



# UNIwersytet Medyczny

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Farmaceutyczny  
Katedra i Zakład Chemii Fizycznej i Biofizyki  
Kierownik: prof. dr hab. Witold Musiał

Wrocław, dn. 12 maja 2023 r.

Recenzja osiągnięcia naukowego  
doktora nauk farmaceutycznych Kamila J. Kudery  
z Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

### „Komputerowe metody określania struktur wybranych receptorów GPCR i modelowanie ich potencjalnych ligandów”

w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego

#### Wprowadzenie

Przedstawiony mi do recenzji zespół publikacji, przewidziany jako osiągnięcie naukowe prezentowane w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego, stanowi grupę siedmiu artykułów w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach naukowych o ugruntowanej w Europie i na świecie renomie.

Kandydat do stopnia doktora habilitowanego jest pierwszym autorem w czterech z tych publikacji (**H1**, **H2**, **H3**, **H5**), podczas gdy w pozostałych trzech (**H4**, **H6**, **H7**) jest jednym z kolejnych autorów. Oznaczenia publikacji Recenzent identyfikuje w kolejnych częściach swojej opinii.

Kandydat deklaruje jako cel swojej pracy badawczej, której zwieńczeniem na tym etapie ma być stopień doktora habilitowanego, określenie oddziaływań molekularnych zróżnicowanych ligandów przeznaczonych dla różnych celów biologicznych – jak należy się domyślać chodzi o oddziaływania tych ligandów z potencjalnym receptorem farmakologicznym i/lub oddziaływań wzajemnych, co zresztą wynika z lektury poszczególnych publikacji. Ponadto Kandydat pragnie ustalić wpływ elementów struktury tych ligandów na ich potencjalną aktywność biologiczną. Cel pracy przedstawiono w sposób

spójny i został on uzupełniony o cel dodatkowy, polegający na próbie stworzenia algorytm postępowania, który umożliwiłby ustalenie selektywności niektórych ligandów (adenozynowych) wobec szeregu różnych celów biologicznych. Cel cyklu prac badawczych został w mojej opinii prawidłowo zasygnalizowany.

Kandydat przebadał szereg ligandów o potencjalnym oddziaływaniu na receptory sprzężone z białkiem G (GPCRs). Wyraźnie widać w przedstawianym cyklu prac sprecyzowany przedmiotowo i metodologicznie obszar badawczy potwierdzający samodzielność myślenia naukowego Kandydata, i jego zdolność do samodzielnego wyboru i samodzielnej realizacji prac badawczych. Cykl prac z jednej strony skupia się na ważnym obszarze nauki i przekonuje o wysokiej specjalizacji Kandydata w specyficznym i bardzo ważnym obszarze nauk farmaceutycznych. Patrząc z nieco innej perspektywy, zespół prac potwierdza szeroki horyzont Kandydata, który podejmuje tematy związane z różnymi ważnymi białkami receptorowymi, a co za tym idzie i celami terapeutycznymi.

## Osiągnięcie naukowe

W pracy **H1 (Kuder, Kamil J., et al. "Novel, dual target-directed annelated xanthine derivatives acting on adenosine receptors and monoamine oxidase B." *ChemMedChem* 15.9 (2020): 772-786)** Kandydat, pracując w większym zespole badawczym, zaproponował rozwój pochodnych pirymidyny oraz diazepiny, jako potencjalnych substancji leczniczych oddziałujących z antagonistycznie na receptory  $A_{2A}$  i jednocześnie posiadających aktywność hamującą monoaminooksydazę B. Pochodne, otrzymane poprzez annelowanie pierścienia pirymidyny lub diazepiny, Kandydat we współpracy z Uniwersytetem w Bonn, poddał testom powinowactwa do receptorów adenozynowych oraz testom hamowania monoaminooksydazy B i niektórych monoaminooksydaz A. Kandydat ostatecznie uzyskał szereg informacji dotyczących wpływu struktury wymienionych pochodnych na ich zdolność do oddziaływania z ww. receptorami. Okazało się, że niektóre zsyntetyzowane *de novo* molekuly oddziaływały wyraźnie ze strukturą receptora  $A_{2A}$ , aczkolwiek modyfikacja strukturalna intensyfikująca hamowanie monoaminooksydazy B, wpływała na zmniejszenie powinowactwa molekuly do receptora  $A_{2A}$ . Dodatkowymi efektami prac prowadzonych przez Kandydata było wyodrębnienie związków obniżających aktywność enzymów cytochromu P-450, oraz molekul silnie wiązanych przez białko efluksowe P, obniżające strumień przezbłonowy substancji leczniczych i ksenobiotyków.

