



Wrocław, 25.07.2024 r.

dr hab. Jarosław J. Panek, prof. UWr
Zespół Badawczy Struktury i Dynamiki Makroukładów
Wydział Chemii UWr

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Witoszki
pt. „Synteza bibliotek pochodnych fenyloalaniny i tryptofanu oraz ich wykorzystanie
do opracowania funkcji oceniającej specyficznej dla receptora tachykininowego NK1”

Na podstawie powołania mnie przez Radę Naukową Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w dniu 10 lipca 2024 r. na recenzenta w postępowaniu o nadanie stopnia doktora wszczętym na wniosek mgr Katarzyny Witoszki, przedkładam poniższą recenzję wskazanej rozprawy, sporządzonej przez Doktorantkę pod opieką naukową prof. dr hab. Aleksandry Misickiej-Kęsik i dr hab. Piotra F. J. Lipińskiego i zatytułowanej „Synteza bibliotek pochodnych fenyloalaniny i tryptofanu oraz ich wykorzystanie do opracowania funkcji oceniającej specyficznej dla receptora tachykininowego NK1”.

Na wstępie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Witoszki jest pracą pisemną o charakterze monografii naukowej, ale – jak zaznacza Autorka – część wyników oraz dodatkowa charakterystyka strukturalna i fizykochemiczna niektórych związków były opublikowane w pracach oryginalnych oraz patencie (pozycje bibliograficzne [1–4] w rozprawie). Jest to godne podkreślenia, bo świadczy, że wyniki badań przeszły także procedurę weryfikacji przez recenzentów w międzynarodowym obiegu naukowym i stanowią już część trwałego dorobku z pogranicza nauk medycznych, chemicznych i biologicznych. Wymieniam te dyscypliny, aby zwrócić uwagę na to, że Doktorantka musi poruszać się w bardzo skomplikowanym obszarze badań, umiając spojrzeć krytycznie zarówno na czysto chemiczne aspekty swej pracy, tj. procedury syntezy i oczyszczania związków, jak też na kontekst biochemiczny – powinowactwo do receptorów białkowych. Poniżej uzasadnię moje przekonanie, że mgr Witoszka bardzo dobrze opanowała te różne poziomy odniesienia i odpowiednio dostosowuje język pracy przedstawiając wyniki swoich badań.

Analizowana rozprawa doktorska jest obszerna – liczy 250 stron, w tym 9 stron materiałów poprzedzających (m.in. streszczenie, deklaracja innowacyjności), 12 stron spisów (treści, tabel, rysunków i skrótów), 208 stron właściwej treści rozprawy i 21 stron bibliografii (325 pozycji – dobrze wybranych, bez nadmiarowości, z uwzględnieniem najnowszych prac – wysoko oceniam dobór piśmiennictwa). Przy takiej objętości rozprawy ważna jest klarowność podziału treści i w dużej mierze Autorce udało się to osiągnąć. Zachowana jest równomierność objętości tekstu – wstęp literaturowy jest podobnej długości co rozdział „Materiały i metody”, a opis wyników badań własnych i ich dyskusja są o ok. połowę dłuższe od wstępu.



Umieszczenie procedur syntetycznych i obliczeniowych na końcu rozprawy, po dyskusji i podsumowaniu, jest dobrym zabiegiem, zwłaszcza że zawarte są tam dane dotyczące wydajności oraz informacje spektroskopowe (MS, NMR) zapisane w skrótowy sposób charakterystyczny dla prac oryginalnych. Z uwagi na liczbę otrzymanych związków zrozumiała jest decyzja o podaniu danych spektroskopowych w formie wyciągu (spisu pików NMR), a nie poprzez dołączenie widm oryginalnych. Opracowanie graficzne rozprawy jest bardzo staranne, rysunki strukturalne oraz przedstawiające oddziaływania ligand-receptor są czytelne. Rysunek struktury krystalicznej związku Boc-F-74 (rys. 21, str. 89) nie ma elipsoid termicznych (obecnych na rys. 20), brak też komentarza dotyczącego nieuporządkowania atomów jednej z grup $-CF_3$, ale przecież dogłębna analiza strukturalna nie jest celem przedstawionej rozprawy.

