivity of Adenosine receptor ligands”, w roku 2015 przeprowadziłem badania obliczeniowe, których wyniki zawarłem w publikacji [H2]. Powyższy projekt wykonywałem w ramach *short-term scientific mission* akcji COST: CM1207 (ECOST-STSM-CM1207-020215-054712; 2-27.02.2015).

Moje badania były kontynuacją pracy dotyczącej oceny przydatności modeli homologicznych receptora adenozynowego A<sub>1</sub>AR, do których zadokowano bibliotekę związków uzyskawszy szereg silnych i kilka selektywnych ligandów w kierunku zamierzonego celu. Jednak w badaniach weryfikacji eksperymentalnej *in vitro* okazało się, że wiele ligandów wiąże się również z podtypami A<sub>2A</sub>AR i A<sub>3</sub>AR. Dlatego celem mojej pracy było zbudowanie modelu homologicznego A<sub>3</sub>AR i dokowanie wszystkich dotychczas stosowanych ligandów do wszystkich trzech podtypów receptora. W ten sposób chciałem zbadać, czy eksperymentalnie, uzyskane profile wiązania [13] mogą być odtworzone *in silico*, jak również zobaczyć jak, zamiast patrzeć na pojedyncze struktury, przewiduje się zestaw związków w ramach danej kampanii skringowej. Pomimo że w czasie wykonywania badań struktury krystaliczne dla A<sub>1</sub>AR zostały już opublikowane [14, 15], dla zachowania spójności z poprzednimi badaniami, użyłem serii modeli homologicznych. Ponadto, postanowiłem sprawdzić, czy możliwe będzie skonstruowanie niezawodnego systemu kwantyfikacji korelacji *in silico* / *in vitro*.

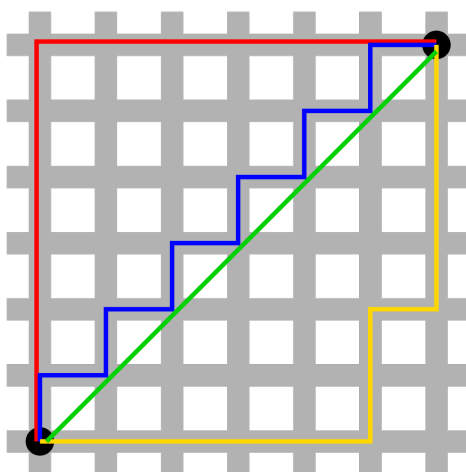
Model homologiczny receptora A<sub>3</sub>AR opracowany został w oparciu o strukturę receptora adenozynowego A<sub>2A</sub>AR (PDB ID: 3EML). Spośród pierwotnie wygenerowanych modeli, po uprzedniej inspekcji orientacji kluczowego dla wiązania ligandów łańcucha bocznego N250<sup>6.55</sup> i innych aminokwasów kieszeni wiążącej wraz z ich możliwymi rotamerami (izomerami konformacyjnymi; dobór wg. biblioteki Dunbracka [16]), w pierwszej kolejności wybrałem model o najwyższej wartości AUC (*ang. area under curve*) uzyskanej z dokowania ligandów aktywnych/nieaktywnych oraz na podstawie wizualnej oceny ich oddziaływań w miejscu wiążącym (dwa wiązania wodorowe z kluczową resztą N250<sup>6.55</sup>,  $\pi$ - $\pi$  stacking pomiędzy ich pierścieniami (hetero)aromatycznymi a F168<sup>45.52</sup>). Pomimo wysokiej wartości wzbogacenia i akceptowalnych sposobów wiązania "aktywnego" zestawu ligandów,

zaobserwowałem możliwe kolizje steryczne pomiędzy ligandami a aminokwasami, a także zwężenie dolnej części kieszeni wiążącej, która mogła prowadzić do fałszywych wyników. Dlatego też do białka szablonowego, w miejsce wykrystalizowanego ligandu ZM241385, nieaktywnego dla  $A_3AR$ , ale współkrystalizowanego w strukturze 3EML, manualnie zadokowałem wysoce selektywny i aktywny w kierunku  $A_3AR$  ( $K_i = 40$  nM) ligand ZINC12533962 i na szablonie tak przygotowanego białka po kilkukrotnej korekcji liganda odniesienia w białku szablonowym udało się uzyskać strukturę charakteryzującą się obecnością 97,2% reszt w regionie faworyzowanym według wykresu Ramachandrana [40], korzystnym ułożeniem zadokowanych ligandów, jak i wysoką wartością współczynnika  $AUC = 0.844$ . W rzeczywistości, pod względem wydajności, ostateczny model  $A_3AR$  dał średni wskaźnik prawdziwie pozytywny na poziomie 27 poprawnych dopasowań *in silico* / *in vitro*, na 39 zadokowanych struktur. Podobną tendencję zaobserwowano dla wszystkich czterech użytych modeli adenozyiny  $A_1AR$ , w przeciwieństwie do, co ciekawe, nieco niższego wyniku uzyskanego przy użyciu struktury krystalicznej receptora adenozyiny  $A_{2A}AR$ . Kolejne etapy modelowania zamierzonego receptora zostały przedstawione na Rysunek 4.



**Rysunek 4.** Cztery uzyskane modele homologiczne  $A_3AR$  (1-4). Reszty kieszeni wiążącej zostały przedstawione jako pogrubione pręty (oznaczone tylko w panelu modelu 1). Kolorem ciemnozielonym przedstawiono strukturę krystaliczną wzorca,  $A_{2A}AR$  (3EML).

Do kwantyfikacji korelacji *in silico/in vitro*, a dosłownie do sprawdzenia jak daleko od siebie znajdują się wyniki tych badań, wykorzystałem podejście obejmujące tzw. metrykę miejską (ang. *Taxicab Geometry, Manhattan distance, City Block Distance, CBD*) [17] oraz system sygnalizacji świetlnej. Zamiast zwykłej odległości w geometrii euklidesowej, geometria Taxicab definiuje nową metrykę, w której odległość między dwoma punktami jest sumą różnic bezwzględnych ich współrzędnych kartezjańskich (Rysunek 5).



**Rysunek 5.** Przykład metryki miejskiej. Odległość pomiędzy czarnymi punktami (zielona linia) w rzeczywistości odpowiada ilościom przebytych przecznicy (kwadratów). Trasy żółta, niebieska i zielona mają więc taki sam dystans.

Wśród wielu zastosowań w życiu codziennym, systemy CBD mogą być również wykorzystywane do oceny różnic w dyskretnych rozkładach częstotliwości. W naszym badaniu zamiast współrzędnych kartezjańskich do obliczeń wykorzystałem wartości *in vitro* ( $v = K_i$ ) i *in silico* ( $s =$  wartość docking/rescore score). W celu ich uporządkowania, w pierwszej kolejności sklasyfikowałem je empirycznie według następującego klucza:

- dla wartości *in vitro*: zielony dla wartości  $K_i$  w zakresie poniżej 1000 nM, żółty dla wartości  $K_i$  wyższych niż 1000 nM, ale wciąż na mierzalnym poziomie, czerwony wyraża brak wykrywalnego wiązania (aby uniknąć klasyfikowania np. dwóch związków o powinowactwie 999 nM i 1001 nM, odpowiednio, jako "aktywnych" i "nieaktywnych", wprowadziliśmy kategorię "bufor" w kolorze żółtym),
- dla wartości *in silico*: kolor zielony wyrażał pierwsze 20% uzyskanego zakresu wyników dokowania, kolor żółty kolejne 20% uzyskanego zakresu wyników dokowania, kolor czerwony pozostałe 60% zakresu wyników dokowania (wstępny podział, CR1; ang. *CBD run*),

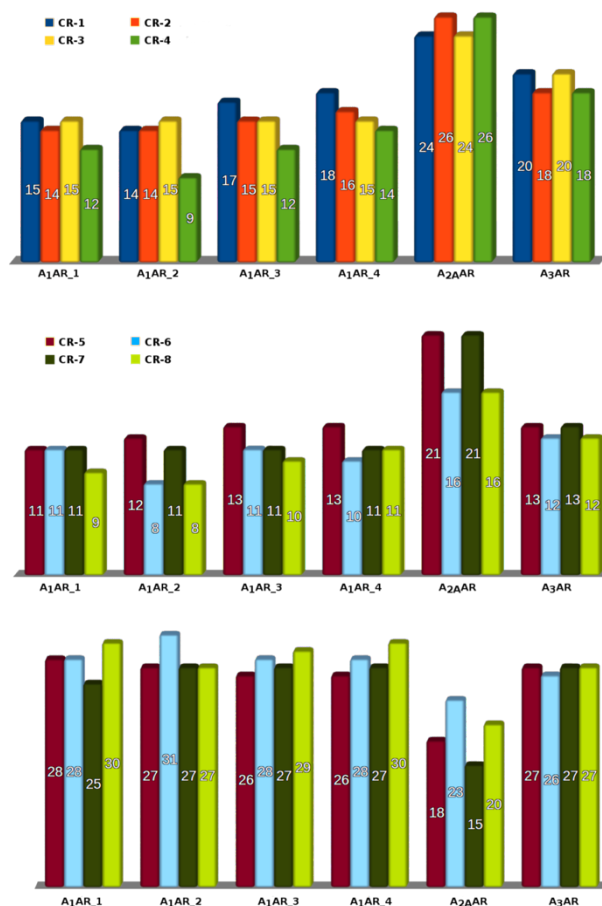
natomiast wartości CBD (0-2) zostały przypisane do każdego koloru w sposób: 0 dla koloru czerwonego, 1 dla żółtego i 2 dla zielonego. Podział dla danych *in vitro* pozostał niezmienny

do dalszego opracowywania danych. W toku dalszych badań, ze względu na możliwą tendencyjność wyników dokowania względem liganda wchodzącego w skład kompleksu, zastosowałem funkcję reskorującą DSX-Online, co pozwoliło na dostrojenie schematu kolorów: zielony  $< -100$ ,  $-100 < \text{żółty} < -90$ , czerwony  $> -90$  (CR-2). W kolejnym etapie, w celu uzyskania rzetelnego porównania dla procedury dokowania do wszystkich modeli homologicznych A<sub>1</sub>AR zastosowanych w badaniu, zadokowany został w miejsce ZM241385 ligand referencyjny użyty do modelowania. Przy tym samym podziale danych obliczyłem kolejno wartości CR-3 i analogicznie reskorowane CR-4. Ostatecznie, aby wyeliminować potencjalne efekty brzegowe wynikające z podziału danych *in vivo* / *in vitro*, zmieniłem wartości na rozkład binarny (CR-5 - CR-8 odpowiednio dla każdego poprzedniego przebiegu), CBD = 1 dla poprzednich zielonych i żółtych, 0 dla czerwonych. Ponadto w celu określenia względnej wartości CBD ( $\text{CBD}_{\text{rel}} = \text{CBD} / \text{CBD}_{\text{max}}$ ) obliczyłem maksymalne możliwe wartości CBD ( $\text{CBD}_{\text{max}}$ ) dla każdego rozkładu, tym samym  $\text{CBD}_{\text{rel}}$  o wartości mniejszej niż 1 wskazuje na lepszą niż losowa wydajność.

Analiza otrzymanych wartości dla poszczególnych przebiegów CBD (CR-1 - CR-8) pozwoliła na zaobserwowanie zarówno pozytywnego wpływu zmiany liganda referencyjnego (CR-1 CBD = 61,  $\text{śr.} = 1,56$  vs. CR-3 CBD = 56,  $\text{śr.} = 1,44$ ). Dodatkowo produktywność modeli wzrastała po zastosowaniu rescoringu (CR-2 CBD = 60,  $\text{śr.} = 1,53$ ; vs. CR-4 CBD = 58,  $\text{śr.} = 1,49$ ). Zmieniając natomiast podział danych obliczeniowych na układ binarny (CR-5 - CR-8) udało się uzyskać wartości CDB równe 46 dla dokowania (CR-5), oraz 37 dla procedur rescoringowych (CR-8). Tę samą tendencję zaobserwowałem przy obliczaniu wartości CBD dla poszczególnych celów oraz względnych wartości CBD. Przy wartości  $\text{CBD}_{\text{max}}$  wynoszącej 172 dla rozkładów "0-1-2" i 117 dla rozkładów binarnych przy danych *in vitro*, wartości  $\text{CBD}_{\text{rel}}$  zmniejszyły się z 0,36 (CR-1) do 0,32 (CR-8), dowodząc skuteczności przeprowadzonych obliczeń. Co więcej, stosując partycjonowanie danych *a priori*, wychodząc od średniego błędu 1,56 przecznicy na związek (*ang. blocks per compound, bpc*), udało mi się poprawić metodę rankingu CBD do średniego błędu = 1,49 bpc. Binaryzacja podziału danych pozwoliła na jeszcze większe zmniejszenie dystansu, z błędu średniego = 1.18 bpc do 0.95 bpc.

Użyteczność i uniwersalność opisanej metody opartej na CBD oceniłem również przy użyciu zestawu 88 związków referencyjnych o silnej selektywności, opisanych przez Katritch [37]. Choć uzyskane wyniki CBD w tych seriach walidacyjnych (VR) były wyższe niż dla zestawu testowego, to jednak nadal wykazywały korelację z wynikami CR. Począwszy od VR-1, CBD dało wynik  $\text{śr.} = 2.76$  (w porównaniu do 1.56 dla zestawu testowego), metoda pozwoliła

na otrzymanie VR-8 CBD  $\bar{x}$  = 1.17, przy silnej korelacji o wartości R równej 0,96 ( $R^2=0,92$ ) pomiędzy przebiegami CR i VR. Zaobserwowałem również tendencję analogiczną do zbioru testowego - malejące wartości  $CBD_{rel}$  dla każdego przebiegu. Przy wartości  $CBD_{max}$  wynoszącej 476 dla rozkładów "0-1-2" i 264 dla rozkładów binarnych przy danych *in vitro*, wartości  $CBD_{rel}$  zmniejszyły się z 0,51 (VR-1) do 0,39 (VR-8). Zestawienie poszczególnych wartości CR przedstawia Rysunek 6.



**Rysunek 6.** Górny panel: rozkład wartości CBD obliczonych w trybie 0-1-2 dla każdego użytego receptora; Środkowy panel: rozkład wartości CBD obliczonych w trybie binarnym dla każdego receptora; Dolny panel: współczynnik trafień *in vitro/in silico* dla wszystkich 6 użytych białek (cztery modele A1AR i po jednym dla A2AR i A3AR). Każda kolumna przedstawia jeden przebieg.

Jednakże, zbiór walidacyjny wykazywał powinowactwo do celów biologicznych na znacznie wyższym poziomie niż zbiór testowy. W tym celu czułość metody została zwiększona, poprzez wymianę systemu podziału danych *in vitro* (ang. *Second Validation Run*; SVR). Przy czułości ustawionej na  $K_i < 100$  nM dla zielonych i żółtych dla  $100$  nM  $< K_i < 1000$  nM, uzyskane wartości CBD  $\bar{x}$  okazały się nieznacznie wyższe niż wartości VR (korelacja wartości CBD dla CR/SVR  $R=0,88$ ,  $R^2 = 0,77$ ). Jednak trend malejących wartości  $CBD_{rel}$  został zachowany i utrzymywał się na poziomie  $\sim 0,4$ .



Pomimo nienadzwyczajnej selektywności związków w wybranym zbiorze, podyktowanym zachowaniem spójności z poprzednimi badaniami (te same białka i zestaw ligandów zapewniający powtarzalność obliczeń) udało się wypracować rzetelny system teoretycznej oceny selektywności. Co więcej, używając tych samych danych chcieliśmy sprawdzić jak przewidywany jest cały zestaw - w ramach kampanii skринingowych w świecie rzeczywistym, można nie mieć walidowanego zestawu ligandów o wysokim powinowactwie.

Podsumowując, w powyższej publikacji udało mi się uzyskać wiarygodny, w tym sensie, że jest w stanie rozpoznać aktywne ligandy z dużą pewnością (AUC = 0.844) model A<sub>3</sub>AR. Co więcej w toku dokowania udało się poprawnie przewidzieć 27 z 39 ligandów użytych w badaniu. Biorąc pod uwagę dużą elastyczność GPCR oraz fakt, że tylko jedna z wielu możliwych konformacji receptora została wykorzystana do uzyskania stosunkowo dobrego współczynnika trafień, dodatkowo można stwierdzić wysoką jakość uzyskanego modelu.

Po drugie, zastosowana metoda rankingu oparta na metryce miejskiej okazała się być użyteczną metryką do oceny wydajności metod *in silico*. Chodziło o to, by oszacować i zobrazować, jak dalekie od "dokładnych" będą wyniki badań przesiewowych. Model ten został również z powodzeniem wykorzystany dla ligandów receptorów muskarynowych, utrzymując wartości CBD<sub>rel</sub> na poziomie <0.2 dla dystrybucji binarnej (badania przeprowadzone pod moją opieką przez uczestnika SKN, wyniki nieopublikowane).

#### 4.4.2. Receptor sierocy GPR18

Znaczny rozwój biologii molekularnej i nauk komputerowych pozwolił w ostatnich latach na odwrócenie tendencji do identyfikacji receptorów w oparciu o ich endogenne ligandy. Obecnie struktury pierwszorzędowe GPCRs są określane za pomocą technik sekwencjonowania DNA, co z kolei przyczyniło się do zachwiania równowagi pomiędzy liczbą zidentyfikowanych receptorów a ich naturalnymi ligandami. Stąd też wziął się termin tzw. receptorów sierocych (*ang. orphan GPCR, oGPCR*) – zwyczajowo nazywanych GPR z unikalnym numerem, który wskazuje na konkretne białko. Receptory sieroce to białka, które wiążą i są aktywowane przez nieznane dotąd cząsteczki sygnalizacyjne (ligandy, neurotransmitery lub hormony). Posiadają one jednak wspólne elementy strukturalne ze zidentyfikowanymi receptorami, których cząsteczki sygnalizacyjne są już znane. Mimo znacznego postępu technologicznego i wszelkich wysiłków badaczy, nie udało się jeszcze przypisać właściwych cząsteczek dla wszystkich GPCR. W przypadku wykrycia endogennego liganda, a więc tak zwanego odsierocenia (*ang. deorphanizing*) receptora, zmienia się jego nazwę na taką, która odzwierciedla ten związek chemiczny [18]. W samej klasie A liczba oGPCRs wynosi 81 (stan na 04.11.2022).