Tutaj głównym osiągnięciem Kandydata na polu *in silico* było: (1) potwierdzenie braku oddziaływania badanych ligandów  $A_{1A}$  z receptorami poprzez brak dokowania, przy czym Kandydat podjął próbę interpretacji zawał sterycznych dyktujących ten brak oddziaływania, (2) potwierdzenie oddziaływania badanych ligandów z receptorem  $A_{2A}$ , z próbą wyjaśnienia tego zjawiska za pomocą oddziaływań wodorowych w N253 wg. Ballesteros-Weinsteina, (3) potwierdzenie braku możliwości strukturalnych oddziaływania badanych struktur z monoaminooksydazą A, (4) ocena szczegółów oddziaływania wybranych ligandów ze strukturą monoaminooksydazy B. Skutkiem ww. pracy było wyodrębnienie liganda o podwójnej aktywności, zarówno wobec receptorów  $A_{2A}$ , jak i wobec monoaminooksydazy B, oraz oszacowanie mechanizmu jego potencjalnych oddziaływań z tymi receptorami na poziomie molekularnym.

W pracy badawczej **H2 (Kuder, Kamil J., et al. "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* 34.6**

(2020): 697-707), prowadzonej w Uniwersytecie Phillipsa w Marburgu, Kandydat podjął się trudnego, ale i atrakcyjnego zadania samodzielnego opracowania *in silico* homologicznego receptora A<sub>3A</sub> na podstawie struktury receptora A<sub>2A</sub>, a następnie sprawdzenia oddziaływania *in silico* szeregu ligandów z czterema podtypami receptora A<sub>1A</sub>, oraz receptorami A<sub>2A</sub>, oraz A<sub>3A</sub>. Kandydat porównał wyniki oddziaływania ligandów z receptorami w warunkach eksperymentu naturalnego z wynikami eksperymentu *in silico*, wykorzystując obliczenia rang oparte o geometryczną interpretację odległości rektylinearnej Minkowskiego.

Zaproponowany przez Kandydata model badawczy pozwolił skutecznie na przewidywanie aktywności ligandów metodą obliczeniową w wielu przypadkach. Należy zauważyć, że 27 właściwie zidentyfikowanych ligandów na 39 wszystkich stanowi blisko 70% trafień w przyjętych warunkach eksperymentu obliczeniowego.

Pracę badawczą **H3 (Kuder, Kamil J., et al. "Molecular modeling of an orphan GPR18 receptor." *Letters in Drug Design & Discovery* 16.10 (2019): 1167-1174)** Kandydat ukierunkował na samodzielne i szeroko zakrojone teoretycznie badania oddziaływania nielicznych lepiej poznanych ligandów z badanym obecnie szczegółowo receptorem anandamidu (GPR18). Kandydat trafnie wybrał obiekt swoich badań, bowiem wpisał się w nurt rozważań nad do niedawna słabo poznanym receptorem, związanym z ważnymi czynnościami układu odpornościowego i nerwowego. Nie bez znaczenia jest fakt, że receptor ten może być aktywowany przez związki z grupy kannabinoidów, a więc głos Kandydata wpisał się w ważną dyskusję współczesnej medycyny o aktywności i konsekwencjach terapii opartej o te związki.

Kandydat odważnie przystąpił do niełatwego zadania projektowania receptora, uwzględniając dostępną literaturę nt. struktury GPR18 oraz konformację dostępnych ligandów, wykorzystując przy tym najnowsze osiągnięcia tamtego okresu przedstawione przez innych autorów w postaci pracy doktorskiej Uniwersytetu Północnej Karoliny (USA). Ostatecznie Kandydatowi udało się ustalić, w przebiegu badań nad strukturami ligandów podstawionych w pozycjach *para*- i *meta*- pierścienia aromatycznego, że brak interakcji w jednym z punktów kotwiczących (R191<sup>5.42</sup>) jest istotny dla wiązania antagonisty receptora GPR18, co jest ważnym osiągnięciem w skali badań ogólnościowych.

W pracy badawczej **H4 (Michalik, Ilona, et al. "Structure Prediction, Evaluation, and Validation of GPR18 Lipid Receptor Using Free Programs." *International Journal of Molecular Sciences* 23.14 (2022): 7917)** Kandydat powrócił do ważnego wątku swoich badań – receptora GPR18, uzbrojony jednak w szereg nowszych narzędzi obliczeniowych, oraz w wiedzę, narastającą systematycznie wraz z komputerowym i eksperymentalnym opracowywaniem nowych ligandów. Kandydat trafnie i rzeczowo zidentyfikował najważniejsze cechy struktury receptora GPR18, odróżniając cechy charakterystyczne dla różnych modeli obliczeniowych. Kandydat przedstawił szereg eksperymentów, w których, wraz z zespołem, szczegółowo próbował ocenić wpływ licznych czynników strukturalnych na właściwości wymodelowanego białka receptorowego. Kandydat stosował trzy główne sposoby modelowania, tj. klasyczny, przewlekania oraz *ab initio*, przy czym w każdym z nich wykorzystał kilka algorytmów obliczeniowych. Były to: (1) PyMod 2.0 (Structural Bioinformatic Group at Sapienza University of Rome, Roma, Italy) MODELLER 9.15 (University of California, San Francisco, CA, USA) w modelowaniu klasycznym, (2) IT\_1–IT\_5 (standalone I-TASSER v.5.1), IT\_6–IT\_10 (I-TASSER webserver, CIT\_1–CIT\_5 (C-I-TASSER webserver) w modelowaniu przewlekaniem, (3) trRosetta, RoseTTAFold i AlphaFold2 (DeepMind) w modelowaniu *ab initio*. Wyniki badań „*in silico*” ww. metodami Kandydat korelował z wynikami z PrankWeb pozostającego w gestii Uniwersytetu Karola w Pradze (Czechy). Kandydat ponadto skupił się na dynamice

molekularnej, co pozwoliło mu uchwycić zróżnicowanie ważnego parametru ulegającego w białkach istotnym zmianom wraz z upływem czasu tj. średniokwadratowe odchylenie pozycji atomów (RMSD, root-mean-square deviation of atomic positions).