Zdefiniowany przez Doktorantkę cel pracy, czyli „zaplanowanie i otrzymanie nowych bibliotek pochodnych fenyloalaniny i tryptofanu, potencjalnie wiążących się do receptora NK1, oraz opracowanie nowych funkcji oceniających specyficznych dla receptora NK1” (str. 77) jest jasny i łatwo weryfikowalny. W mojej ocenie został on osiągnięty, o czym świadczy uzyskanie 94 związków (w tym 93 oryginalnych) oraz zaproponowanie nowych zestawów wag statystycznych modyfikujących źródłową funkcję oceniającą programu AutoDock Vina.

Przed dokonaniem oceny merytorycznej badań przedstawionych w rozprawie muszę nadmienić, że obszarem mojej specjalizacji jest chemia obliczeniowa, zatem nie będę oceniał szczegółów procedur syntetycznych czy też możliwości optymalizacji odpowiednich procesów. Jak wspomina Autorka (str. 153), od znalezienia optymalnych parametrów syntetycznych ważniejsze było uzyskanie jak najszerszej bazy struktur, i z tego punktu widzenia zastosowany w pracy tok postępowania nie budzi moich zastrzeżeń; uzyskane wydajności (patrz rozdział VII.3) są zresztą w większości niezłe ($> 70\%$), skoro nie są to procesy optymalizowane. Za cenny wkład Doktorantki w badania nad antagonistami NK1R uważam to, że proces syntezy został poprzedzony analizą struktura-aktywność dla znanych małowcząsteczkowych antagonistów, a serie związków (zwłaszcza W/F-71 – W/F-74) sporządzono w elegancki pojęciowo, kombinatoryczny sposób. Liczność syntez przeprowadzonych przez jedną osobę jest godna pochwały, pokryta jest znacząca część przestrzeni chemicznej i wykorzystane są dobrze dobrane modyfikacje, np. zamiana grupy $-CF_3$ na $-SF_5$. Jak jednak pokazały dalsze badania, wiele z badanych związków – w tym właściwie cały zestaw serii W/F-71 do W/F-74 – pozbawionych jest istotnego powinowactwa do receptora NK1, choć istnieją obiecujące wyjątki (patrz Tabela 7). Podobnie jest z cytotoksycznością (Tabela 8), mającą wstępnie oszacować możliwą aktywność przeciw-nowotworową badanych związków. W tym miejscu chciałbym zapytać, czy – w świetle swoich badań oraz dalszego przyrostu wiedzy na temat receptora NK1 – Doktorantka ma już wypracowane propozycje kolejnych modyfikacji, zwłaszcza dla serii W/F-71 do W/F-74? Bardzo ciekawa jest hipoteza o innym niż NK1R celu molekularnym badanych związków – receptorze CCK2. Jest ona poparta przewidywaniami opartymi na analogiach strukturalnych oraz dokowaniach. Tu znów nasuwa



się pytanie, z jakiego powodu nie doszła do skutku analiza doświadczalna powinowactwa badanych związków do CCK2R – czas, trudności metodologiczne, wysoki koszt? Wracając do samej hipotezy o CCK2R jako celu molekularnym cieszę się, że Doktorantka widzi sens kontynuacji tej linii badań w Zakładzie Neuropeptydów. W tym miejscu wyrażę też swoją wysoką ocenę rozdziału V (Dyskusja), w którym Autorka bardzo rzetelnie i nie ukrywając ewentualnych słabych stron swoich wyników (wiele związków nie wykazywało znaczącej aktywności, początkowo nie były znane dobre struktury krystaliczne NK1R itd.) przedstawia dalsze propozycje postępowania – od możliwości udoskonalenia procedur syntetycznych aż do dalszych planów związanych z dokowaniem (przejście od *rescoringu* do poprawy funkcji oceniającej dokowanie; porównanie z metodami uczenia maszynowego). Ten rozdział jest gotowym, bogatym zestawem pomysłów na dalszą pracę badawczą, w tym rozszerzenie prac o bliską mi analizę strukturalną (oddziaływania wewnątrz- i międzycząsteczkowe).