Gen kodujący receptor GPR18, został po raz pierwszy zlokalizowany w 1997 r. na ludzkim chromosomie 13q32. Jako pierwszy, potencjalny naturalny ligand, scharakteryzowano N-arachidonyloglicynę (NAGly) [19–21] - endogenny metabolit endokannabinoidowego anandamidu (ANA, *ang. anandamide*; lub: AEA, *ang. N-arachidonoylethanolamine*). Dlatego też, GPR18 często nazywany jest również receptorem N-arachidonyloglicyny, pomimo iż oficjalnie nadal posiada status receptora sierocego [22], aczkolwiek w ostatnich latach został przypisany do podrodziny receptorów lipidowych (*GPCR, class A, Lipid receptors*, wraz z „sierocymi” GPR55 i GPR119). Pierwotnie jednak, z uwagi na fakt, że może być aktywowany za pomocą  $\Delta^9$ -THC i innych kannabinoidów, postulowany był jako trzeci receptor kannabinoidowy (CB<sub>3</sub>R), nawet pomimo niskiego stopnia podobieństwa (12% do CB<sub>1</sub>R i 7% do CB<sub>2</sub> R). Szlaki sygnałowe oraz jego dokładne znaczenie biologiczne nadal nie zostały w pełni wyjaśnione. Z dotychczasowych badań wynika jednak, że GPR18 wykazuje aktywność konstytutywną [23]. Co więcej, coraz częściej wiąże się GPR18 z procesami immunologicznymi, neurodegeneracyjnymi i nowotworowymi, metabolizmem, obniżaniem ciśnienia wewnątrzgałkowego oraz fizjologią bólu [24–26]. Z drugiej strony, liczba aktywnych ligandów jest wciąż bardzo niska, dlatego też jeszcze do niedawna projektowanie nowych struktur odbywało się w oparciu o strukturę dotychczas poznanych ligandów.

### Publikacja [H3]

**Kamil J. Kuder**; Tadeusz Karcz; Maria Kaleta; Katarzyna Kieć-Kononowicz. Molecular Modeling of an Orphan GPR18 Receptor. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2019 : Vol. 16(10), 1167-1174.

Katedra Technologii i Biotechnologii UJCM we współpracy z Uniwersytetem w Bonn prowadzi od kilku lat pionierskie badania w poszukiwaniu aktywnych ligandów receptorów GPR18 (w grupach zarówno agonistów, jak i antagonistów). Celem próby wytłumaczenia możliwych zależności struktura-aktywność w oparciu o strukturę celu, w ramach pracy opublikowanej jako [H3] podjąłem się modelowania receptora GPR18 w stanie nieaktywnym. W niniejszej pracy wykorzystałem doświadczenie modelerskie, które zdobyłem podczas wykonywania badań do pracy [H2] w Uniwersytecie Philippsa w Marburgu – pozwoliło mi to na zauważanie zależności molekularnych, wykorzystanie gotowych bibliotek rotamerów jak i nowych narzędzi obliczeniowych. Jako szablon wybrałem najbliższą sekwencyjnie dostępną strukturę ludzkiego receptora purynergicznego P2Y<sub>1</sub> w kompleksie z antagonistą MRS2500 (PDB ID: 4XNW, 29% identyczności, 2,7 Å) [27]. Pomimo znanej już struktury receptora CB<sub>1</sub>

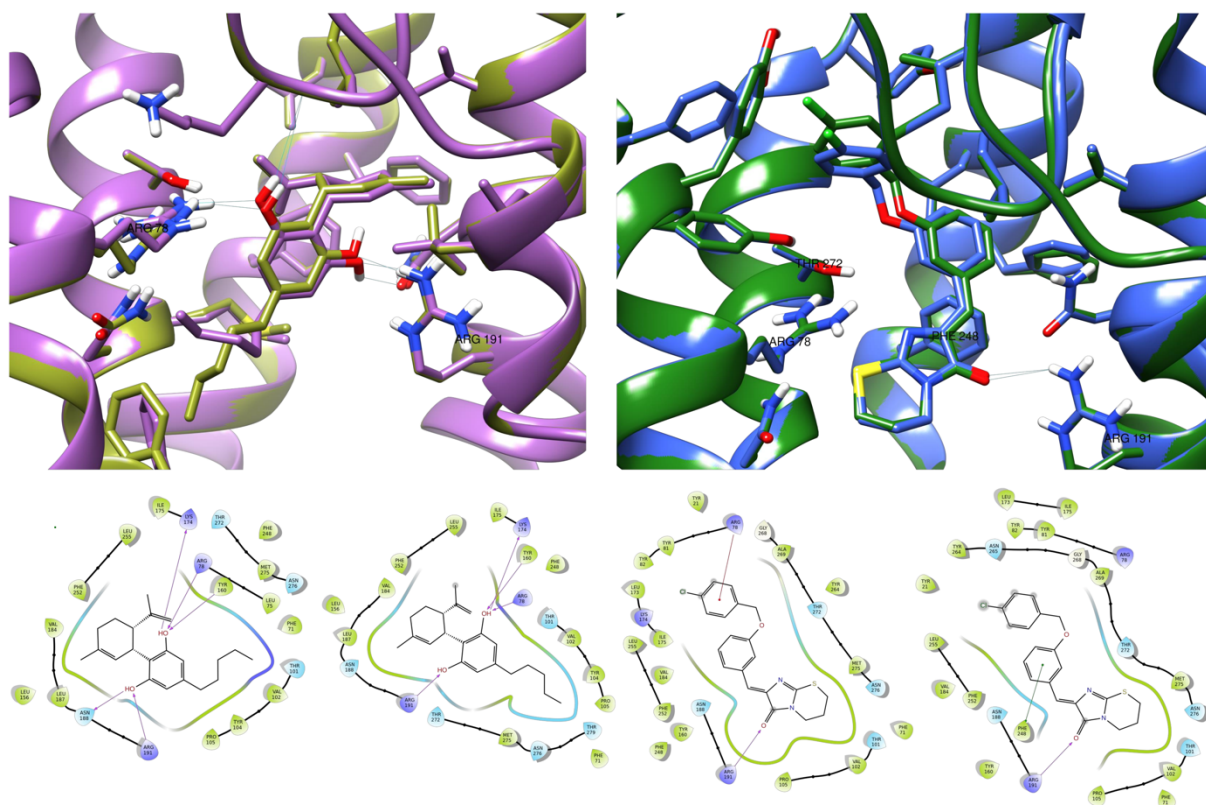


kannabinoidowego (PDB ID: 5U09), nie zdecydowałem się jej użyć ze względu na niski stopień identyczności sekwencji (12%).

Brak jasno przypisanego naturalnego liganda dla GPR18 stwarza nie tylko problem klasyfikacyjny, ale także praktyczny. Pomimo dosyć dużego stopnia zakonserwowania aminokwasów ortosterycznego miejsca wiążącego, małe zmiany w jej obrębie stanowią o unikatowości danego (pod)typu receptora. Dlatego też, w pierwszej kolejności dokonałem przeglądu dostępnej, bardzo wówczas ubogiej, literatury opisującej GPR18 pod względem strukturalnym, posiłkując się wynikami przewidzianego miejsca wiązania z serwisu GalaxySite [28]. Wyniki te potwierdziły częściowo przypuszczenia z rozprawy Schmeisser [29], sugerującej udział dwóch arginin: R78<sup>2.60</sup> i R191<sup>5.42</sup> w wiązaniu ligandów. Dodatkowymi aminokwasami (na tym etapie) zaklasyfikowanymi przeze mnie do opisanego kieszeni wiążącej GPR18 były F248<sup>6.51</sup> i F252<sup>6.55</sup>. Co więcej, arginina w pozycji 2.60 została uprzednio zaklasyfikowana jako kluczowy punkt uchwytu w GPR55, a lokalizacja przypuszczalnej, ortosterycznej kieszeni wiążącej ułożonej w górnej 1/3 wysokości białka potwierdziło mój wybór.

W celu określenia użyteczności wybranego modelu, zadokowałem dwa ligandy: częściowego agonistę/antagonistę kannabidiol i otrzymany w naszej grupie badawczej związek CB5 - pochodną imidazotiazinonu, pierwszego opisanego antagonistę GPR18, wg. protokołu wymuszonego dopasowania (*ang. induced fit*). W kompleksach CBD-GPR18 pozycja pierścienia benzenodiolowego była wymuszona przez oddziaływania grup hydroksylowych z dwiema resztami argininowymi: R78<sup>2.60</sup> i R191<sup>5.42</sup>, przy czym orientacja pozioma grupy cykloheksenylowej i ogona pentyloвого skierowana była w kierunku TM2 lub w dół kieszeni wiążącej (Rysunek 7).

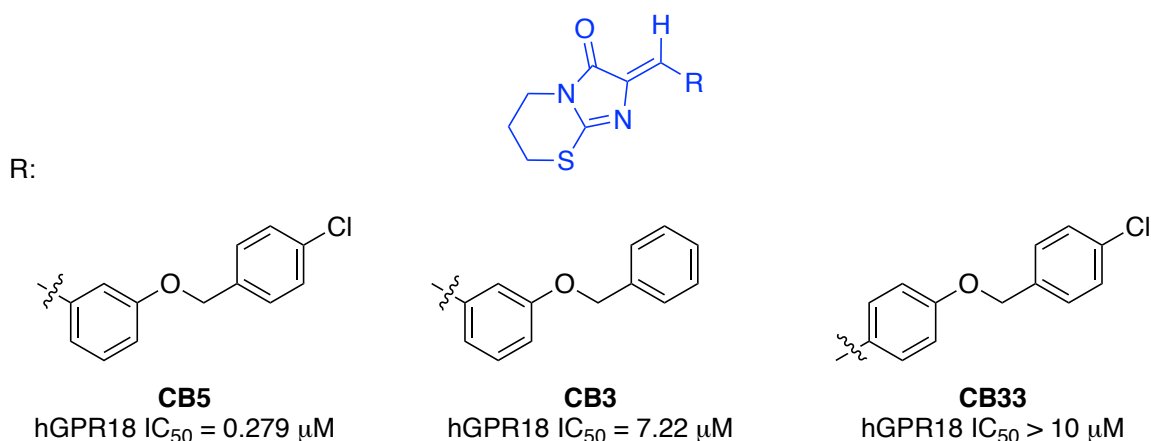
Częściowo potwierdziło to słuszność przewidzianego składu aminokwasowego kieszeni wiążącej. Dodatkowo jedna z grup hydroksylowych tworzyła wiązania wodorowe z aminokwasami pętli EL2: K174 i Y160 – oddziaływania z K174 zostały później uznane przez Naumana jako jedne z kluczowych [30]. W przypadku kompleksów CB5-GPR18 natomiast, układ imidazotiazynonu tworzył wiązanie wodorowe pomiędzy tlenem karbonylowym a wzmiankowaną R191<sup>5.42</sup>, natomiast druga z arginin, R78<sup>2.60</sup> stabilizowała dystalne ugrupowanie aromatyczne poprzez oddziaływanie kation- $\pi$ . Dodatkowa stabilizacja proksymalnego pierścienia aromatycznego CB5 przez oddziaływania  $\pi$ - $\pi$  z F248<sup>6.51</sup> została również zaobserwowana.



**Rysunek 7.** Górny panel: obliczone tryby wiązania dla kannabidiolu (lewy panel) i CB5 (prawy panel). Model 2, fioletowy; Model 3, oliwkowy; Model 4, niebieski; Model 5, zielony; niebieskie linie wskazują na wiązania wodorowe, TM3 i ECL1 zostały (częściowo) usunięte. Dolny panel: diagramy interakcji ligand-receptor.

Tak wygenerowane kompleksy po minimalizacji energii z wykorzystaniem CHARMM (interfejs online) [31] zostały wybrane do testów wzbogacenia. Ponieważ GPR18 był (i wciąż jest) stosunkowo nowym celem dla projektowania leków, a baza danych antagonistów jest wciąż stosunkowo niewielka, grupa związków aktywnych składała się z 29 ligandów. Pomimo tego, że zbiory wzbogacające były stosunkowo niewielkie pod względem liczby i znaczenia statystycznego, chodziło o sprawdzenie czy kompleksy modeli z dopasowanymi ligandami są w stanie odróżnić związki aktywne od nieaktywnych. Dla kompleksów CBD-GPR18 obliczono odpowiednio  $AUC = 0,629$  i  $0,705$  (Model 2 i 3), dla kompleksów CB5-GPR18,  $AUC =$  odpowiednio  $0,711$  i  $0,719$  (Model 4 i 5). Biorąc pod uwagę wartości AUC i wizualną inspekcję zadokowanych ligandów jako wiodący model wybrałem Model 5.

W kolejnym etapie dokonałem próby znalezienia odpowiedzi na pytanie, dlaczego podstawienie w pozycji *meta* proksymalnego pierścienia aromatycznego w wybranych ligandach jest tolerowane przez receptor, GPR18 a analogi para pozbawione są aktywności w kierunku tego celu (Rysunek 8).



*Rysunek 8. Struktury i wartości IC<sub>50</sub> wybranych ligandów CB użytych w badaniach w ramach publikacji [H3].*

Według obliczonych trybów wiązania można było stwierdzić, że dla *para*-podstawionych pochodnych, rdzeń imidazotiazynonu był obrócony o 180° w porównaniu do *meta*-pochodnych. W rezultacie prowadziło to do powstania wiązania wodorowego pomiędzy tlenem karbonylowym a R78<sup>2,60</sup> i/lub T272<sup>7,39</sup>. Nie zaobserwowano natomiast dodatkowych interakcji z drugim, hipotetycznym punktem kotwiczącym, R191<sup>5,42</sup>. Ponieważ głównym celem tych wstępnych badań dokowania było sprawdzenie różnicy pomiędzy możliwymi sposobami wiązania ligandów *meta*- i *para*-podstawionych oraz ich wpływu na aktywność, można było stwierdzić, że brak interakcji z R191<sup>5,42</sup> mógł sugerować jego kluczową rolę w wiązaniu antagonisty GPR18.

Badania zawarte w publikacji [H3] były drugimi opublikowanymi, dotyczącymi modelowania receptora GPR18 i pierwszymi, w których podjęto się próby znalezienia molekularnych determinant oddziaływań jego ligandów. Pomimo zastosowania średniozaawansowanych metod, udało się uzyskać model o akceptowalnym stopniu funkcjonalności, jak i przeprowadzić pierwszą analizę struktura-aktywność dla antagonistów GPR18 w oparciu o metody SBDD dla wówczas nikłego zestawu ligandów aktywnych.

#### Publikacja [H4]

Ilona Michalik\*, **Kamil J. Kuder** \*§; Katarzyna Kieć-Kononowicz, Jadwiga Handzlik. Structure Prediction, evaluation and Validation of GPR18 Lipid Receptor Using Free Programs. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022: Vol. 23, nr 14, id. art. 7917

Okres 2-3 lat w naukach obliczeniowych w XXI wieku to dosyć szerokie ramy czasowe. Od momentu powstania publikacji [H3] pojawiły się nie tylko nowsze, bardziej zaawansowane metody przewidywania struktur białkowych, zakres narzędzi obliczeniowych i logarytmicznie

rosnąca ilość rozwiązanych struktur krystalicznych receptorów 7-TM, lecz również nowe, aktywne ligandy. Ponadto, opisano kilka modeli homologicznych [30, 32] i opracowano wiele dokładniejszych metod przewidywania i walidacji struktur białkowych. Dotyczy to między innymi prężnie rozwijających się metod opartych na sztucznej inteligencji/uczeniu maszynowym, szeroko wykorzystywanych w ostatniej edycji eksperymentów CASP i CAMEO [33, 34] - ze szczególnym uwzględnieniem algorytmów AlphaFold2 (AF2), które do tego stopnia wyróżniły się na tle konkurencji, że w ocenach eksperymentów CASP otrzymały osobną kategorię. Jednak ostatnie doniesienia zdają się temu nie tyle przeczyć, co mocno polemizować z jakością podstawowych modeli AF2. Dlatego też w ramach publikacji [H4] podjąłem się ponownie wygenerowania modelu homologicznego receptora GPR18 w stanie nieaktywnym, spełniającego wszystkie wymagania w zakresie jakości struktury białka i rozpoznawania aktywnych ligandów w wirtualnych testach przesiewowych, przy zastosowaniu każdej ze znanych (mniej lub bardziej czasochłonnych) metod generacji białek. Dodatkowo, uwzględniłem w celach porównawczych modele wygenerowane przy użyciu algorytmu AlphaFold2 [33] aby sprawdzić, czy wygenerowane modele po wszystkich procesach optymalizacji geometrycznej i energetycznej mogą przynajmniej marginalnie się z nimi równać, zarówno w szacunkach liczbowych, jak i funkcjonalnych. W niniejszych badaniach, szeroko wykorzystałem również symulacje dynamiki molekularnej, zarówno dla form *apo* białek jak i dla kompleksów białko-ligand.

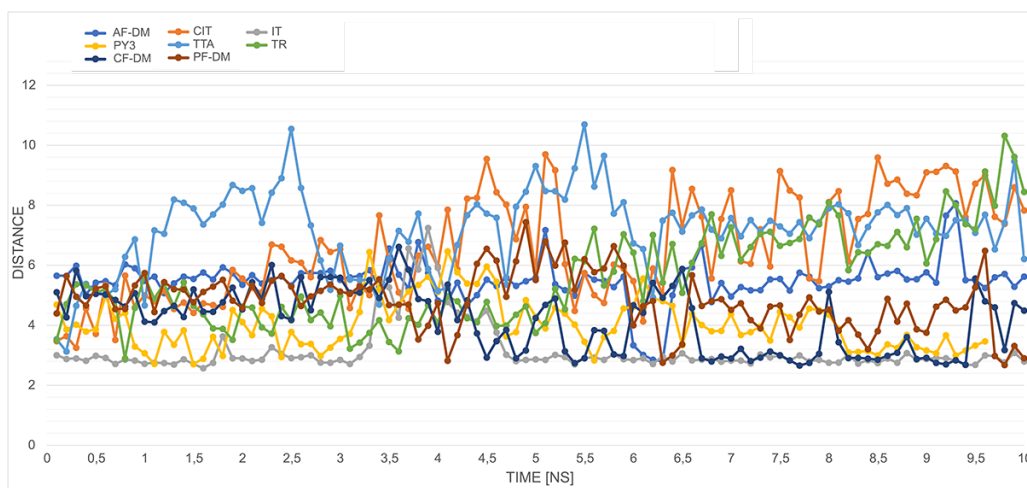
Ponadto, w publikacji [H4], chciałem sprawdzić, czy możliwe jest prowadzenie badań naukowych z wykorzystaniem wyłącznie powszechnie dostępnego oprogramowania (darmowego lub licencjonowanego akademicko). Innymi słowy, czy we współczesnej nauce konieczne jest stosowanie kosztownych licencji, aby uzyskać wiarygodne wyniki badań – cały wachlarz oprogramowania użytego w niniejszych badaniach wpisywał się w założone wymogi.