Myślę, że ten kierunek badań, uwzględniający rozważania nad RMSD, powinien być przez Kandydata dalej rozwijany, bowiem jest częściowo tylko odkrytym Świętym Graalem bioinformatyki, który w swoim czasie spełni ważne zadanie w rozwoju ludzkości, podobnie jak równanie Smoluchowskiego-Einsteina, zresztą podobne w swojej wymowie przyrodniczej. W tym kontekście należy wziąć pod uwagę znaczenie RMSD w białkach jako wskaźnika ewolucyjnego podobieństwa między białkami. Niestety recenzent z ubolewaniem stwierdza, że omawiany artykuł nie jest obecnie klasyfikowany jako materiał cytowany w dostępnej bibliografii ogólnoświatowej, mimo że został opublikowany w lipcu 2022 roku.

Zainteresowania naukowe Kandydata, dotyczące modelowania struktur potencjalnych związków o działaniu leczniczym wykraczają poza agonistów lub antagonistów receptorów adenozynowych i anandamidu. W trzech kolejnych pracach Kandydat zainteresował się receptorami histaminowymi H<sub>3</sub> i H<sub>4</sub>.

Pierwsza z tych prac tj. **H5 (Kuder, Kamil J., et al. "Discovery of Potential, Dual-Active Histamine H3 Receptor Ligands with Combined Antioxidant Properties." *Molecules* 26.8 (2021): 2300)** dotyczy opisu 4-pirydylopiperyazyny jako nowego bioizosterycznego zamiennika piperidyny. W szeregu pomysłowych badań Kandydat zastosował pochodne zsyntetyzowanej przez siebie struktury o akronimie KSK63 w różnych formach – uprotonowanej i nieuprotonowanej, w celu przeprowadzenia odpowiednich modelowych procesów dokowania *in silico*. Autor szczegółowo omawiał potencjalne oddziaływania, dostrzegając zróżnicowanie sposobów dokowania konformerów protonowanych, co może rzucać światło na szereg obserwacji farmakodynamicznych, ale i farmakokinetycznych. Kandydat, nauczony doświadczeniem publikacji H2 uporządkował wyniki swoich badań wykorzystując ciekawą formułę prezentacji molekularnych odcisków palca oddziaływań badanych molekuł. Ostatecznie Kandydat zaproponował ligandy o umiarkowanym powinowactwie do receptora H<sub>3</sub>, oraz o interesujących właściwościach przeciwutleniających i stabilności określonej w badaniach dynamiki molekularnej.

Dwie kolejne publikacje **H6 (Łażewska, Dorota, Kamil Kuder, and Katarzyna Kononowicz. "Monocyclic and fused azines and azoles as histamine H4 receptor ligands." *Current Medicinal Chemistry* 23.18 (2016): 1870-1925)** i **H7 (Łażewska, Dorota, et al. "Alkyl derivatives of 1, 3, 5-triazine as histamine H4 receptor ligands." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 27.7 (2019): 1254-1262)** dotyczą wytworzenia *in silico* receptora H<sub>4</sub>, a następnie dokowania do niego pochodnych triazynowych. Kandydatowi, wraz z zespołem badawczym, udało się opisać wybrane oddziaływania tych pochodnych z białkiem receptorowym w warunkach obliczeniowych.

## Sylwetka Kandydata

Zgodnie z dostarczoną dokumentacją Kandydat jest wieloletnim pracownikiem badawczo-dydaktycznym Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych. W przebiegu swojej kariery naukowej Kandydat dokumentuje udział jako wykonawca w licznych projektach badawczych finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki, oraz pobyty naukowe w uczelniach zagranicznych, w tym we Frankfurcie na Menem oraz w Marburgu, a także współpracę z uczelnią w Bonn. Ponadto Kandydat brał udział w programach międzynarodowych COST: GLISTEN i ERNEST.

Sumaryczny IF prac Kandydata wynosi 123,002, liczba cytowań bez autocytowań 380, współczynnik Hirscha 18, a suma punktów MNiSW 1772.

### **Podsumowanie**

Podsumowując, Kandydat posiada w dorobku osiągnięcia naukowe stanowiące znaczny wkład w rozwój nauk farmaceutycznych, w tym cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych, oraz wykazał się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, w tym zagranicznej. W mojej opinii Kandydat spełnia warunki artykułu 219 obowiązującej Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 20 lipca 2018 r. i tym samym wnioskuję o dopuszczenie go do dalszych etapów postępowania związanego z nadaniem stopnia doktora habilitowanego.

Prof. dr hab. Witold Musiał