Zastosowanie metod *in silico* pozwoliło na przeprowadzenie dość systematycznych analiz struktura-aktywność (SAR), a także (dzięki procedurze *target fishing*) na wspomniane już powyżej zaproponowanie receptora CCK2 jako możliwego celu dla badanych związków. Jednak najważniejszym celem badań obliczeniowych w recenzowanej rozprawie była ocena i poprawa jakości wyników dokowania molekularnego. W tym celu zastosowano podejście najprostsze, ale o dużym potencjale: wykorzystano dobrze znaną funkcję oceniającą programu AutoDock Vina (która, jak wskazują wcześniejsze badania, niestety nie jest dla receptora NK1 zbyt dokładna) i zmieniano wagi statystyczne sześciu tworzących tę funkcję wkładów. Dodatkowo ograniczono się do zastosowania tak modyfikowanych funkcji jedynie do następczej rewizji energii wiązania już zadokowanych struktur (*rescoring*), nie zaś do samego oceniania danej pozycji cząsteczki dokowanej względem innych konformacji. Mimo takiego zawężenia obszaru badań (implikacje tego zawężenia szczegółowo opisane są w Dyskusji) uzyskano wiele zmodyfikowanych rodzin funkcji oceniających, istotnie lepszych od wzoru oryginalnie stosowanego w programie AutoDock Vina. Tu pojawia się pewien problem: uzyskane bogactwo możliwych funkcji utrudnia usystematyzowanie wyników. Przejrzenie tabel 29 do 40 pokazuje, że nowe zestawy wag statystycznych wykazują sporą zmienność, ale też rzucają się w oczy przynajmniej dwa fakty: waga w_3 jest zwykle nieco mniejsza (co do wartości bezwzględnej) od oryginalnej wartości z programu Vina, zaś waga w_5 jest właściwie zawsze znacznie mniejsza (również co do wartości bezwzględnej) od oryginalnego odpowiednika. Autorka dostrzega to, ale w mojej ocenie nie w pełni wykorzystuje: fraza na stronie 138, „waga w_5 odpowiadająca za wkład wiązań wodorowych jest systematycznie mniej ujemna niż w funkcji oryginalnej”, miałaby większą moc, gdyby wspomnieć, że chodzi o obniżenie aż o cały rząd wielkości – od oryginalnego $w_5 = -0,58744$ do optymalizowanych pod kątem *rescoringu* wartości typu $-0,01 \div -0,05$. Oznacza to bardzo silne „ukrycie” wiązań wodorowych w funkcji do *rescoringu* i warte byłoby dalszych badań. Mam w związku z tym pytanie: czy w ocenie Doktorantki ewentualne „wyłączenie” wiązań wodorowych będzie bezpieczne na poziomie funkcji scoringowej (z bezpośrednim wpływem na ranking póź-konformacji),



czy też bezpieczniej będzie pozostawić modyfikację wagi w_5 jedynie do *rescoringu*? Mam też pytanie specyficzne dla programu AutoDock Vina. Jednym z parametrów określających dokładność przeszukania jest wielkość oznaczona jako *exhaustiveness* (domyślna wartość: 8) sterująca liczbą niezależnych przeszukań przestrzeni konformacyjnej. Czy badano wpływ tego parametru na jakość wyników, czy też wcześniejsze doświadczenia Doktorantki lub współpracowników sugerowały, że dla badanych związków nie następuje znacząca poprawa jakości dokowań? Pomimo tych pytań uważam, że obliczenia – zarówno wszelkie przebiegi dokowania, jak i optymalizację funkcji rescoringowych oraz analizę celów molekularnych (*target fishing*) przeprowadzono bardzo kompetentnie i starannie.

W tekście o takiej objętości trudno całkowicie wyeliminować drobne błędy literowe czy składniowe, jednak nie utrudniają one odbioru pracy. Wspomnę jedynie o kilku wartych dyskusji. Na stronie 159 czytamy: „W pracach prowadzonych w ZN IMDiK PAN wielokrotnie obserwowano, że domyślna funkcja oceniająca popularnego programu AutoDock Vina [206] daje niskiej jakości szacowania energii wiązania ligandów z receptorem NK1 [niepublikowane]”. Wydaje mi się, że oznaczenie „niepublikowane” może tu być pominięte, bo jasny jest kontekst źródła informacji (badania własne Zakładu). Odnośniki literaturowe często padają ofiarą zmian formatowania przy przenoszeniu między plikami i programami – np. odnośniki [1] oraz [181-187] w bibliografii nie mają prawidłowego zapisu izotopów z indeksem górnym, przykładowo w [1] mamy $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ zamiast $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$. Podobnie jest z odnośnikiem [2] (winno być: CF_3 , SF_5), który nie jest też kompletny – zawiera numer wydania czasopisma, ale nie numer artykułu (e202300315). Nie zawsze stosowana jest jednolita konwencja cytowań (np. patrz odnośniki [12], [18], [52] czy [146]). W odnośniku [96] tytuł jest błędny, a w odnośniku [253] pozostały kody sterujące HTML. Są to oczywiście drobiazgi bez wpływu na czytelność pracy. W moim odczuciu stosowane przez Autorkę pojęcie „projekt doktorancki” jest właściwe, ale zamiast „pracy doktoranckiej” (str. 77) lepsza byłaby „praca doktorska”.