Modele zostały wygenerowane z wykorzystaniem, algorytmów wpisujących się w 3 metody przewidywania struktur białkowych: klasyczną (Modeller, 23 łącznie 40 modeli; symbol PY3), przewlekania (I-Tasser, C-I-Tasser, 15 modeli; odpowiednio IT i CIT) i *ab initio* (trRosetta, 5 modeli; RoseTTAFold, 5 modeli; DeepMind / AF2, 1 model; AF2 „multi-state protocol” [34], 1 model; CollabFold, 1 model; odpowiednio TR, TTA, AF-DM, PF-DM i CF-DM) dając sumaryczną ilość 68 struktur białkowych, które następnie zostały oszacowane pod względem wartości funkcji geometrycznych/jakościowych, dokładnej oceny wizualnej z uwzględnieniem rotamerów reszt określonego miejsca wiążącego i spodziewanych oddziaływań wewnątrz białkowych. Pozwoliło to na wybranie 8 modeli (po jednym z każdego użytego algorytmu)

do dalszych badań. Wszystkie modele zostały następnie optymalizowane lokalnie (3Drefine [35]) i globalnie (DeepRefiner [36]). Ze względu na wysokie wartości wstępnych oszacowań, dla modeli wygenerowanych w oparciu o skrypt DeepMind zrezygnowałem z optymalizacji globalnej. Wybrane modele zostały także poddane testom wzbogacenia, zarówno przed jak i po optymalizacji, w celu obserwacji potencjalnych zmian w funkcjonalności wygenerowanych struktur. Na podstawie przeprowadzonych testów wzbogacenia (w większości przypadków  $AUC > 0.75$ ) i wartości otrzymanych z 12 różnych funkcji oceniających, w oparciu o analizę statystyczną przygotowano dwa konsekwentne systemy rankingowe, pozwalające na obiektywną ocenę i wybór „najlepszego” z otrzymanych modeli po optymalizacji. W wyniku zastosowanego rankingu wybrałem po jednym modelu z każdej metody, a następnie przeprowadziłem dokładną analizę porównawczą wygenerowanych białek pod względem cech strukturalnych w odniesieniu do dostępnych struktury krystalicznych białek z tej samej rodziny (GPCR, klasa A, rodzina receptorów lipidowych).

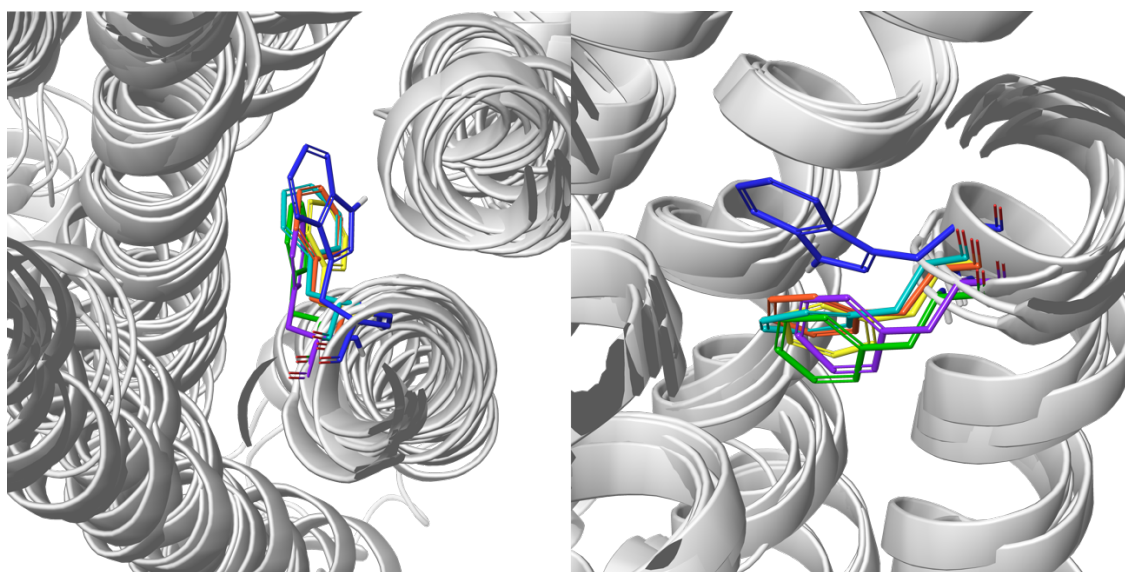
Za cztery główne cechy strukturalne odpowiedzialne za aktywność biologiczną GPR18 uznaje się: blokadę jonową pomiędzy R119<sup>3.50</sup> i S230<sup>6.33</sup>, przełącznik molekularny (*ang. toggle switch*) utworzony przez F245<sup>6.48</sup>, M275<sup>7.42</sup>, H249<sup>6.52</sup> & Y104<sup>3.35</sup>, kieszeń wiążącą sód utworzoną przez N40<sup>1.50</sup>, D68<sup>2.50</sup> i D282<sup>7.49</sup> i mostek solny stanu nieaktywnego pomiędzy R<sup>3.50</sup> i D<sup>3.49</sup> [32]. Pierwszy warunek nie został spełniony w przypadku modeli TR i TTA, jednak z odległościami atomowymi O-N bliskimi wiązania wodorowego i zaskakująco, przez model AF-DM. Obserwowana blokada jonowa pękła we wszystkich przypadkach podczas symulacji dynamiki 10 ns dla wszystkich modeli białek (Rysunek 9. Zmiana odległości blokady jonowej dla 8 modeli GPR18 w formie apo podczas symulacji MD trwającej 10 ns), co może wynikać ze stosunkowo słabego wiązania wodorowego pomiędzy naładowanym i nienaładowanym partnerem i było zgodne z wyżej wymienionymi badaniami.





**Rysunek 9.** Zmiana odległości blokady jonowej dla 8 modeli GPR18 w formie apo podczas symulacji MD trwającej 10 ns.

Przełącznik molekularny natomiast, utworzony przez resztę w pozycji 6.48 wysoce konserwowanego motywu CWXP (który w przypadku GPR18 jest zastąpiony motywem CFXP), dla otrzymanych modeli wydawał się trudny do kontrolowania ze względu na brak aromatycznej reszty bezpośrednio w poprzek przestrzeni wewnątrz domenowej, takiej jak np. F3.36 występującej w CB1 i CB2 [28]. W rzeczywistości, po nałożeniu na dostępne struktury lipidowych receptorów GPCR klasy A związanych odpowiednio z antagonistami lub odwrotnymi agonistami, z fenyloalaniną w pozycji 6.48: CysLT1 (6RZ4, 6RZ5), CysLT2 (6RZ6-6RZ9) i PAF(5ZKQ), konformacja reszty F6.48 pokrywała się dla większości modeli i to bez dodatkowej stabilizacji/interakcji (Rysunek 10). Podobną obserwację stwierdzono podczas nałożeniem z W6.48 receptora CB<sub>1</sub> kannabinoidowego (5UO9).



**Rysunek 10.** Nałożenie reszt w pozycji 6.48 modeli: TTA (żółty), PF-DM (pomarańczowy), CF-DM (morski) oraz 5UO9 (granatowy) 6RZ7 (fioletowy) i 5ZKQ (zielony). Helisy TM są reprezentowane przez białe wstążki dla lepszej przejrzystości obrazu. Lewy panel - widok z góry, prawy panel - widok z boku.

Ostatni warunek, podczas 10 ns symulacji dynamiki molekularnej był zachowany tylko dla modeli AF-DM, PF-DM, CF-DM i IT przez większość czasu podczas symulacji formy *apo* i kompleksów CB148. Biorąc pod uwagę powyższe, można stwierdzić, że modele opisane w publikacji [H4] spełniają molekularne wymogi strukturalne.

Dodatkowo w ramach badań, mając „w ręce” modele o odpowiednich parametrach strukturalnych podjąłem się polemiki dot. możliwego trybu wiązania ligandów i kompozycji aminokwasowej ortosterycznego miejsca wiązania. Badania przeprowadzone przez Neumanna [30] sugerują nieco inny tryb wiązania od wcześniej opisanych (m.in. w pracy [H3]), a w którym biorą udział reszty górnej części TM2 (R78<sup>2.60</sup>, Y81<sup>2.63</sup>, Y82<sup>2.64</sup>) i TM3 (L97<sup>3.28</sup>) wraz z resztami EL2 z jednej strony oraz aromatyczną klatką utworzona przez łańcuchy boczne aminokwasów TM6 i TM7. Taki sposób wiązania jest wspólny dla kilku GPCRs [33,34], w tym dla podrodziny ligandów lipidowych, na przykład w strukturze receptora czynnika aktywującego płytki (PAF) 5ZKQ [35] (36% podobieństwa i 20% identyczności z GPR18). Niemniej jednak, porównując ze strukturą receptora leukotrienowego cysteinylowego 1 (CysLT1, PDB ID: 6RZ4, ze związanym antagonistą), złożoną z <sup>2.60</sup>RADYY<sup>2.64</sup> zamiast <sup>2.60</sup>RMFYY<sup>2.64</sup> występującego w GPR18, okazało się, że analogiczny R78<sup>2.60</sup> również uczestniczy w wiązaniu antagonisty. W rzeczywistości na zaangażowanie tych dwóch obszarów strukturalnych (TM2/TM3 & TM6/TM7) może wpływać obecność  $\pi$ -wybrzuszenia i  $\pi$ -helisy, gdyż taką korelację pomiędzy miejscami aktywnymi białka a  $\pi$ -helisami lub  $\pi$ -wybrzuszeniami wykazano już wcześniej [37, 38]. Analizując strukturę GPR 18 znalazłem  $\pi$ -wybrzuszenie przy F33<sup>1.43</sup> oraz 8 aminokwasową  $\pi$ -helisę: <sup>5.42</sup>RLTFFFLI<sup>5.49</sup>. To z kolei skutkuje: a) wygięciem TM2, które determinuje większą możliwość interakcji R78<sup>2.60</sup>, Y81<sup>2.63</sup> i Y82<sup>2.64</sup> z ligandem, jak również b) rotacją/wyginaniem TM6 z R191<sup>5.42</sup> skierowanym do wewnątrz receptora. Potwierdziło to częściowo przewidywania z pracy [H3]. Ponadto, ustalenia te potwierdziłem przewidywaniami z serwisu PrankWeb [39] dla wszystkich modeli. Niezależnie od wybranego modelu, obserwowany był stały wzór aminokwasów, który stanowi (przypuszczalnie) kieszeń wiążącą GPR18 z najczęstszymi predykcjami R78<sup>2.60</sup>, Y81<sup>2.63</sup>, Y82<sup>2.64</sup>, T101<sup>3.32</sup>, C172<sup>45.50</sup>, L173<sup>45.51</sup>, K174<sup>45.52</sup>, R191<sup>5.42</sup>, F248<sup>6.51</sup>, F252<sup>6.55</sup>, L255<sup>6.58</sup>, N265<sup>7.32</sup>, G268<sup>7.35</sup>, A269<sup>7.36</sup>, T272<sup>7.39</sup>.

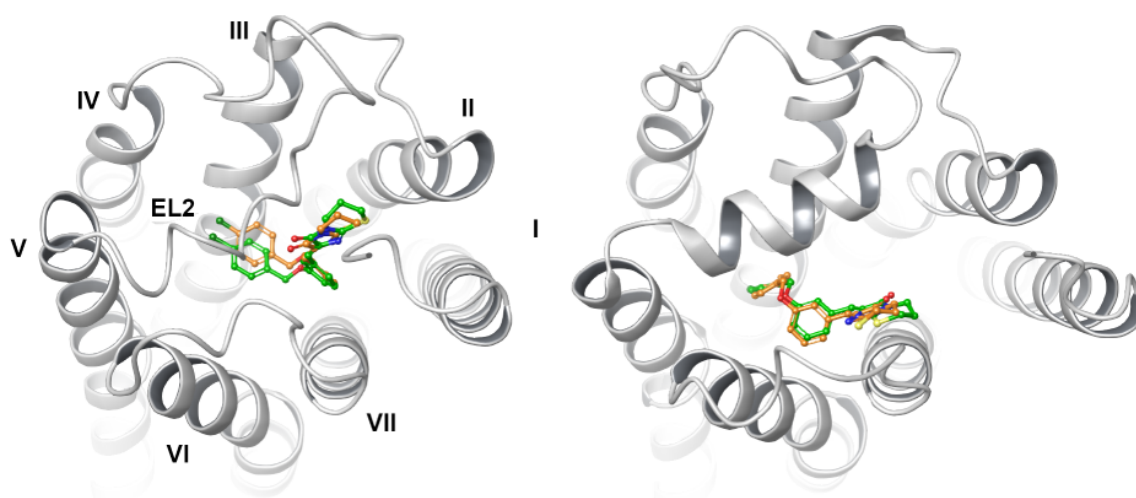
W następnej kolejności postanowiłem zadokować sześć strukturalnie podobnych ligandów z naszej grupy badawczej o zakresie powinowactwa do GPR18 od 93 do 650 nM i aktywności hamującej. Aby uniknąć stronniczości, do dokowania wykorzystałem współrzędne kieszeni wiążącej z serwisu PrankWeb. Jak można było się spodziewać, różnice w kształcie i wielkości

kieszeni wiążących dla poszczególnych modeli miały duży wpływ zarówno na przypuszczalne pozycje wiązania, jak i na wyniki funkcji skorującej - najniższe wartości obliczono dla modeli IT i PY3, a najwyższe dla modeli DM.

Pozycje ligandów najbardziej zbliżone do „natywnych” udało się zaobserwować w przypadku modeli otrzymanych algorytmami *ab initio* - obliczone sposoby wiązania zaczęły wydawać się bardziej uporządkowane i znaczące, czemu towarzyszyły wyższe i lepiej różnicujące wyniki funkcji skorującej w porównaniu z modelami otrzymanymi innymi metodami. Co więcej wygenerowane pozycje różniły się od tych, które zostały obliczone w ramach publikacji [H3]. Ogólnie: układ imidazotiazinonu układał się pomiędzy TM1 i TM2, oddziaływując z Y82<sup>2.64</sup> i/lub Y81<sup>2.63</sup> poprzez wiązanie wodorowe z azotem imidazolowym, a proksymalny tlen eterowy tworzył wiązanie wodorowe z R78<sup>2.60</sup>, podczas gdy zachodnia (dystalna) część liganda była bądź zawinięta pod pętlą EL2, bądź klatkowana przez reszty aromatyczne TM6 oraz poprzez oddziaływania kation- $\pi$  z R191<sup>5.42</sup>, co byłoby zgodne z wcześniej zaproponowanym wzorem wiązania ligandów dla GPR18 [25]. Mogłoby to również tłumaczyć niższą aktywność ligandów CB92 lub CB5 vs CB148 (względem GPR18) poprzez mniejszą ilość interakcji z TM6 dla tych struktur. Jednak dłuższe ligandy CB153 i CB154 zostały obliczone jako wiążące się w sposób odwrotny (zwłaszcza w przypadku struktur AF-DM i PF-DM).

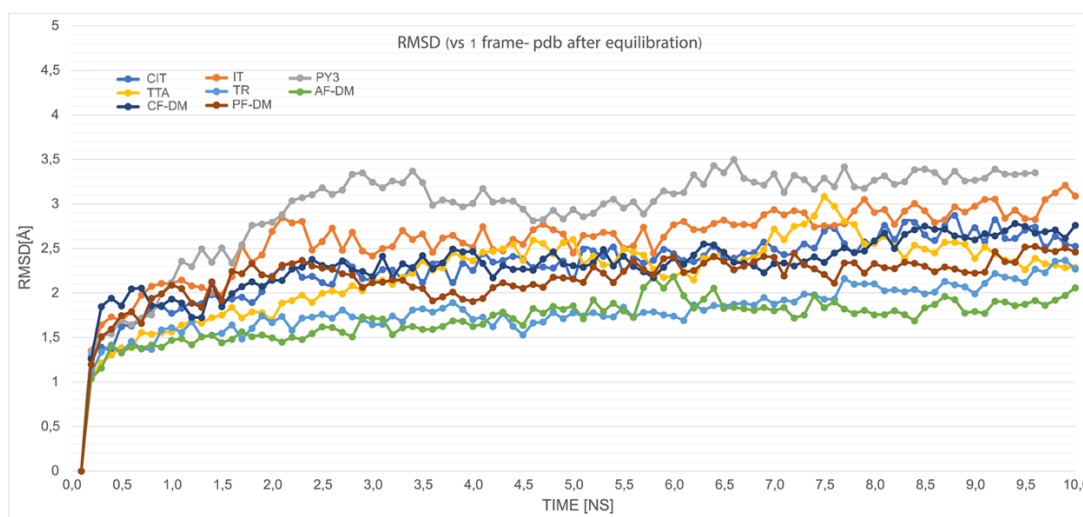
W kolejnym kroku, aby upewnić się co do słuszności wyliczonych powyżej i wybranych do symulacji dynamiki molekularnej pozycji wiążących, postanowiłem zastosować inny, darmowy algorytm dokowania. W efekcie otrzymałem niemal idealne pokrywanie się obliczonych za pomocą algorytmu GWO Vina domniemanych trybów wiązania dla wybranych ligandów, zadokowanych do modeli CIT, TR, TTA i DM. W innych przypadkach jednak, ligandy zostały obliczone jako dokowane w tej samej przestrzeni, ale nie udało się znaleźć stałego trybu pozycji lub oddziaływań dla strukturalnie podobnych ligandów. Te obserwowane różnice mogą wynikać z innego (niż uprzednio zastosowany DockThor) algorytmu wyszukiwania/oceny GWO Vina, gdzie zmienne konformacyjne zarówno liganda jak i receptora są ewoluowane iteracyjnie. Przykładowe porównanie trybów dokowania dla tych samych par ligand/receptor, ale przy użyciu dwóch różnych algorytmów, przedstawiono na Rysunek 11.





**Rysunek 11.** Porównanie sposobów wiązania CB5 obliczonych za pomocą DockThor (zielony) i GWO Vina (pomarańczowy) do modeli TTA (lewy) i PF-DM (prawy). Cyfry rzymskie oznaczają TM - dla jasności zaznaczone tylko w modelu TTA.

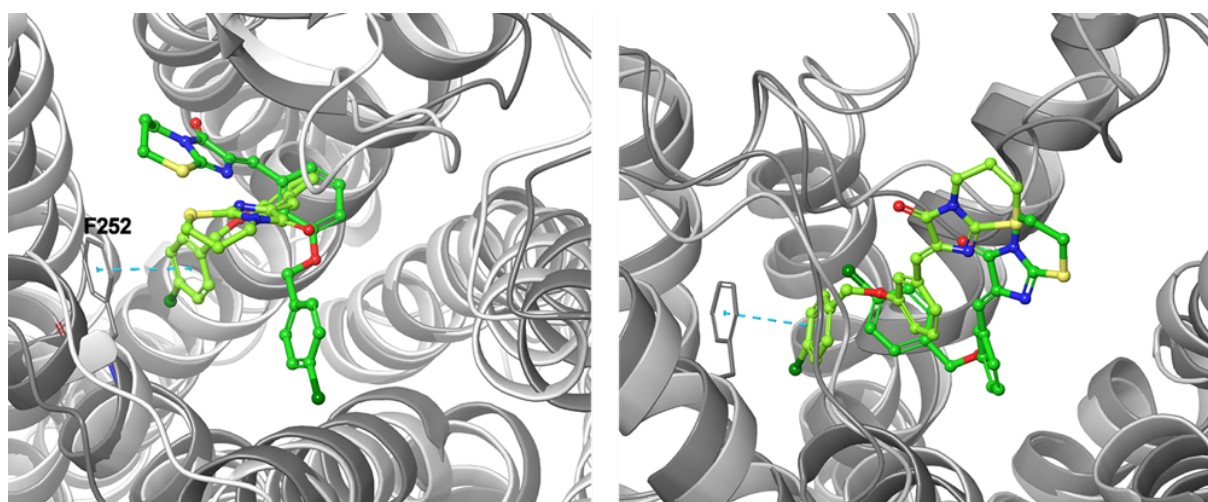
Dla wszystkich użytych białek, w tym ich form *apo*, jak również wybranych kompleksów przeprowadzone zostały 10 ns symulacje dynamiki molekularnej (MD). Stabilność form niezwiązanych obliczona za pomocą zmian RMSD w porównaniu z pierwszą ramką MD została przedstawiona na Rysunek 12. Przedstawione wartości przekładają się na obserwowaną stabilność modeli białek podczas tych symulacji, przy czym model AF-DM okazał się być najbardziej (średnie RMSD  $\sim 1,5\text{\AA}$ ), a PY3 najmniej stabilny (średnie RMSD  $\sim 3\text{\AA}$ ).



**Rysunek 12.** Zmiany wartości RMSD mierzone w  $[\text{\AA}]$  vs. ramka 1, podczas 10 ns symulacji modeli niezwiązanych białek opisanych w publikacji [H4].

W przypadku kompleksów białko-ligand, różnice w obliczonych sposobach wiązania w dużym stopniu wpłynęły na zachowanie ligandów. Można jednak zauważyć pewne prawidłowości. Na przykładzie liganda CB5, w kompleksach otrzymanych z modeli CIT, PY3 i TR, ligandy

nie były stabilne podczas symulacji i wydawały się swobodnie poruszać w przestrzeni pomiędzy TM2, TM3 i TM7. Jednak dla kompleksu CB5-TR ligand zachował początkowe oddziaływania z Y81<sup>2.63</sup> przez pierwsze 4 ns symulacji, kończąc symulację z terminalnym pierścieniem benzenowym w pobliżu TM6, przy wsparciu  $\pi$ -stackingu z F252<sup>6.55</sup>. Podobna obserwacja miała miejsce dla kompleksu CB5-IT, gdzie początkowo ligand nawiązywał kontakty z (głównie) aminokwasami EL3 i EL2. Przy dość stabilnym rdzeniu heterobicyklicznym zaobserwowano ruch (aro)alifatycznego ogona w sposób półkolisty tak, że w 5 ns symulacji ułożył się on pomiędzy TM5 i TM6. Ligand pozostawał w tej pozycji przez cały pozostały czas symulacji, klatkowany przez pierścienie aromatyczne aminokwasów i/lub R191<sup>5.42</sup>. Podobna obserwacja miała miejsce w przypadku kompleksu TTA-CB5 (Rysunek 13).



*Rysunek 13. Orientacja CB5 w modelach IT (lewy panel) i TTA (prawy panel) w czasie 0 ns (zielony) i po 10 ns symulacji (limonkowy).*

Ponadto podobne obserwacje dla ogona (aro)alifatycznego stwierdzono dla kompleksu otrzymanego z przypuszczalnie najlepiej działającymi modelami wygenerowanymi przez skrypt AlphaFold2, ze wskazaniem na kompleks CB5 z modelem CF-DM. Reszta R191<sup>5.42</sup> stabilizowała dystalny pierścień benzenowy poprzez interakcje kationowe z dodatkowym wsparciem F248<sup>6.51</sup> i H249<sup>6.52</sup>, które zapewniały interakcje typu  $\pi$ -stacking przez całą symulację. Z kolei głowa heterobicykliczna kontaktowała się również z aminokwasami EL2 i EL3, przy czym ten ostatni zamykał się nad ligandem począwszy od 1 ns symulacji. Ogólnie, obserwowane zmiany położenia ligandu i względnie stałe oddziaływania (w większości) niezależnie od zastosowanego modelu białka, mogą wskazywać na znaczenie oddziaływań stabilizujących klatki aromatycznej TM6 dla wiązania antagonisty/odwrotnego agonisty dla zestawu użytych ligandów.

Bukiet podobnych oddziaływań i zachowań ligandów podczas symulacji zaobserwowałem również w przypadku kompleksów z pozostałymi ligandami: CB148, CB153 i CB92. W przypadku tego ostatniego, najbardziej stabilnym okazał się kompleks CF-DM-CB92, który zachował większość oddziaływań wyjściowych. Ligand był stabilizowany przez 3 wiązania wodorowe – pomiędzy grupą karbonylową a Y82<sup>2.64</sup>, proksymalnym tlenem eterowym z T171 oraz dystalnym z R191<sup>5.46</sup>. To ostatnie zastąpiło początkowe oddziaływanie kation- $\pi$  z dystalną grupą fenylową ze względu na delikatną zmianę konformacji zarówno liganda jak i białka w pierwszej ns symulacji. Część aromatyczna natomiast, była stabilizowana przez kanapkowanie z H249<sup>6.52</sup> lub F248<sup>6.51</sup> do końca symulacji. Z drugiej strony, R78<sup>2.60</sup> zachowywała wewnątrzcząsteczkowe oddziaływanie z A110, stabilizując w ten sposób EL2.

Różnicę w powinowactwie do GPR18 pomiędzy CB92 a CB153 można natomiast wyjaśnić tym, że w przypadku tego pierwszego, reszta R191<sup>5.46</sup> tworzyła oddziaływania z tlenem eterowym poprzez wiązanie wodorowe (brak w przypadku CB153). W przypadku najaktywniejszej struktury CB148 można wnioskować, że odpowiada za to grupa nitrylowa skierowana w dół receptora umożliwiając przez to dodatkowe oddziaływania hydrofobowe.

Podsumowując, na podstawie dość ostrych kryteriów spośród kilkudziesięciu modeli wybrałem do ewaluacji 8 struktur, w tym 3 oparte na algorytmie AF2. Kolejnym krokiem było dokładne porównanie uzyskanych struktur i identyfikacja miejsc wiążących. Dodatkową uwagę poświęciłem kwestii pętli EL2, która najprawdopodobniej może brać udział w wiązaniu ligandów, a którą ze względu na dużą elastyczność tego fragmentu pozostawiona została w niezmienionej postaci (brak dodatkowych procedur modelowania tej pętli). Ponieważ, jak na razie, miejsce wiązania GPR18 pozostaje w sferze domysłów, spróbowałem zebrać dostępną wiedzę i nakreślić bardziej spójny schemat możliwych interakcji w samej proponowanej kieszeni wiążącej. W tym celu z jednej strony wykorzystaliśmy jeden z najwyższej ocenionych predyktorów miejsc wiążących, a z drugiej strony, na podstawie wspomnianego porównania, szukałem wspólnych cech strukturalnych z receptorami z tej samej rodziny, jak również położenia ligandów w ich kieszeniach wiążących. Przewidywania częściowo pokrywały się już z opublikowanymi danymi literaturowymi. Na tej podstawie udało się opisać możliwy schemat oddziaływania antagonistów z aminokwasami ortosterycznego miejsca wiążącego GPR18. Wniosek ten można wysnuć na podstawie następujących obserwacji: a) bez dokładnego określenia uczestniczących aminokwasów, a jedynie współrzędnych miejsca wiązania, obliczone pozy wiążące wykazywały interakcje z jednej strony odpowiadające naszym odkryciom, z drugiej zaś (częściowo) pokrywające się z dotychczas opublikowanymi;

b) możliwe było określenie wpływ różnic strukturalnych na wzorce wiązania dla różne aktywnych ligandów c) uzyskane pozy były przewidywane przy użyciu dwóch różnych algorytmów dokowania i były stabilne w symulacjach dynamiki molekularnej.

Podsumowując, biorąc pod uwagę wszystkie uzyskane wyniki, można stwierdzić, że szeroki zakres swobodnie dostępnego oprogramowania i/lub licencji akademickich pozwala na przeprowadzenie rzetelnych badań modelowania/dokowania molekularnego. Niemniej jednak, głównym ograniczeniem tego badania była moc obliczeniowa użytych maszyn. W celu rzetelnego porównania wszystkich otrzymanych modeli i wybranych kompleksów, zmuszeni byliśmy wykonać jedynie krótkie, 10 ns symulacje MD.

#### 4.4.3. Receptor H<sub>3</sub> histaminowy

Receptor H<sub>3</sub> histaminowy (H<sub>3</sub>R), wybitny członek rodziny receptorów histaminowych, od momentu odkrycia i sklonowania genów służy jako szeroko eksplorowany cel farmakologiczny ze względu na szerokie spektrum działania neuromodulacyjnego w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) [40]. Z jednej strony, aktywacja presynaptycznych receptorów na neuronach histaminergicznych powoduje regulację syntezy i uwalniania ich naturalnego liganda – histaminy. Z drugiej strony, aktywacja H<sub>3</sub>R jako heteroreceptorów wpływa na cały szereg innych neuroprzekaźników, w tym acetylocholinę, dopaminę, serotoninę, noradrenalinę, kwas  $\gamma$ -aminomasłowy, glutaminian i substancję P, wymieniając tylko kilka z nich [41]. Z punktu widzenia anatomii, H<sub>3</sub>R ulegają ekspresji w zwojach podstawnych, hipokampie i korze mózgowej u ludzi – regionach związanych z poznaniem, snem, czuwaniem i regulacją homeostazy. W związku z tym, ligandy H<sub>3</sub>R, zarówno antagoniści jak i odwrotni agoniści, ponieważ H<sub>3</sub>R wykazują również aktywność konstytutywną, stanowią jedną z największych grup współczesnych badań nad ligandami GPCR, z implikacjami w leczeniu wielu chorób OUN, w tym chorób Alzheimera i Parkinsona, schizofrenii, ADHD, otyłości i narkolepsji [42]. W rzeczywistości, podczas gdy kilka dużych firm farmaceutycznych pracowało nad rozwojem ligandu hamującego H<sub>3</sub>R w wyżej wymienionych wskazaniach i osiągnęło III fazę w badania klinicznych, wszystkie z nich zakończyły się niepowodzeniem. Jedyne związku, pitolisant, trafił na rynek pod nazwą Wakix<sup>®</sup> ze wskazaniami do leczenia narkolepsji [43].

Ponadto receptor H<sub>3</sub> (wraz z H<sub>4</sub>R) histaminowy ma specyficzną budowę ortosterycznego miejsca wiążącego. Podczas gdy w większości aminergicznych receptorów GPCR za kluczowy

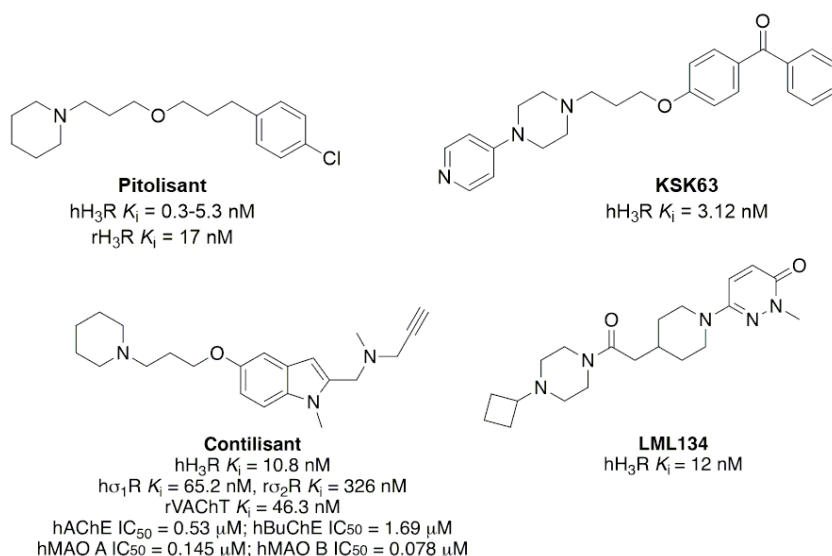
punkt uchwytu uważa się resztę kwasu asparaginowego w położeniu 3.32, H<sub>3</sub>R posiada z drugiej strony, łatwiej dostępną resztę kwasu glutaminowego E206<sup>5,46</sup>, która jest postulowana jako nadrzędny punkt uchwytu przez wielu autorów. Jednocześnie, wciąż nie posiadając rozwiązanej struktury krystalicznej, modelowanie ligandów H<sub>3</sub>R opiera się o modele homologiczne.

Na przestrzeni lat zsyntetyzowano wiele ligandów H<sub>3</sub>R opartych na różnych układach heterocyklicznych, począwszy od natywnej dla histaminy cząsteczki imidazolu, poprzez (podstawione) piperidyny, pirolidyny i piperazyny. Wciąż jednak ogólna struktura ligandów pozostawała niezmienna: heterocykliczne zasadowe rdzenie połączone poprzez (usztyniony) łańcuch alkilowy z polarną cząsteczką, która sama łączy się bezpośrednio lub poprzez drugi linker z tzw. wschodnim regionem arbitralnym. Podczas gdy te ostatnie są uważane za modulujące siłę działania i właściwości farmakokinetyczne antagonistów/odwrotnych agonistów H<sub>3</sub>R, cząsteczki heterocykliczne utrzymują niezbędne interakcje z aminokwasami kieszeni wiążącej, niezbędnej do wiązania receptora.

### Publikacja [H5]

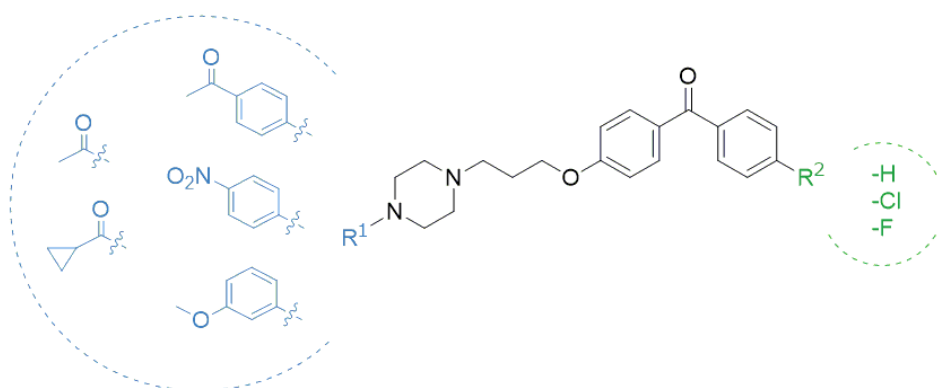
**Kamil J. Kuder** <sup>§</sup>; Magdalena Kotańska; Katarzyna Szczepańska; Kamil Mika; David Reiner-Link; Holger Stark; Katarzyna Kieć-Kononowicz. Discovery of Potential, Dual-Active Histamine H<sub>3</sub> Receptor Ligands with Combined Antioxidant Properties. *Molecules*, 2021: Vol. 26, nr 8, id. art. 2300

Badania wykonane w naszej grupie [44–46] pozwoliły na ustalenie unikalnej cząsteczki heterocyklicznej, a mianowicie cząsteczki 4-pirydylopiperazyny jako nowego bioizosterycznego zamiennika piperidyny. Badania modelowania molekularnego, które prowadziłem w ramach powyższych prac potwierdziły jego zdolność do tworzenia dodatkowych interakcji, poza tymi z protonowanym azotem piperazyny, a wysoce konserwowanymi aminokwasami H<sub>3</sub>R. Wyniki te zostały potwierdzone *in vitro*, dowodząc, że układ ten jest kluczowym elementem wysokiego powinowactwa do H<sub>3</sub>R. Z kolei obszerne podstawniki regionu wschodniego, takie jak benzofenon, okazały się również działać jako możliwe dodatkowe akceptory wiązań wodorowych i hydrofobowych, wzmacniając oddziaływanie ligand-receptor. Zostało to ponownie udowodnione *in vitro*, czego efektem jest jeden z najwyżej aktywnych ligandów H<sub>3</sub>R z naszej grupy, KSK63 (hH<sub>3</sub>R  $K_i = 3,12$  nM, Rysunek 14).



Rysunek 14. Struktury i właściwości referencyjnych ligandów receptora  $H_3$  histaminowego.

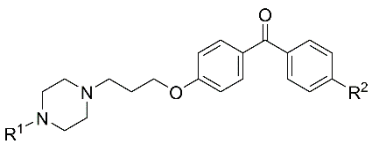
Próbując znaleźć nowe podwójnie działające ligandy  $H_3R$ , w ramach pracy [H5] zaprojektowałem serię ligandów z modyfikacjami części hydrofilowej i dystalnych regionów regulacyjnych (odpowiednio  $R^1$  i  $R^2$ ; Rysunek 15), opartych strukturalnie na opisanym powyżej KSK63.

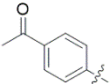
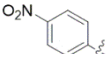
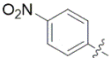
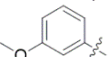
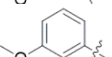
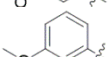


Rysunek 15. Schemat ogólnej polączonych zaprojektowanych w ramach publikacji [H5].

Do tej serii wybrałem 5 różnych (cyklo)alkilowych podstawników karbonylowych i 4-arylpiperazynowych. Stosując bezpośrednie podstawniki (cyklo)alkilokarbonyłowe piperazyny N4, chciałem sprawdzić, czy taka redukcja ładunku ujemnego azotu piperazyny N4 będzie nadal akceptowalna dla retencji powinowactwa  $H_3R$  [47]. Z drugiej strony, aby uniknąć ewentualnego nakładania się efektów indukcyjnych i mezomerycznych *p*-podstawionej grupy metoksyłowej, wybrałem pochodne *m*-podstawione, tak aby uwzględnić tylko ten pierwszy. Z drugiej strony chciałem również sprawdzić, czy wzrost hydrofobowości poprzez wprowadzenie atomów halogenu do cząsteczki benzofenonu jest również tolerowany.



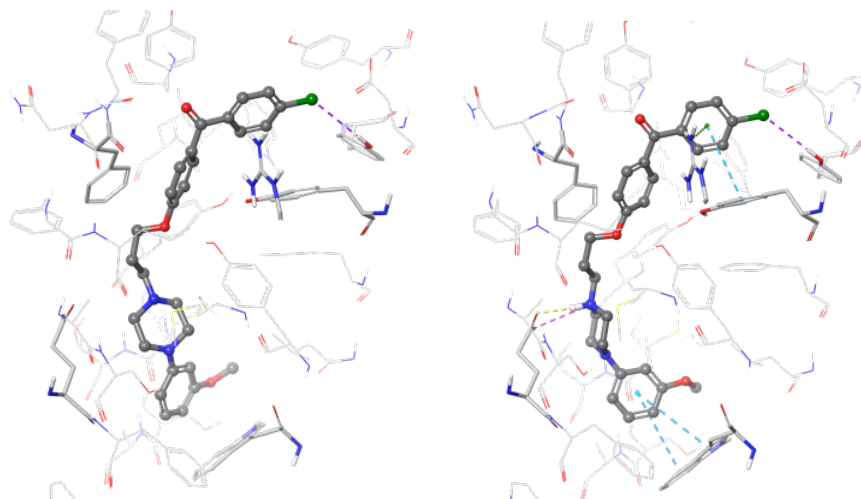
Tabela 1. Wybrane struktury i aktywności w kierunku H<sub>3</sub>R ligandów opisanych w publikacji [H5].