Praktyczne zastosowanie otrzymanych wyników badawczych będzie związane, jak wyżej wskazałem, z dalszymi poszukiwaniami nowych antagonistów NK1R oraz określeniem roli receptora CCK2. Rozprawa daje wskazówki do zastosowania konkretnych modyfikacji przy tworzeniu bibliotek pochodnych oraz do optymalizacji procedur syntetycznych, stąd w mojej ocenie praktyczne zastosowanie wyników obecnych w rozprawie będzie względnie łatwe.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Witoszki, jak już wcześniej odnotowałem, ma formę pracy pisemnej o charakterze monografii naukowej. Należy jednak wspomnieć, że Autorka dokładnie opisuje, które badania przeprowadziła samodzielnie, a które są dziełem współpracowników. Syntezy związków są samodzielnym dziełem Doktorantki, podobnie jak opis obliczeniowy (dokowanie, analiza celów molekularnych). Pomiary rentgenograficzne są dziełem współpracownika z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie; mają one dla rozprawy znaczenie raczej poboczne, bo głównymi narzędziami do charakteryzacji nowych



połączeń były spektrometria mas i spektroskopia NMR. Natomiast oznaczenia biologiczne (powinowactwo receptorowe do NK1R oraz cytotoksyczność) były przeprowadzone przez współpracowniczkę z macierzystego Zakładu Neuropeptydów – one z kolei mają centralne znaczenie dla pracy, ale w tym miejscu wyrażam swoją opinię, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Witoszki jest dowodem samodzielności naukowej Doktorantki (w szczególności poprzez jasne wyznaczenie celów i klarowny tok ich realizacji oraz przeprowadzenie większości badań), a pomoc współpracowników na pewno nie narusza tego odczucia.

Jak niejednokrotnie wzmiankowałem w recenzji, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zaskakuje obfitością materiału doświadczalnego i ciekawie łączy te dane z częścią obliczeniową. W podsumowaniu recenzji podkreślam zatem, że **rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Witoszki spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim** zgodnie z Ustawą Prawo o Szkolnictwie Wyższym oraz z § 11 Regulaminu przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (dalej: Regulaminu). **Stanowi rozwiązanie oryginalnego, aktualnego i ważnego problemu naukowego.** Wykazuje, że **Doktorantka posiada szeroką wiedzę teoretyczną** i umiejętności doświadczalne oraz obliczeniowe związane z dokowaniem, stosuje te umiejętności przy rozwiązywaniu zagadnień badawczych wykazując **samodzielność charakteryzującą dobrze ukształtowaną młodą uczoną**. Stwierdzam, że **rozprawa doktorska mgr Katarzyny Witoszki zasługuje na jednoznacznie pozytywną ocenę i wnioskuje o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na fakt starannego przygotowania rozprawy w oparciu o bogaty materiał badawczy i połączenie badań doświadczalnych i obliczeniowych tak, że stanowią wzajemne uzupełnienie i dają nowe możliwości w dalszych badaniach** (udoskonalony *rescoring*), a także na spełnienie przynajmniej jednego warunku dotyczącego wyróżnień rozpraw doktorskich (§ 19 pkt. 3.2 Regulaminu – opublikowanie przynajmniej części wyników rozprawy doktorskiej w przynajmniej jednej pracy oryginalnej w czasopismach naukowych z listy JCR – patrz pozycje bibliograficzne [1] i [2]) **stawiam wniosek o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej.**

dr hab. Jarosław J. Panek, prof. UWr