Związek	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	hH <sub>3</sub> R K <sub>i</sub> [nM] x̄ [CI 95 %]
<b>10</b> QD10		H	633 [206, 1942]
<b>14</b> QD20		Cl	622 [211, 1832]
<b>15</b> QD6		F	580 [177, 1902]
<b>16</b> QD13		H	592 <sup>a</sup> [394, 889]
<b>17</b> QD18		Cl	518 <sup>a</sup> [201, 1336]
<b>18</b> QD9		F	715 [352, 1453]

W rezultacie, w ramach dwuetapowej syntezy otrzymałem 15 struktur o umiarkowanym powinowactwie do hH<sub>3</sub>R (Tabela 1), z najlepszym związkiem **17** (hH<sub>3</sub>R K<sub>i</sub> = 518 nM), będącym pochodną *m*-metoksyową. Przyczyną tych obserwacji może być niska wartość pK<sub>a</sub> azotu N4 otrzymanych związków ze względu na zastosowane podstawniki piperazyny. Przy pK<sub>a</sub> = -6,0 dla związków zawierających w położeniu N4 podstawnik acetylowy można przypuszczać, że większość związku w fizjologicznym pH występuje w formie niezjonizowanej. Może to skutkować pozbawieniem kluczowych oddziaływań z aminokwasami kieszeni wiążącej, co skutkuje bardzo niskim lub całkowitym brakiem powinowactwa. Wydaje się, że jedynie pochodne *m*-metoksy- i *p*-nitrofenylowe wyrażają pK<sub>a</sub> na poziomie pozwalającym na obfitość form zjonizowanych. Próbę potwierdzenia zależności stopnia zjonizowania od możliwych interakcji wykonałem posługując się narzędziami modelowania molekularnego.

Dwa z czterech znanych i opisanych receptorów histaminowych nadal pozostają węzłem gordyjskim w ujęciu krystalograficznym. Dotychczas udało się rozwiązać strukturę krystaliczną receptora histaminowego H<sub>1</sub>R (PDB ID: 3RZE) i bardzo niedawno H<sub>2</sub>R (PDB ID: 7UL3). Dlatego też w przedstawionych badaniach wykorzystałem opisany wcześniej model homologiczny receptora histaminowego H<sub>3</sub>R [44, 45], który został skonstruowany na podstawie struktury krystalicznej muskarynowego receptora acetylocholiny M<sub>2</sub> (PDB ID: 3UON). Ponadto, biorąc pod uwagę fakt, że ze względu na bardzo niską zasadowość, w fizjologicznym pH duża ilość związków może występować w postaci niezjonizowanej, do badań dokowania przygotowałem zarówno konformery protonowane jak i nieprotonowane.

W przypadku konformerów nieprotonowanych, związki były umieszczone płyciej w kieszeni wiążącej, a ich stabilizacja odbywała się głównie poprzez oddziaływania  $\pi$ - $\pi$  lub dodatkowe wiązania wodorowe z Y374<sup>3,51</sup> lub R381<sup>6,58</sup>. Nie stwierdzono natomiast interakcji z żadnym z kluczowych aminokwasów: E206<sup>5,46</sup> ani D114<sup>3,32</sup>. Dla ewentualnych form niezjonizowanych może to tłumaczyć bardzo niskie lub żadne powinowactwo do receptora H<sub>3</sub> histaminowego (Rysunek 16. Obliczone tryby wiązania dla związku 17 w formie nieprotonowanej (lewy panel) i protonowanej (prawy panel)).



Rysunek 16. Obliczone tryby wiązania dla związku 17 w formie nieprotonowanej (lewy panel) i protonowanej (prawy panel).

Niemniej jednak, dla konformerów protonowanych, zaskakująco zaobserwowałem dwa różne sposoby wiązania: *standardowy* (ST), ze wschodnim regionem skierowanym do przestrzeni pozakomórkowej, oraz *odwrócony* (UD). Jednak niezależnie od trybu, położenie zasadowych, protonowanych fragmentów ligandów było w większości przypadków podobne. W obu przypadkach kluczowa interakcja - tworzenie mostka solnego i/lub wiązania wodorowego pomiędzy protonowanym azotem aminowym a E206<sup>5,46</sup> pozostała zachowana ze względu na bliską lokalizację protonowanego azotu.

W trybie ST fragmenty benzofenonu zajmowały przestrzeń ogrodzoną przez reszty aromatyczne F193, Y189(ECL2) i Y394<sup>7,35</sup> po bokach oraz Y91<sup>2,61</sup> i Y94<sup>2,64</sup> na górze, co było zgodne z poprzednimi wynikami. W większości przypadków zaobserwowałem również obecność wiązania wodorowego pomiędzy grupą karbonylową a R381<sup>6,58</sup>, z wyjątkiem nieaktywnych struktur 4-9 (pochodne N4-acetylpiperazyny). Dodatkowa stabilizacja poprzez tworzenie wiązania halogenowego z Y91<sup>2,61</sup> oraz  $\pi$ - $\pi$  stacking z Y394<sup>7,35</sup> i przełącznikiem molekularnym W371<sup>6,48</sup> występowała w przypadku najbardziej aktywnych dla tej serii



pochodnych *m*-metoksyfenylowych. Interakcje te mogą tłumaczyć ogólnie wyższe powinowactwo ligandów z tej podgrupy do H<sub>3</sub>R.

Z drugiej strony, tryb UD zaobserwowałem dla pochodnych N4-piperazyno: *p*-acetylofenylowych i *p*-nitrofenylowych, z wyjątkiem pochodnej **18(QD9)**, dla której zaobserwowałem oba tryby. Tryb ST charakteryzował się jednak nieco niższą wartością energii kompleksu (-58,78 vs -56,08 kcal/mol; glide energy). W tym trybie (UD) fragmenty benzofenonu docierały głębiej w kierunku wąskiej podkieszeni zlokalizowanej pomiędzy regionami transmembranowymi (TM) 1, TM3 i TM7. Ta ostatnia jest utworzona przez łańcuchy boczne L117<sup>3.35</sup> i W371<sup>6.48</sup> oraz S121<sup>3.39</sup> i A122<sup>3.40</sup> od dołu. Dodatkowa stabilizacja pozy odbywała się poprzez oddziaływania kation- $\pi$  pomiędzy protonowanym azotem piperazynowym a F193 (ECL2) oraz wiązania wodorowe pomiędzy grupami karbonylową i nitrową a R381<sup>6.58</sup>. Wraz z nowymi strukturami zadokowałem również strukturę referencyjną



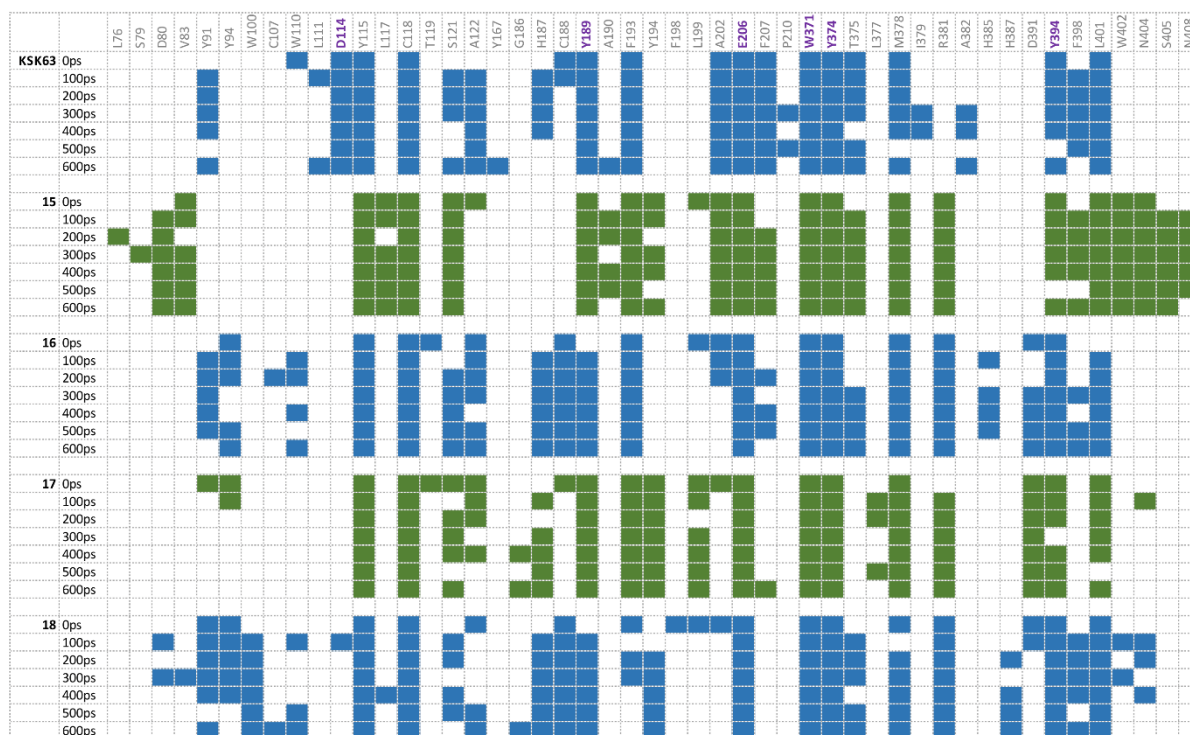
**Rysunek 17.** Nalożenie poszczególnych ramek dynamiki molekularnej dla wybranych ligandów: **16**, **17**, **18ST**, **18UD** (kolejno L-P); 0 ps - szary, 100 ps - zielony, 200 ps - morski, 300 ps - zielony, 400 ps - fioletowy, 500 ps - pomarańczowy, 600 ps - żółty.

KSK63. Ze względu na budowę fragmentu zasadowego (układ 4-pirydylopiperazyny), protonowany jest azot cząsteczki pirydylowej zamiast piperazynowego. Pozwala to na przesunięcie liganda bliżej w kierunku TM3 i utworzenie dodatkowej interakcji jonowej z kluczową kotwicą aminergicznych GPCR, D114<sup>3.32</sup>. Zaobserwowany brak takich oddziaływań dla nowych, opisywanych związków może również przemawiać za ich znacznie niższym powinowactwem do receptora H<sub>3</sub> histaminowego.

Stabilność obliczonych póż dla najbardziej aktywnych związków tej grupy **15**, **17** oraz obu orientacji **18** wraz ze związkiem referencyjnym KSK63 oceniłem następnie za pomocą krótkich symulacji dynamiki molekularnej (MD). Z każdej symulacji wybrałem 7 póż (pozę początkową, oraz po każdym 100 ps aż do 600 ps). W przypadku związków **15**, **17** i KSK63

kompleksy okazały się stabilne przez całą symulację 600ps (Rysunek 17), zachowując kluczowe oddziaływania (Rysunek 18), oraz energię potencjalną (U) układu atomowego na poziomie ~1000 kcal/mol.

W obu przypadkach, pozy początkowe (zaznaczone na szaro, Rysunek 17) były bardzo podobne do ich orientacji na końcu symulacji (zaznaczone na żółto). Jednak przesunięcie miejsca wiązania z zachowaną konformacją pojawiło się w pierwszych 100 ps symulacji. Z drugiej strony, analiza zachowania KSK63 pozwoliła wyjaśnić jego wyjątkowo wysokie powinowactwo do H<sub>3</sub>R. Konformacja ta pozostawała dość stabilna podczas symulacji z zachowaniem spójnego zestawu oddziaływań. Co nie zostało zaobserwowane dla pozostałych struktur, protonowany azot pirydynowy zachowywał przez całą symulację oddziaływania nie tylko z kluczową, aminergiczną kotwicą jonową D114<sup>3,32</sup>, ale również z E206<sup>5,46</sup>. Ponadto, wszystkie kompleksy, wykazały stosunkowo spójny zestaw oddziaływań ligand-białko występujących podczas całej symulacji MD. Większość zaobserwowanych interakcji wystąpiła w obrębie TM3, TM5, TM6 i TM7 oraz ECL2, ze spójnymi oddziaływaniami z Y115<sup>3,33</sup>, Y189<sup>45,51</sup>, E206<sup>5,46</sup>, Y394<sup>7,35</sup>. W przypadku związku **18**, standardowa orientacja wydaje się bardziej stabilna podczas symulacji, z większością startowych kluczowych interakcji zachowanych w ostatniej klatce.



**Rysunek 18.** Molekularne odciski palców oddziaływań związków KSK63, 15 - 18 z modelem H<sub>3</sub>R podczas symulacji MD dla poszczególnych ramek. Kolorowe pola wskazują na interakcje pomiędzy ligandem a odpowiadającym mu aminokwasem. Kluczowe aminokwasy zostały zaznaczone kolorem fioletowym.

Wpisując się w nurt łączenia w jednej cząsteczce wielu kierunków działania, chciałem sprawdzić, czy oprócz spodziewanego pośredniego efektu neuroprotekcijnego (poprzez antagonizm H<sub>3</sub>R), otrzymane ligandy mogą działać również bezpośrednio (poprzez wykazywanie właściwości antyoksydacyjnych). Pomimo, że w otrzymanych związkach brakuje protonu fenolowego uważanego za niezbędny do aktywności antyoksydacyjnej, zwracając uwagę np. na strukturę min. znanego antyoksydantu Melatoniny [48], lub czterocełowego liganda H<sub>3</sub>R Contilisanta [48, 49], wybrane związki zostały przetestowane pod kątem możliwych właściwości antyoksydacyjnych (test FRAP) i zmniejszania wolnych rodników (test DPPH). Spośród trzech różnych podstawników fenyłowych (Ph) przebadanych związków, tylko pochodne metoksyłowe okazały się mieć właściwości antyoksydacyjne. Może to wynikać z faktu, że *p*-NO<sub>2</sub>-Ph, *p*-COCH<sub>3</sub>-Ph, są zdolne do przyciągania elektronu zamiast oddawania go, podczas gdy *p*-OCH<sub>3</sub>-Ph są zdolne do oddawania elektronu zamiast przechwytywania, co z kolei wskazuje na ich zdolność antyoksydacyjną. Jednak w przypadku podstawnika oddającego elektrony, jakim jest *m*-OCH<sub>3</sub>, aktywność antyoksydacyjna pojawia się w badanej grupie związków.

Podsumowując, w rezultacie badań opisanych w pracy [H5] udało się otrzymać ligandy receptora H<sub>3</sub>R o umiarkowanym powinowactwie do ludzkiego H<sub>3</sub>R, oscylującym wokół  $K_i = 500$  nM, z drugiej strony wykazujących właściwości antyoksydacyjne (np.: **16**, hH<sub>3</sub>R  $K_i = 592$  nM, hamujące 50-60% aktywności kwasu askorbowego przy 10<sup>-4</sup> mol/L). Według mojej wiedzy, obok niedawno opublikowanego Contilisantu i jego poprzednika ASS234, otrzymane tu pochodne są jednymi z niewielu ligandów H<sub>3</sub>R o opisanych właściwościach antyoksydacyjnych. Co ciekawe, dokowanie w modelu homologicznym H<sub>3</sub>R ujawniło dwa potencjalne sposoby wiązania, przy czym w obu przypadkach zachowane zostały kluczowe oddziaływania jonowe. Stabilność tak otrzymanych kompleksów wykazały symulacje MD. Pozwoliło to również na możliwe wyjaśnienie wysokiego powinowactwa KSK63. Mimo że otrzymane serie związków okazały się słabymi ligandami receptorów H<sub>3</sub> histaminowych, mogą stanowić cenne narzędzia farmakologiczne w poszukiwaniu nowych cząsteczek ukierunkowanych na choroby związane ze stresem oksydacyjnym.

#### 4.4.4. Receptor H<sub>4</sub> histaminowy

Receptor histaminowy H<sub>4</sub> od momentu jego odkrycia i identyfikacji w 2000 roku wyróżnia się jako ważny cel w poszukiwaniu potencjalnych nowych leków w leczeniu chorób zapalnych i alergicznych, takich jak katar, świąd i astma. Z najbliższym sąsiadem, H<sub>3</sub>R posiada tylko 35% homologii sekwencji [50–52]. H<sub>4</sub>R ulega preferencyjnej ekspresji w komórkach układu

odpornościowego, takich jak eozynofile, komórki dendrytyczne, komórki tuczne, monocyty, limfocyty, komórki NK i makrofagi. Najnowszy podtyp receptora histaminowego odgrywa istotną rolę w krytycznych procesach układu immunologicznego, wśród których należy wymienić chemotaksję eozynofilów, komórek tucznych i dendrytycznych pod wpływem histaminy, umożliwiając układowi immunologicznemu rekrutację komórek odpowiedzialnych za reakcje odpornościowe w odpowiednim miejscu [53]. Różne gatunkowe ortologi receptorów H<sub>4</sub>R histaminy wykazują różne właściwości farmakologiczne, a powinowactwo do histaminy i różnych innych ligandów różni się między gatunkami. Ponadto, analogicznie jak swój młodszy brat H<sub>3</sub>R, H<sub>4</sub>R wykazuje wysoką aktywność konstytutywną, co może mieć implikacje patofizjologiczne [54, 55].

Od czasu wczesnego odkrycia, ten nowy receptor przyciągnął uwagę zarówno przemysłu, jak i środowisk akademickich; zainteresowanie to znalazło odzwierciedlenie w ciągłym publikowaniu nowych, aktywnych ligandów receptorów H<sub>4</sub> histaminowych w ciągu ostatnich 20 lat. Pierwotnie skupiając się na analogach histaminy i innych pochodnych zawierających imidazol wzrosło zainteresowanie innymi rdzeniami heterocyklicznymi w grupach indoli, benzimidazolu i mono- lub wielocyklicznych pochodnych azyn.

### **Publikacja [H6]**

Dorota Łażewska; Enrique Dominguez-Alvarez; Katarzyna Kamińska; **Kamil J. Kuder**; Katarzyna Kieć-Kononowicz. Monocyclic and Fused Azines and Azoles as Histamine H<sub>4</sub> Receptor Ligands. *Current Medicinal Chemistry*, 2016 : Vol. 23, nr 18, s. 1870-1925.

Nieodłączną komponentą współczesnego projektowanie leków, jest wsparcie obliczeniowe w postaci szeregu metod CADD. Ze względu na (wciąż) brak rozwiązanej struktury krystalicznej, projektowanie potencjalnych ligandów receptorów H<sub>4</sub> histaminowych, opiera się o modele homologiczne. Dlatego też, w ramach publikacji przeglądowej [H6], dokonałem przeglądu literaturowego pod kątem modelowania H<sub>4</sub>R, jego ligandów i molekularnych determinant wiązania w ortosterycznej kieszeni wiążącej. Ze uwagi na fakt opublikowania dwóch prac przeglądowych autorstwa Zaid i wsp. oraz Correa & Fernandes [56, 57], które dokładnie obejmują rozległą dziedzinę modelowania homologicznego H<sub>4</sub>R do roku 2013, w pracy [H6] skupiłem się w głównej mierze na danych dostarczonych w latach 2013 – 2015. Z opisanych prac wyłaniały się następujące elementy strukturalne odpowiedzialne za aktywność H<sub>4</sub>R:

- a) za aktywnością konstytutywną receptora H<sub>4</sub> histaminowego postuluje się udział tzw. motywu FF - dwóch reszt fenyloalaninowych F168 i F169 (EL2), co jest w zgodzie z uznaną zależnością zmiany konformacji EL2 i aktywności konstytutywnej,
- b) jako główne punkty uchwytu H<sub>4</sub>R uznaje się (analogicznie jak w przypadku H<sub>3</sub>R) dwie reszty kwasowe: D94<sup>3,32</sup> i E182<sup>5,46</sup>, ligandy natomiast mogą układać się w dwie różne podkieszenie wiążące: pierwsza zlokalizowane pomiędzy W90<sup>3,28</sup>, E1634<sup>5,49</sup> i Y319<sup>6,51</sup>, druga pomiędzy Y319<sup>6,51</sup>, E182<sup>5,46</sup> i L175<sup>5,39</sup>,
- c) D94<sup>3,32</sup> bierze udział w wiązaniu zarówno nieposiadającego układu imidazolu modelowego antagonisty JNJ-7777120 jak i małej cząsteczki histaminy, E182<sup>5,46</sup> bierze udział w wiązaniu ligandów posiadających dwa ugrupowania zasadowe [58, 59]. Oba aminokwasy w stanie fizjologicznym posiadają ujemnie naładowane ugrupowania karboksylowe i pełnią rolę akceptorów protonów.

Wykonany przegląd literaturowy do publikacji [H6] pozwolił mi na przygotowanie i przeprowadzenie badań opisanych w publikacji [H7].

### Publikacja [H7]

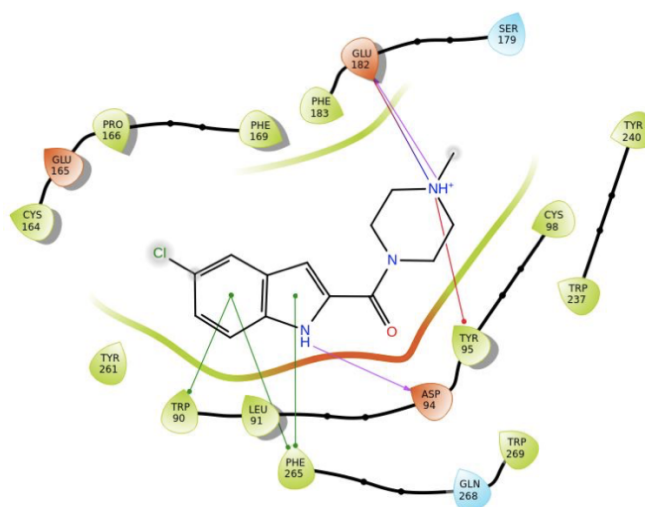
Dorota Łażewska; Szczepan Mogilski; Stefanie Hagenow; **Kamil J. Kuder**; **Monika** Głuch-Lutwin; Agata Siwek; Małgorzata Więcek; Maria Kaleta; Ulla Seibel; Armin Buschauer; Barbara Filipek; Holger Stark; Katarzyna Kieć-Kononowicz. Alkyl derivatives of 1,3,5-triazine as histamine H<sub>4</sub> receptor ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2019 : Vol. 27, nr 7, s. 1254-1262;

Informacje uzyskane podczas przygotowania pracy przeglądowej [H6], wraz z późniejszą publikacją dotyczącą przewidywania struktury trzeciorzędowej [57], pozwoliły mi na otrzymanie modelu homologicznego H<sub>4</sub>R i wykorzystanie go do badań, które opisałem w ramach publikacji [H7].

W pracy opisującej projektowanie, syntezę i ocenę biologiczną nowej grupy alkilo-1,3,5-triazyno-metylopiperazyn, skupiłem się na dokowaniu zaprojektowanych ligandów do modelu homologicznego zbudowanego przez magistranta – Mateusza Kozłowskiego w 2017 r. (pod moją opieką), z użyciem struktury krystalicznej receptora muskarynowego acetylocholino M<sub>2</sub> (PDB ID: 3UON) jako szablonu. Chociaż struktura krystaliczna receptora histaminowego H<sub>1</sub> (PDB ID: 3RZE) została już w tym czasie opublikowana, struktura 3UON została wybrana jako wzorzec ze względu na większą identyczność sekwencji i nieco wyższą rozdzielczość



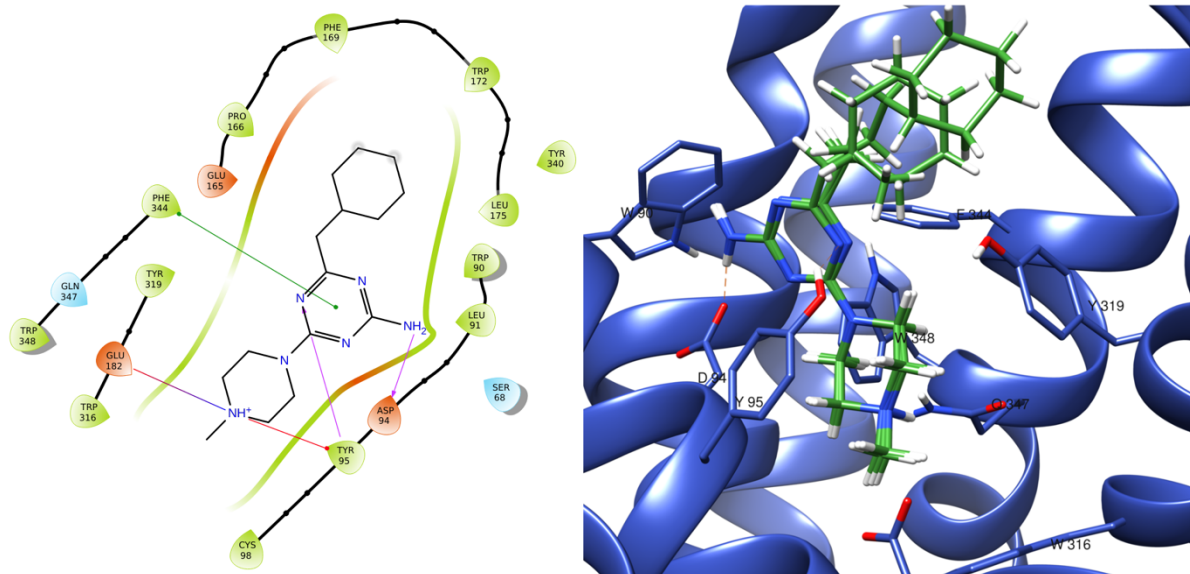
(odpowiednio 33% i 3Å oraz 26,34% i 3,1Å). Wygenerowany model, charakteryzował się relatywnie wysoką wartością AUC > 0.6 i zadowalającymi parametrami geometrycznymi. Jako ligand referencyjny, zgodnie z danymi literaturowymi, w kieszeni wiążącej zadokowałem flagowego antagonistę H<sub>4</sub>R, JNJ7777120, za pomocą protokołu wymuszonego dopasowania. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, ze względu na obecność dwóch ujemnie naładowanych reszt w kieszeni wiążącej H<sub>4</sub>R, ligand przyjmował dwie możliwe konfiguracje [60, 61]. Do dalszych badań, wybrana została konfiguracja przedstawiona na Rysunek 19 (również na podstawie danych literaturowych).



**Rysunek 19.** Schemat interakcji JNJ7777120 z resztami aminokwasowymi ortosterycznego miejsca wiążącego modelu homologicznego H<sub>4</sub>R.

Wszystkie pochodne triazynowe otrzymane w ramach publikacji [H7] zostały zadokowane do przygotowanego modelu zarówno w formach protonowanych, jak i nieprotonowanych pozycji 4-*N*-metylopiperazynej. Wszystkie dokowane związki charakteryzowały się stosunkowo wysokimi wartościami funkcji skorującej i wykazały opisane literaturowo interakcje z aminokwasami miejsca wiążącego H<sub>4</sub>R. Niezależnie natomiast od (cyklo)alkilowego podstawnika triazynowego w pozycji 4, ligandy układały się w jednej, pionowej do osi receptora orientacji, z (cyklo)alkilowymi podstawnikami skierowanymi w kierunku zewnątrzkomórkowym. Zaobserwowano tworzenie mostków solnych pomiędzy protonowaną pozycją 4 azotu piperazynej a E182<sup>5,46</sup>, natomiast pierwszorzędowa grupa aminowa tworzyła wiązanie wodorowe z D94<sup>3,32</sup>. Struktury były dodatkowo stabilizowane przez oddziaływania  $\pi$ -kationowe pomiędzy pierścieniem benzenowym Y95<sup>3,33</sup> a protonowanym azotem oraz oddziaływania  $\pi$ -stacking pomiędzy pierścieniem triazynowym a F344<sup>7,39</sup>. Przykładowy tryb wiązania dla związku **14** przedstawiono na Rysunek 20.





Rysunek 20. Schemat interakcji ligand-receptor dla związku 14 (publikacja [H7]).

Podsumowując, w ramach publikacji [H7] udało mi się określić molekularne determinanty wiązania dla nowych ligandów receptorów H<sub>4</sub> histaminowych wraz ze wstępną zależnością struktura-aktywność.

#### 4.5. Podsumowanie

Współczesne poszukiwanie leków to proces długotrwały, opierający się na interdyscyplinarnej współpracy wykorzystującej m.in.: metody biologiczne, chemiczne i obliczeniowe. Szczególny nacisk w ostatnich latach kładzie się zwłaszcza na te ostatnie, ze względu na niską, bliską zero inwazyjność w procesy życiowe organizmów i środowisko naturalne oraz praktycznie nieograniczone możliwości modelowania mikro- i makrocząsteczek, ich możliwych interakcji jak i całych procesów. W moich badaniach naukowych opisanych w powyższym cyklu publikacji, w głównej mierze skupiłem się na modelowaniu możliwych oddziaływań ligandów kilku wybranych celów biologicznych (receptory adenozynowe, histaminowe i receptor GPR18), mogących doprowadzić do znalezienia nowych, aktywnych i bezpiecznych struktur. W przypadku braku rozwiązanych struktur posiłkowałem się metodami modelowania homologicznego, pozwalającymi na ich przewidywanie z dużym stopniem prawdopodobieństwa.

Publikacja [H1] pozwoliła na identyfikację nowego, podwójnego liganda receptorów A<sub>2A</sub> adenozynowych i MAO-B, wraz z analizą zależności struktura-aktywność podpartą o badania dokowania molekularnego. Ze względu na mnogość podtypów receptorów adenozynowych, a w związku z tym możliwą nioselektywność struktur celowanych w tą grupę białek, w ramach

publikacji [H2], obok generowania wiarygodnej struktury homologicznej receptora A<sub>3</sub> adenylozynowego (poprawna predykcja aktywności dla 27 z 39 ligandów), zaproponowałem i opisałem metodę kwantyfikacji wydajności metod *in silico* w oparciu o tzw. metrykę miejską. Metoda „CBD” (*ang. city block distance*) może być z powodzeniem stosowana do oceny selektywności biblioteki ligandów.

Doświadczenie modelerskie zdobyte podczas wykonywania badań do powyższej publikacji wykorzystałem do otrzymania modelu homologicznego sierociego receptora GPR18. Biorąc pod uwagę jego postulowane zaangażowanie w procesach immunologicznych, neurodegeneracyjnych i nowotworowych i z drugiej strony jego aktywację przez coraz częściej stosowane endo- i egzogenne kanabinoidy, celowe jest poznanie jego struktury i możliwych oddziaływań na poziomie molekularnym. Na uwagę zasługuje fakt, że badania przeprowadzone przeze mnie i opisane w ramach publikacji [H3] były pierwszymi dotyczącymi próby określenia molekularnych determinant oddziaływań ligandów receptorów GPR18. Ze względu na bardzo dynamiczny rozwój metod przewidywania struktury jak i dostępnego oprogramowania obliczeniowego, na w kolejnym etapie (publikacja [H4]) dokonałem porównania dostępnych metod przewidywania struktury na przykładzie GPR18. Wykorzystując tylko darmowe i powszechnie dostępne oprogramowanie udało mi się nie tylko wybrać najbardziej prawdopodobny (i funkcjonalny) model receptora GPR18, ale także opisać możliwy schemat oddziaływania antagonistów z aminokwasami ortosterycznego miejsca wiążącego GPR18 na podstawie reprezentatywnej grupy ligandów. Otrzymane wyniki posłużą jako punkt wyjściowy do projektowania nowych, aktywnych ligandów w kierunku tego wciąż nie do końca poznanego celu biologicznego.

Wpisując się w nurt łączenia w jednej cząsteczce wielu właściwości działania, zapoczątkowany w ramach badań nad ligandami receptorów adenylozynowych, w ramach publikacji [H5] udało mi się zaprojektować, otrzymać fizycznie i przeprowadzić modelowanie ligandów o podwójnym działaniu neuroprotektynym: pośrednio poprzez antagonizm receptorów H<sub>3</sub> histaminowych i bezpośrednio, wykazując działanie przeciwoksydacyjne. Obok Contilisantu i ASS234, otrzymane ligandy o umiarkowanym powinowactwie do H<sub>3</sub>R są jednymi z niewielu ligandów histaminowych H<sub>3</sub>R o opisanych właściwościach antyoksydacyjnych. Przeprowadzone badania obliczeniowe pozwoliły natomiast na możliwe wyjaśnienie wysokiego powinowactwa ligandu odniesienia – KSK63 i odpowiednio niższego dla serii badanych struktur. Pozostając w obszarze receptorów histaminowych, w ramach kolejnych publikacji wchodzących w skład niniejszego cyklu ([H6] i [H7]) dokonałem odpowiednio

przeglądu literatury dotyczącej modelowania receptorów H<sub>4</sub> histaminowych, a następnie otrzymałem funkcjonalny model, który wykorzystałem do poznania i opisanie oddziaływań nowo otrzymanych ligandów H<sub>4</sub>R.

Podsumowując, wszystkie cele naukowe zaplanowane w ramach prezentowanego dzieła habilitacyjnego zostały osiągnięte z wykorzystaniem najnowszych metod poszukiwania leków. Mam nadzieję, że rezultaty uzyskane w ramach przeprowadzonych przeze mnie badań przyczynią się do znalezienia nowych, bardziej skutecznych substancji leczniczych i narzędzi farmakologicznych.

#### 4.6. Bibliografia

1. Katritch V, Cherezov V, Stevens RC (2013) Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53:531–556. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>
2. Isberg V, Mordalski S, Munk C, Rataj K, Harpsøe K, Hauser AS, Vroiling B, Bojarski AJ, Vriend G, Gloriam DE (2016) GPCRdb: An information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res* 44: D1, D356–D364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1178>
3. Wouters OJ, McKee M, Luyten J (2020) Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA* 323:844–853. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.1166>
4. Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD (2015) Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* 20:13384–13421. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES200713384>
5. Kooistra AJ, Mordalski S, Pándy-Szekeres G, Esguerra M, Mamyrbekov A, Munk C, Keserű GM, Gloriam DE (2021) GPCRdb in 2021: Integrating GPCR sequence, structure and function. *Nucleic Acids Res* 49:D335–D343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1080>
6. Pándy-Szekeres G, Esguerra M, Hauser AS, Caroli J, Munk C, Pilger S, Keserű GM, Kooistra AJ, Gloriam DE (2022) The G protein database, GproteinDb. *Nucleic Acids Res* 50:D518–D525. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB852>
7. Jacobson KA, Costanzi S (2012) New Insights for Drug Design from the X-Ray Crystallographic Structures of G-Protein-Coupled Receptors. *Mol. Pharmacol.* 82(3):361-71 <https://doi.org/10.1124/mol.112.079335>
8. Jacobson KA, Müller CE (2016) Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. *Neuropharmacology*, 104:31-49 <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.12.001>
9. Stockwell J, Jakova E, Cayabyab FS, Ciruela F, Sotelo E (2017) Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. *Molecules* 22(4), 676 <https://doi.org/10.3390/molecules22040676>
10. Załuski M, Stanuch K, Karcz T, Hinz S, Latacz G, Szymańska E, Schabikowski J, Doróż-Płonka A, Handzlik J, Drabczyńska A, Müller CE, Kieć-Kononowicz K (2018) Tricyclic xanthine derivatives containing a basic substituent: adenosine receptor affinity and drug-related properties. *Medchemcomm* 9:951–962. <https://doi.org/10.1039/C8MD00070K>
11. Załuski M, Schabikowski J, Schlenk M, Olejarz-Maciej A, Kubas B, Karcz T, Kuder K, Latacz G, Zygmunt M, Synak D, Hinz S, Müller CE, Kieć-Kononowicz K (2019) Novel multi-target directed ligands based on annelated xanthine scaffold with aromatic substituents acting on adenosine receptor and monoamine oxidase B. *Synthesis, in vitro and in silico studies*. *Bioorganic Med Chem* 27(7) 1195-1210 <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.02.004>
12. Plewczynski D, Łaźniewski M, Augustyniak R, Ginalski K (2011) Can we trust docking results? Evaluation of seven commonly used programs on PDBbind database. *J Comput Chem* 32:742–755. <https://doi.org/10.1002/jcc.21643>
13. Kolb P, Phan K, Gao Z-G, Marko AC, Sali A, Jacobson (2012) Limits of Ligand Selectivity from Docking to Models: In Silico Screening for A1 Adenosine Receptor Antagonists. *PLoS One* 7:e49910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049910>
14. Glukhova A, Thal DM, Nguyen AT, Vecchio EA, Jörg M, Scammells PJ, May LT, Sexton PM, Christopoulos A

- (2017) Structure of the Adenosine A1 Receptor Reveals the Basis for Subtype Selectivity. *Cell* 168:867-877.e13. <https://doi.org/10.1016/j.CELL.2017.01.042>
15. Cheng RKY, Segala E, Robertson N, Deflorian F, Doré AS, Errey JC, Fiez-Vandal C, Marshall FH, Cooke RM (2017) Structures of Human A1 and A2A Adenosine Receptors with Xanthines Reveal Determinants of Selectivity. *Structure* 25:1275-1285.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.06.012>
  16. Dunbrack RL (2002) Rotamer libraries in the 21st century. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12(4), 431-440 [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(02\)00344-5](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(02)00344-5)
  17. Krause EF (1986) *Taxicab geometry : an adventure in non-Euclidean geometry.* Dover Publications
  18. Rajkumar P, Pluznick JL (2017) Unsung renal receptors: orphan G-protein-coupled receptors play essential roles in renal development and homeostasis. *Acta Physiol* 220:189–200. <https://doi.org/10.1111/apha.12813>
  19. Kohno M, Hasegawa H, Inoue A, Muraoka M, Miyazaki T, Oka K, Yasukawa M (2006) Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. *Biochem Biophys Res Commun* 347:827–832. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.175>
  20. Mchugh D, Hu SS, Rimmerman N, Juknat A, Vogel Z, Walker JM, Bradshaw HB (2010) N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci* 11:44 <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-44>
  21. Bradshaw HB, Rimmerman N, Hu SJ, Benton VM, Stuart JM, Masuda K, Cravatt BF, O'Dell DK, Walker JM (2009) The endocannabinoid anandamide is a precursor for the signaling lipid N-arachidonoyl glycine by two distinct pathways. *BMC Biochem* 10:14. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-10-14>
  22. Alexander SPH, Battey J, Benson HE, Benya R V, Bonner TI, Davenport AP, Dhanachandra Singh K, Eguchi S, Harmar A, Holliday N, Jensen RT, Karnik S, Kostenis E, Liew WC, Monaghan AE, Mpanhanga C, Neubig R, Pawson AJ, Pin J-P, Sharman JL, Spedding M, Spindel E, Stoddart L, Storzjohann L, Thomas WG, Tirupula K, Vanderheyden P (2020) Class A Orphans (version 2020.5) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHAR/BPS Guid to Pharmacol CITE 2020:. <https://doi.org/10.2218/gtopdb/fl6/2020.5>
  23. Finlay DB, Joseph WR, Grimsey NL, Glass M (2016) GPR18 undergoes a high degree of constitutive trafficking but is unresponsive to N-Arachidonoyl Glycine. *PeerJ* 4:e1835 <https://doi.org/10.7717/peerj.1835>
  24. Rajaraman G, Simcocks A, Hryciw DH, Hutchinson DS, McAinch AJ (2016) G protein coupled receptor 18: A potential role for endocannabinoid signaling in metabolic dysfunction. *Mol Nutr Food Res* 60:92–102. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500449>
  25. Laprairie RB, Bagher AM, Denovan-Wright EM (2017) Cannabinoid receptor ligand bias: implications in the central nervous system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 32:32-43 <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.10.005>
  26. Morales P, Lago-Fernandez A, Hurst DP, Sotudeh N, Brailoiu E, Reggio PH, Abood ME, Jagerovic N (2020) Therapeutic Exploitation of GPR18: Beyond the Cannabinoids? *J Med Chem* 63:14216–14227. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00926>
  27. Zhang D, Gao ZG, Zhang K, Kiselev E, Crane S, Wang J, Paoletta S, Yi C, Ma L, Zhang W, Han GW, Liu H, Cherezov V, Katritch V, Jiang H, Stevens RC, Jacobson KA, Zhao Q, Wu B (2015) Two disparate ligand-binding sites in the human P2Y1 receptor. *Nature* 520:317–321. <https://doi.org/10.1038/NATURE14287>
  28. Heo L, Shin W-H, Lee MS, Seok C (2014) GalaxySite: ligand-binding-site prediction by using molecular docking. *Nucleic Acids Res* 42(W1) W210–W214. <https://doi.org/10.1093/nar/gku321>
  29. Schmeisser Marianne (2013) Creation of a GPR18 Homology Model using Conformational Memories. PhD Proposition, The University of North Carolina at Greensboro (UNCG )
  30. Neumann A, Engel V, Mahardhika AB, Schoeder CT, Namasivayam V, Kieć-Kononowicz K, Müller CE (2020) Computational investigations on the binding mode of ligands for the cannabinoid-activated g protein-coupled receptor GPR18. *Biomolecules* 10(5), 686. <https://doi.org/10.3390/biom10050686>
  31. Miller BT, Singh RP, Klauda JB, Hodošček M, Brooks BR, Lee H, Iii W CHARMMing: A New, Flexible Web Portal for CHARMM. *J. Chem. Inf. Model* 48, 9, 1920–1929 <https://doi.org/10.1021/ci800133b>
  32. Sotudeh N, Morales P, Hurst DP, Lynch DL, Reggio PH (2019) Towards a molecular understanding of the cannabinoid related orphan receptor gpr18: A focus on its constitutive activity. *Int J Mol Sci* 20(9), 2300 <https://doi.org/10.3390/ijms20092300>
  33. Lupas AN, Pereira J, Alva V, Merino F, Coles M, Hartmann MD (2021) The breakthrough in protein structure prediction. *Biochem J* 478:1885–1890. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200963>
  34. Heo L, Feig M (2022) Multi-State Modeling of G-protein Coupled Receptors at Experimental Accuracy. *Proteins*

- 90(11) 1873-1885. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2021.11.26.470086>
35. Bhattacharya D, Nowotny J, Cao R, Cheng J (2016) 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. *Nucleic Acids Res* 44:W406--W409. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw336>
  36. Shuvo MH, Gulfam M, Bhattacharya D (2021) DeepRefiner: high-accuracy protein structure refinement by deep network calibration. *Nucleic Acids Res* 49:W147--W152. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab361>
  37. Kumar P, Bansal M (2015) Dissecting  $\pi$ -helices: Sequence, structure and function. *FEBS J* 282:4415–4432. <https://doi.org/10.1111/febs.13507>
  38. van der Kant R, Vriend G (2014) Alpha-bulges in G protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci* 15:7841–7864. <https://doi.org/10.3390/ijms15057841>
  39. Jendele L, Krivak R, Skoda P, Novotny M, Hoksza D (2019) PrankWeb: a web server for ligand binding site prediction and visualization. *Nucleic Acids Res* 47:W345--W349. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ424>
  40. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC (1983) Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature*. 302, pages832–837 <https://doi.org/10.1038/302832a0>
  41. Sadek B, Saad A, Sadeq A, Jalal F, Stark H (2016) Histamine H3 receptor as a potential target for cognitive symptoms in neuropsychiatric diseases. *Behav. Brain Res.* 312, 415-430 <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.051>
  42. Łażewska D, Kieć-Kononowicz K (2018) Progress in the development of histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists: a patent review (2013-2017). *Expert Opin. Ther. Pat.* 3, 175-196 <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1424135>
  43. Syed YY (2016) Pitolisant: First Global Approval. *Drugs* 76:1313–1318. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0620-1>
  44. Szczepańska K, Karcz T, Mogilski S, Siwek A, Kuder KJ, Latacz G, Kubacka M, Hagenow S, Lubelska A, Olejarz A, Kotańska M, Sadek B, Stark H, Kieć-Kononowicz K (2018) Synthesis and biological activity of novel tert-butyl and tert-pentylphenoxyalkyl piperazine derivatives as histamine H3R ligands. *Eur J Med Chem.* 152, 223-234 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.043>
  45. Szczepańska K, Karcz T, Kotańska M, Siwek A, Kuder KJ, Latacz G, Mogilski S, Hagenow S, Lubelska A, Sobolewski M, Stark H, Kieć-Kononowicz K (2018) Optimization and preclinical evaluation of novel histamine H3 receptor ligands: Acetyl and propionyl phenoxyalkyl piperazine derivatives. *Bioorganic Med Chem.* 26, 6056-6066 <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.11.010>
  46. Szczepańska K, Karcz T, Siwek A, Kuder KJ, Latacz G, Bednarski M, Szafarz M, Hagenow S, Lubelska A, Olejarz-Maciej A, Sobolewski M, Mika K, Kotańska M, Stark H, Kieć-Kononowicz K (2019) Structural modifications and in vitro pharmacological evaluation of 4-pyridyl-piperazine derivatives as an active and selective histamine H3 receptor ligands. *Bioorg Chem* 91: 103071 <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103071>
  47. Szczepanska K, Kuder K, Kiec-Kononowicz K (2017) Histamine H3 receptor ligands in the group of (homo)piperazine derivatives. *Curr Med Chem.* 25, 1609 - 1626 <https://doi.org/10.2174/0929867325666171123203550>
  48. Bautista-Aguilera ÓM, Hagenow S, Palomino-Antolin A, Farré-Alins V, Ismaili L, Joffrin PL, Jimeno ML, Soukup O, Janočková J, Kalinowsky L, Proschak E, Iriepa I, Moraleda I, Schwed JS, Romero Martínez A, López-Muñoz F, Chioua M, Egea J, Ramsay RR, Marco-Contelles J, Stark H (2017) Multitarget-Directed Ligands Combining Cholinesterase and Monoamine Oxidase Inhibition with Histamine H3R Antagonism for Neurodegenerative Diseases. *Angew Chemie - Int Ed* 56: 12765-12769 <https://doi.org/10.1002/anie.201706072>
  49. Bautista-Aguilera ÓM, Budni J, Mina F, Medeiros EB, Deuther-Conrad W, Entrena JM, Moraleda I, Iriepa I, López-Muñoz F, Marco-Contelles J (2018) Contilisant, a Tetratarget Small Molecule for Alzheimer's Disease Therapy Combining Cholinesterase, Monoamine Oxidase Inhibition, and H3R Antagonism with S1R Agonism Profile. *J Med Chem* 61, 6937–6943 <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00848>
  50. Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto SI (2000) Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 275:36781–36786. <https://doi.org/10.1074/JBC.M006480200>
  51. Liu C, Ma XJ, Jiang X, Wilson SJ, Hofstra CL, Blevitt J, Pyati J, Li X, Chai W, Carruthers N, Lovenberg TW (2001) Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol* 59:420–426. <https://doi.org/10.1124/MOL.59.3.420>
  52. Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF (2001) Discovery of a Novel Member of the Histamine Receptor Family. *Mol Pharmacol* 59:427–433. <https://doi.org/10.1124/MOL.59.3.427>



53. Marson CM (2011) Targeting the histamine H<sub>4</sub> receptor. *Chem Rev* 111:7121–7156. [https://doi.org/10.1021/CR900166W/ASSET/CR900166W.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/CR900166W/ASSET/CR900166W.FP.PNG_V03)
54. Schneider EH, Schnell D, Papa D, Seifert R (2009) High constitutive activity and a G-protein-independent high-affinity state of the human histamine H<sub>4</sub>-receptor. *Biochemistry* 48:1424–1438. [https://doi.org/10.1021/BI802050D/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BI-2008-02050D\\_0009.GIF](https://doi.org/10.1021/BI802050D/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BI-2008-02050D_0009.GIF)
55. Seifert R, Wenzel-Seifert K (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366:381–416. <https://doi.org/10.1007/S00210-002-0588-0>
56. Zaid H, Ismael-Shanak S, Michaeli A, Rayan A (2012) Computerized modeling techniques predict the 3D structure of H<sub>4</sub>R: Facts and fiction. *Front Biosci* 17:232–247. <https://doi.org/10.2741/3924/PDF>
57. Corrêa MF, Fernandes JPDS (2015) Histamine H<sub>4</sub> Receptor Ligands: Future Applications and State of Art. *Chem Biol Drug Des* 85:461–480. <https://doi.org/10.1111/CBDD.12431>
58. Schultes S, Nijmeijer S, Engelhardt H, Kooistra AJ, Vischer HF, De Esch IJP, Haaksma EEJ, Leurs R, De Graaf C (2012) Mapping histamine H<sub>4</sub> receptor–ligand binding modes. *Medchemcomm* 4:193–204. <https://doi.org/10.1039/C2MD20212C>
59. Kooistra AJ, Kuhne S, De Esch IJP, Leurs R, De Graaf C (2013) A structural chemogenomics analysis of aminergic GPCRs: lessons for histamine receptor ligand design. *Br J Pharmacol* 170:101–126. <https://doi.org/10.1111/BPH.12248>
60. Zaid H, Raiyn J, Osman M, Falah M, Srouji S, Rayan A (2016) In silico modeling techniques for predicting the tertiary structure of human H<sub>4</sub> receptor. *Front Biosci (Landmark Ed)* 21:597–619. <https://doi.org/10.2741/4409>
61. Feng Z, Hou T, Li Y (2013) Docking and MD study of histamine H<sub>4</sub>R based on the crystal structure of [H<sub>1</sub>]R. *J Mol Graph Model* 39:1–12. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2012.10.003>
62. Ballesteros JA, Weinstein H (1995) [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci* 25:366–428. [https://doi.org/10.1016/S1043-9471\(05\)80049-7](https://doi.org/10.1016/S1043-9471(05)80049-7)

## **5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.**

### **5.1. Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora**

W 1999 r. rozpocząłem studia na Uniwersytecie Jagiellońskim, Collegium Medicum, kierunek Farmacja. W czasie trwania studiów przez dwie kadencje byłem członkiem Wydziałowej Rady Samorządu Studenckiego.

Badania do pracy magisterskiej, skupiające się na syntezie chemicznej nowych ligandów receptorów H<sub>3</sub> histaminowych w grupie pochodnych eterowych wykonałem w grupie badawczej Prof. Holgera Starka, Johann Wolfgang Goethe Universität we Frankfurcie nad Menem, w ramach programu SOCRATES/Erasmus. Pracę magisterską pt: „Poszukiwanie nieimidazolowych antagonistów receptorów H<sub>3</sub> histaminowych” obroniłem w 2005 r. w Krakowie, tytuł magistra farmacji otrzymałem w 2006 r., po odbyciu półrocznego stażu w aptece otwartej. Wyniki badań pracy magisterskiej zaprezentowałem w postaci posteru na Konferencji Polskiego Towarzystwa Badań nad Histaminą w Łodzi w 2004 r.



Już w trakcie stażu zawodowego kontynuowałem na zasadzie wolontariatu w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJCM badania rozpoczęte w czasie wykonywania pracy magisterskiej. Podjęte badania skupiały się na otrzymywaniu pochodnych zawierających w części zasadowej ligandów ugrupowanie piperydynowe, bądź podstawione ugrupowanie piperazynowe. W latach 2005-2008 byłem zatrudniony na stanowisku asystenta w ww. Jednostce Badawczej, jednocześnie od października 2005 r. byłem uczestnikiem studiów doktoranckich na Wydziale Farmaceutycznym UJCM. W ramach badań do rozprawy doktorskiej zajmowałem się projektowaniem i syntezą ligandów o spodziewanej aktywności w kierunku receptorów H<sub>3</sub> i H<sub>4</sub> histaminowych. Prace syntetyczne wykonywałem zarówno metodą klasyczną, jak i z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego. Tożsamość wszystkich nowo otrzymanych połączeń potwierdzałem w oparciu o analizy spektralne <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR.

W lipcu 2005 r. przeszedłem jednodniowe szkolenie w grupie prof. Dariusza Matosiuka na Uniwersytecie Medycznym w Lublinie z zakresu chromatografii planarnej. Zdobyta wiedza i umiejętności pozwoliły mi na poszerzenie zakresu swoich badań nad nowo otrzymanymi połączeniami. Wykorzystując metodę chromatografii planarnej na odwróconych fazach, wykonałem oznaczenie lipofilowości (wyrażoną parametrem logP) dla serii otrzymanych połączeń. Otrzymane w ten sposób wyniki porównywałem również z wynikami otrzymanymi na drodze obliczeń teoretycznych z zastosowaniem odpowiedniego oprogramowania komputerowego.

W lipcu 2007 r. w ramach współpracy międzynarodowej odbyłem miesięczny staż naukowy w grupie badawczej Prof. Starka w Uniwersytecie im. J.W. Goethego we Frankfurcie nad Menem. Podczas trwania stażu zapoznałem się z metodami otrzymywania i oczyszczania ligandów znakowanych fluorescencyjnie, co zaowocowało otrzymaniem pochodnej o zarówno: bardzo wysokiej aktywności w stosunku do H<sub>3</sub>R ( $K_i = 0.11$  nM) jak i bardzo dobrych parametrów fluorescencyjnych. Parametry te, wraz z widmami wzbudzeni i absorpcji oznaczałem pod kierunkiem dr Pawła Uznańskiego w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, podczas dwudniowego szkolenia z zakresu obsługi spektrofluorymetru Horiba JobinYvon. Dodatkowo, moje zainteresowanie ligandami fluorescencyjnymi receptorów sprzężonych z białkiem G zaowocowało publikacją dwóch prac przeglądowych w 2008 i 2014 r. w *Current Medicinal Chemistry* (publikacje [P2] i [P10]).

Poszukując nowych kierunków badań, które mogłyby wzbogacić otrzymane dotychczas wyniki, jak również poszerzyć zdobywane umiejętności, zwróciłem uwagę na fakt coraz

większego znaczenia i wykorzystania metod *in silico* w projektowaniu nowych struktur, jak i szeroko pojętej chemii medycznej. Celem poznania potencjalnych oddziaływań serii otrzymanych ligandów z zaplanowanym celem biologicznym, przeprowadziłem ich dokowanie do modelu homologicznego receptora H<sub>3</sub>R otrzymanego od dr Nicolasa Levoina z Bioprojet-Biotech we Francji. Analiza wyników dokowania pozwoliła na opisanie zależności pomiędzy aktywnością a zaobserwowanymi oddziaływaniami ligand-receptor. Umiejętności zdobyte podczas tych wstępnych badań stanowiły jedną z podstaw mojej dalszej pracy badawczej.

Przewód doktorski decyzją Rady Wydziału Farmaceutycznego został otwarty w 2008 r. Rozprawę doktorską o temacie: „Poszukiwanie nieimidazolowych ligandów receptorów H<sub>3</sub> i H<sub>4</sub> histaminowych” obroniłem w grudniu 2011 r. Część badań wchodzących w skład Rozprawy Doktorskiej wykonywałem w ramach otrzymanego w 2009 Grantu Promotorskiego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Dodatkowo w czerwcu 2009 otrzymałem Małopolskie Stypendium Doktorantów, ufundowane przez Zintegrowany Program Operacyjny Rozwoju Regionalnego. Wyniki badań zostały opublikowane w postaci dwóch publikacji w *Bioorganic and Medicinal Chemistry* ([P1, P3]) i dwóch komunikatów zjazdowych w *Inflammatory Research* ([P4, P5]). Dodatkowo otrzymane wyniki prezentowałem w postaci 12 posterów i 7 komunikatów ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych [K1-K19], w tym czterech corocznych konferencjach Europejskiego Towarzystwa Badań nad Histaminą, trzykrotnie otrzymując stypendium dojazdowe ufundowane przez koncerny farmaceutyczne na ww. konferencje.

### 5.2. Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora

W latach 2011 - 2014 byłem zatrudniony na stanowisku asystenta, a od Grudnia 2014 na stanowisku adiunkta w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych. Rozwijając swoje zainteresowanie metodami obliczeniowymi w projektowaniu leków, w tym czasie dwukrotnie uczestniczyłem w tygodniowych szkoleniach z zakresu bioinformatyki i modelowania cząsteczkowego w Insbrucku (2012 r.) i Wiedniu (2013 r.). Udział w tych szkoleniach pozwolił mi na poszerzenie wiedzy praktycznej, którą wykorzystuję w prowadzonych przeze mnie badaniach naukowych. Kontynuując badania zaczęte w ramach studiów doktoranckich otrzymałem modele homologiczne receptorów H<sub>3</sub> i H<sub>4</sub> histaminowych, jak również przeprowadziłem dokowanie kilku serii ligandów dla tych receptorów. Wyniki tych badań zostały opublikowane w ramach prac [P7, P11–P15, P18].

W lutym 2015 r. odbyłem miesięczny staż naukowy w ramach akcji COST Glisten (CM1207), w grupie badawczej Prof. Petera Kolba na Uniwersytecie Phillipsa w Marburgu. Przedmiotem

stażu było modelowanie homologiczne receptora A<sub>3</sub> adenozyнового (wraz ze szkoleniem z obsługi pakietu obliczeniowego OEDocking) i opracowanie nowatorskiej metody szacowania przełożenia liczbowego wyników otrzymanych metodą dokowania na rzeczywiste wartości powinowactwa ligandów do zadanych celów biologicznych. Wyniki tych badań są przedmiotem publikacji [H2]. Doświadczenie zdobyte podczas w/w stażu i konferencji pozwoliło mi również na udoskonalenie swojego warsztatu badawczego, czego efektem było otrzymanie modelu homologicznego receptora sierociego GPR18. Przeprowadzone badania były podstawą publikacji [H3].

W maju 2015 uczestniczyłem w konferencji naukowo szkoleniowej z pakietu oprogramowania MOE w Londynie. Doświadczenie zdobyte podczas w/w stażu i konferencji pozwoliło mi na udoskonalenie swojego warsztatu badawczego, i przeprowadzenie pierwszych badań symulacji dynamiki molekularnej (MD) dla serii ligandów receptorów adenozyновых [H1]. Symulacje MD wykonywałem konsekwentnie we wszystkich prowadzonych przeze mnie badaniach obliczeniowych, jako potwierdzenia stabilności przewidywanych pól wiązania i ew. poznawanie zależności strukturalnych modelowanych białek [H4].

Wraz z biegiem czasu rozszerzałem swoje zainteresowania badawcze, z receptorów histaminowych na liczną rodzinę receptorów adenozyновых i tzw. receptorów sierocych. Wraz z prowadzonymi badaniami, w ujęciu leków wielocelowych (and. Multi-target directed ligands), do prowadzone przez siebie badań stopniowo włączałem również cele enzymatyczne (np. MOA-A, MAO-B, AChE, BuCHE). Prowadzone przeze mnie badania obliczeniowe były częścią czterech realizowanych w Jednostce grantów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, jak również w ramach dofinansowania na rzecz Działalności Statutowej Uczelni i zostały opublikowane w publikacjach [P25-P31].

Równoległe z badaniami z zastosowaniem metod obliczeniowych, do roku 2018 prowadziłem badania syntetyczne nad pochodnymi ligandów receptorów H<sub>3</sub> histaminowych w grupie pochodnych eterowych 4N-podstawionej piperazyny. Badania te realizowane były we współpracy z Katedrą Farmakodynamiki UJCM, w ramach projektu „Analiza i ocena skuteczności działania anorektycznego oraz bezpieczeństwa nowych ligandów receptora H<sub>3</sub> histaminowego”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS 12. Rezultatem tych badań była publikacja [H5] i szereg publikacji nie wchodzących w skład prezentowanego cyklu: [P19-P24].

Łącznie jestem (współ)autorem 42 publikacji naukowych, w tym 7 wchodzących w skład niniejszego osiągnięcia naukowego i 3 publikacji w czasopismach popularno-naukowych (*Po Pierwsze Człowiek*, 2006 nr 43 i 44; *Moda na Zdrowie* 2010 nr 12). W oparciu o zdobytą wiedzę i doświadczenie, we wrześniu 2022 roku przygotowałam i złożyłam również do redakcji rozdział zatytułowany: "Docking foundations: from rigid to flexible docking" do książki "Protein-Protein Docking: Methods and Protocols" (Springer Nature, redaktor: Agnieszka Kaczor).

### 5.3. Otrzymane stypendia i nagrody za osiągnięcia naukowe

**11.2021** - Zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za osiągnięcia naukowe – III stopnia

**05.2015** - Nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, za osiągnięcia naukowe w roku 2014

**10.2012** - Nagroda grupowa Ministra Zdrowia za cykl 7 publikacji dotyczących badań nad receptorami H3 histaminowymi jako atrakcyjnym celem terapeutycznym.

**06.2009** - Małopolskie Stypendium Doktorantów, ufundowane przez Zintegrowany Program Operacyjny Rozwoju Regionalnego

**2007 - 2010** Granty podróżne na Konferencje Europejskiego Towarzystwa Badań nad Histaminą (EHRS Annual Meeting) – fundator: JOHNSON & JOHNSON / ROCHE

## 6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

### 6.1. Działalność dydaktyczna

Jako nauczyciel akademicki w ramach działalności dydaktycznej prowadzę od roku akademickiego 2007/08 do chwili obecnej zajęcia praktyczne, a od 2011/12 również seminaria w ramach przedmiotu *Synteza i Technologia Środków Leczniczych*, dla osób studiujących IV roku Wydziału Farmaceutycznego, Collegium Medicum UJ. Wraz z rozwojem zainteresowania metodami obliczeniowymi w projektowaniu leków, od 2014 współprowadziłem (i przygotowałem program), a od 2019 roku samodzielnie prowadzę fakultet *Metody Komputerowe w Racjonalnym Projektowaniu Leków*. Osoby studiujące zainteresowane tą tematyką wykonują w ramach *Studenckiego Koła Naukowego "Metody Komputerowe w poszukiwaniu substancji leczniczych"* od roku akademickiego 2017/18 swoje małe projekty naukowe, które kilkakrotnie były częścią prac magisterskich lub doniesień zjazdowych. Dodatkowo w roku akademickim 2019/20 prowadziłem dla osób studiujących IV roku

seminarium z narzędzi bioinformatycznych w ramach przedmiotu *Biotechnologia Farmaceutyczna*.

W roku akademickim 2017/18 współprzygotowałem fakultet dla osób studiujących najpierw na kierunku Kosmetologia: *Tatuaż ozdobny z punktu widzenia kosmetologa*, od cyklu 2019/20 przedmiot ten współprowadzę na kierunku Farmacja pod odpowiednio zmienioną nazwą.

Wraz z otwarciem na Wydziale Farmaceutycznym UJCM podyplomowych studiów w języku angielskim: Drug Discovery and Development, zaangażowałem się w przygotowanie i prowadzenie zajęć: w roku 2018/19 przygotowałem i prowadziłem cykl wykładów i seminariów z anatomii i fizjologii człowieka w ramach przedmiotu *Biology in pharmaceutical sciences*. Od roku 2019/20 do chwili obecnej prowadzę przygotowany przeze mnie cykl zajęć *Model Informed drug development* i współprowadzę cykl *Principles in Medicinal Chemistry*.

### 6.2. Prace magisterskie

Od 2012 roku byłem opiekunem 6 prac magisterskich, współopiekunem 2 i recenzentem 6:

1. *Komputerowo wspomagane poszukiwanie wielocelowych ligandów receptorów H3 histaminowych*. Angelika Łukasik 2022 (opiekun)
2. *Modelowanie homologiczne receptora GPR18*, Ilona Michalik, 2021 (opiekun)
3. *Przewidywanie struktury receptora histaminowego H3 metodami obliczeniowymi*, Michał Sobolewski, 2018 (opiekun)
4. *Modelowanie homologiczne receptora H3 histaminowego*, Piotr Wilkoński vel Wilkęski, 2017 (opiekun)
5. *Synteza tiokarbonylowych analogów antagonistów receptorów H4 histaminowych*, Mateusz Kozłowski, 2017 (współopiekun)
6. *Synteza potencjalnych ligandów receptorów H3 histaminowych*, Wojciech Ślusarczyk, 2016 (opiekun)
7. *Poszukiwanie nowych ligandów receptorów H3 histaminowych w grupie pochodnych t-butylo- i t-pentylofenolu*, Kalina Kacprzyk, 2014 (opiekun)
8. *Poszukiwanie nowych ligandów receptorów H3 histaminowych w grupie pochodnych (cyklo)aliflofenonów*, Katarzyna Szczepańska, 2014 (współopiekun)

### 6.3. Praca doktorska

Od 2016 roku pełniłem funkcję opiekuna pomocniczego przewodu doktorskiego Dr Katarzyny Szczepańskiej. Badania doktorantka wykonywała pod moją opieką od 2014 r. kiedy to pełniłem rolę współopiekuna pracy mgr. Praca doktorska „*The search for novel histamine H<sub>3</sub> receptor ligands in the group of piperazine derivatives*” została obroniona z wyróżnieniem (w języku angielskim) 8.06.2020.

#### **6.4. Opieka nad studentami**

W latach 2011-2022 byłem również opiekunem programów badawczych: trzymiesięcznych (ERASMUS) dwóch osób studiujących z Niemiec (2015 i 2019) i jednomiesięcznych (SEP) czterech osób studiujących (2012, 2014, 2016 i 2022). W ramach pobytów naukowych osoby studiujące wykonywały krótkie projekty z zakresu syntezy, oznaczania właściwości lipofilowych i modelowania molekularnego ligandów GPCR.

#### **7. Pozostałe informacje**

##### **7.1. Konferencje naukowe**

Wyniki swoich badań naukowych przedstawiałem również w postaci 49 doniesień konferencyjnych, w tym 36 jako autor główny, a w 13 jako współautor.

##### **7.2. Wyjazdy naukowe**

**1-28.02.2015** Philipps Universität Marburg, Fb. 16 - Pharmazie, AG Kolb, Marburg, Niemcy  
COST Action CM1207: GLISTEN – badania w ramach Short Term Scientific Mission: "In Silico screening to determine the subtype selectivity of Adenosine receptor ligands."

**1-31.07.2007** Department of Pharmaceutical Chemistry, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, Niemcy - poszukiwanie fluorescencyjnych ligandów receptorów H3 histaminowych

**03.2004 - 06.2004** Department of Pharmaceutical Chemistry, Johan Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, Niemcy Socrates/Erasmus Program – wykonywanie badań praktycznych w ramach Pracy Magisterskiej

##### **7.3. Szkolenia**

**14-15.02.2022** – Szkolenie z Języka R (12h); ZintegrUJ

**8.09.2021** - Skuteczna komunikacja wizualna (7h); ZintegrUJ

**30-31.08.2021** - Warsztaty dla kadry dydaktycznej w zakresie przeciwdziałania dyskryminacji (14h); ZintegrUJ

**12,14,16.07.2021** - Przygotowywanie interaktywnych materiałów edukacyjnych i weryfikacja przyswajania informacji (9h); ZintegrUJ

**4.5-7.07.2021** - Tworzenie kursów online przy użyciu narzędzia Articulate Storyline 3 (21h); ZintegrUJ

**25-26.09.2019** - CORELDraw - Nowoczesne narzędzia IT w procesie dydaktycznym (13h); ZintegrUJ

**13-17.09.2019** – Vienna Summer School Drug Design (różne aspekty modelowania molekularnego); Universität Wien

**06-07.2018** – Kurs tworzenia Sylabusów (15h); *Ars Docendi*



**7-9.10. 2013** – GLISTEN WG meeting & Workshop (docking/homology modeling); COST Action1207; Uniwersytet Warszawski

**15-20.09.2013** – Vienna Summer School Drug Design (różne aspekty modelowania molekularnego); Universität Wien

**9-13.07.2012** – COST BM0806 Training School on Histamine Biouinformatics; Medical University Innsbruck

#### **7.4. Działalność organizacyjna**

**3-5.07. 2015** - V Spotkanie Sieci Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD, Kraków (konferencja międzynarodowa) - praca organizacyjna, przygotowanie i skład książki abstraktów

**15-18.05.2019** - 48th Meeting of the European Histamine Research Society, Kraków, (konferencja międzynarodowa) – praca organizacyjna, przygotowanie i skład książki abstraktów, identyfikacja wizualna konferencji, przygotowanie i prowadzenie strony internetowej

**10-13.06.2019** - EFMC-ACSMEDI MedChem Frontiers 2019, Kraków (konferencja międzynarodowa) – działalność organizacyjna

**28-30.10.2019** - Working Group Meeting Of COST Action CA18133 “European Research Network On Signal Transduction”, Belfast, UK, (konferencja międzynarodowa) session chairman

Od **2019** r. zajmuję się prowadzeniem strony internetowej Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych oraz Polskiego Towarzystwa Chemii Medycznej

#### **7.5. Udział w projektach badawczych**

Podczas swojej dotychczasowej pracy badawczej realizowałem badania naukowe w ramach 9 Programów, w tym 8 finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki i 1 przez Ministerstwo Edukacji i Szkolnictwa Wyższego (z dwóch z nich: w latach 2009-2010 i 2018-2019 pełniłem rolę Kierownika) i 6 w ramach Działalności Statutowej:

Projekty finansowane ze źródeł zewnętrznych i zrealizowane przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych:

1. **Kierownik projektu:** Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa wyższego, grant badawczy promotorski, N N405 266837, „*Badania nad wpływem odległości i struktury podstawowych elementów budowy (układu heterocyklicznego i obszaru aromatycznego) ligandów receptorów H3 histaminowych na ich właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczną*” 20.10.2009 – 09.09.2010.

Projekty finansowane ze źródeł zewnętrznych i zrealizowane po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych:

1. **Kierownik projektu:** Narodowe Centrum Nauki, MINIATURA 2, 2018/02/X/NZ7/00584, „Nowe terapie choroby Parkinsona - pochodne ksantyn o dwukierunkowym działaniu”, 15.09.2018- 14.09.2019.
2. **Wykonawca:** Narodowe Centrum Nauki, MAESTRO 1, 2011/02/A/NZ4/00031, „Receptory H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub> histaminowe jako atrakcyjny cel poszukiwań substancji biologicznie aktywnych”, 18.05.2012 – 18.12.2017.
3. **Wykonawca:** Narodowe Centrum Nauki, Projekt Badawczy Ogólny, UMO-2013/11/B/NZ7/04865, „Receptor sierocy GRR18. Poszukiwanie niezbędnych narzędzi do badań nad GRP18 jako potencjalnym celem terapeutycznym”, 27.08.2014- 26.08.2018.
4. **Wykonawca:** Narodowe Centrum Nauki, OPUS 12, 2016/23/B/NZ7/01063, „Analiza i ocena skuteczności działania anorektycznego oraz bezpieczeństwa nowych ligandów receptora H<sub>3</sub> histaminowego”, 14.07.2017-13.07.2021.
5. **Wykonawca:** Narodowe Centrum Nauki, OPUS12, 2016/23/B/NZ7/02327, „Nowa perspektywa w terapii choroby Alzheimera - wielofunkcyjne ligandy receptora H<sub>3</sub> histaminowego”, 25.07.2017-24.01.2022.
6. **Wykonawca:** Narodowe Centrum Nauki, PRELUDIUM 12, 2016/23/N/NZ7/00469, „Pochodne piperazyny jako aktywne ligandy receptorów H<sub>3</sub> histaminowych - modelowanie molekularne, synteza, ewaluacja farmakologiczna”, 01.09.2017-28.02.2021.
7. **Wykonawca:** Narodowe Centrum Nauki, PRELUDIUM 12, 016/23/N/NZ7/00475, „Nowe wielofunkcyjne ligandy - antagoniści receptorów A<sub>1</sub>/A<sub>2A</sub> adenozynowych i inhibitory monoaminooksydazy B, w poszukiwaniu innowacyjnych rozwiązań terapeutycznych w chorobach neurodegeneracyjnych”, 02.10.2017 – 01.04.2020

Projekty finansowane ze źródeł zewnętrznych w toku realizacji:

1. **Wykonawca:** Narodowe Centrum Nauki, OPUS 22, 2021/43/B/NZ7/01938, „Badania nad aktywnością przeciwzapalną ligandów GPR18 oraz ich udziałem w modulacji fenotypów mikrogleju – nowego celu terapii stanów zapalnych ośrodkowego układu nerwowego”, 18.07.2022 – 17.07.2025

Projekty finansowane ze źródeł wewnętrznych i zrealizowane po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych:

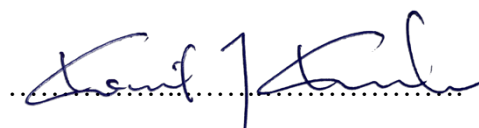
1. **Kierownik:** Zadanie badawcze (Działalność Statutowa) „ Poszukiwanie nowych, podwójnie działających ligandów: w stosunku do receptorów H3 histaminowych i inhibicji acetylocholinoesterazy, o potencjalnym zastosowaniu w terapii choroby Alzheimer’a.”, 01.01.2013- 31.12.2014.
2. **Kierownik:** Zadanie badawcze (Dotacja celowa dla młodych naukowców) „Pochodne takryny jako ligandy receptorów H3 histaminowych i acetylocholinoesterazy o potencjalnej aktywności w chorobie Alzheimer’a.”, 01.01.2014- 31.12.2014.
3. **Kierownik:** Zadanie badawcze (Dotacja celowa dla młodych naukowców) „Poszukiwanie ligandów receptorów H3 histaminowych w grupie pochodnych podstawionej N-acylopiperazyny.”, 01.01.2015- 31.12.2016.
4. **Kierownik:** Zadanie badawcze (Działalność Statutowa) „Modelowanie molekularne pochodnych ksantynowych o wielokierunkowym działaniu.”, 01.01.2018- 31.12.2018.
5. **Kierownik:** Zadanie badawcze (Działalność badawcza, subwencja) „Modelowanie molekularne pochodnych ksantynowych o wielokierunkowym działaniu.”, 01.01.2019- 31.12.2020.
6. **Kierownik:** Zadanie badawcze (Działalność badawcza, subwencja) „Komputerowo wspomagane poszukiwanie celów biologicznych dla wirtualnej biblioteki ligandów”, 8.06.2022 - obecnie

### 7.6. Recenzje prac naukowych

Od stycznia 2020 występowałem w roli recenzenta 8-miorotnie dla 8 prac oryginalnych (7 publikacji i 1 komunikat) złożonych do publikacji w czasopismach: *Bioanalysis* (03.2020), *Neurotoxicity* (05.2020), *ChemMedChem* (07.2020), *RSC Medicinal Chemistry* (11.2020), *Molecules* (06.2022), *Biomedicines* (07.2022), *ACS Journal of Agricultural Food and Chemistry* (07.2022), *Computational and Structural Biotechnology Journal* (09.2022).

### 7.7. Recenzje projektów i grantów

W grudniu 2020 i styczniu 2021 występowałem w roli recenzenta 5 projektów złożonych w ramach konkursu: „Polski Produkt Przyszłości” dla Polskiej Agencji Rozwoju Przemysłu (PARP).



(podpis wnioskodawcy)