

Warszawa, 11/6/2018

Dr hab. Dariusz Plewczyński, prof. UW
Laboratorium Genomiki Funkcjonalnej i Strukturalnej
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
Ul. Banacha 2c, 02-097 Warszawa, Polska

RECENZJA

rozprawy doktorskiej magistra Krzysztofa Rataja

**NEIGHBORING SUBSTRUCTURES FINGERPRINT AS A NEW METHOD OF COMPOUND
REPRESENTATION AND ITS APPLICATION IN SCREENING FOR NOVEL SELECTIVE COMPOUNDS
FOR SELECTED SEROTONIN RECEPTORS**

wykonanej w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii

Polskiej Akademii Nauk

pod kierunkiem promotora

profesora doktora habilitowanego Andrzeja Bojarskiego

Przedstawiona mi do recenzji praca jest owocem udanej analizy teoretycznej w paradygmacie chemoinformatycznym. Prace tego typu łączą twórczo zagadnienia informatyki, chemii i bioinformatyki celem lepszego poznania własności chemo-fizycznych związków chemicznych, w szczególności nowych leków. Ta nowo powstała, wysoko interdyscyplinarna dziedzina wykorzystuje rozległe dane doświadczalne do treningu modeli statystycznych, uczenia maszynowego, czy analizy skupień, wspierając się bazującym na fizyce teoretycznej modelowaniem obliczeniowym. Integruje w ten sposób dostępną wiedzę na temat znanych inhibitorów i leków, jak również zidentyfikowaną za pomocą metod biologii molekularnej funkcję białek (np. receptorowych) czy ich sekwencję aminokwasową lub strukturę trójwymiarową.

Przedmiotem mojej oceny, w myśl wymagań Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. 2017 poz. 1789, z późn. zm.) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261), jest oryginalność rozwiązane problemu naukowego, ogólna wiedza teoretyczna Kandydata w dziedzinie nauk chemicznych, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska Pana mgr Krzysztofa Rataja została przygotowana w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie pod kierownictwem prof. dra hab. Andrzeja J. Bojarskiego. Skupia się ona na wprowadzeniu i wykorzystaniu nowej metodologii z dziedziny komputerowo wspomaganego projektowania leków, ulepszającej obecnie dostępne metody.

Rozprawa składa się z dwóch części: prezentacji i walidacji nowej metody tworzenia fingerprintów, czyli binarnych reprezentacji związków chemicznych, oraz jej aplikacji w szeroko zakrojonych badaniach przesiewowych skupionych na poszukiwaniu nie tylko aktywnych, ale również selektywnych związków względem receptorów serotoninowych 1B i 2B. Obie prace zostały opublikowane i Doktorant był ich pierwszym autorem, a rozprawa ukazuje znacznie poszerzony zakres badań pokazanych w tych publikacjach. Wnioskując po opisach, Doktorant był kierownikiem dwóch grantów badawczych, które przyczyniły się do ich powstania.

Pierwsza część rozprawy dotyczy stworzenia i walidacji nowej metody opisywania związków chemicznych: Fingerprintu Sąsiadujących Podstruktur. Metoda jest poniekąd rozszerzeniem obecnie dostępnych algorytmów, wprowadzającą dodatkowe informacje poprzez zapisywanie sąsiedztwa pomiędzy poszczególnymi podstrukturami w postaci macierzy połączeń. Nowa reprezentacja została następnie zweryfikowana poprzez retrospektywną walidację, z użyciem wachlarza metod z zakresu uczenia maszynowego, takich jak Support Vector Machines, Extreme Entropy Machines i Naive Bayes. Walidacja składała się z szeregu eksperymentów klasyfikacyjnych krzyżowej walidacji przeprowadzonych na związkach o znanych aktywnościach dla szesnastu celów biologicznych z rodziny receptorów GPCR oraz kinaz białkowych. Dodatkowo, trzy różne fingerprinty podstrukturalne zostały użyte jako podstawa do stworzenia nowego fingerprintu, Klekota-Roth, MACCS oraz

Substructure. Wyniki wskazują, że nowa metoda usprawnia proces klasyfikacji związków chemicznych, pozwalając przez to na dokładniejsze przesiewanie baz związków pod względem aktywności biologicznej. Co więcej, porównano wydajność nowej metody do fingerprintów haszowanych, które są obecnie uważane za najlepsze w kwestii klasyfikacji związków chemicznych, a wyniki tego porównania pokazały, że metodologia zaproponowana przez Doktoranta jest w stanie z nimi konkurować. W badaniach zabrakło porównania do wyników osiąganych przez inne metody, np. oparte na grafach, jednakże zostało to wyjaśnione w dyskusji. Doktorant również starał się wyjaśnić, dlaczego w ogóle podjęte zostały próby ulepszania metod fingerprintów opartych na kluczach pomimo istnienia wydajniejszych metod. Oprócz publikacji, praca ta była prezentowana wielokrotnie na konferencjach naukowych, a jej wydajność została następnie udowodniona w dalszej części rozprawy.

Druga część dotyczy zastosowania nowo stworzonej metody do poszukiwania nowych, selektywnych ligandów dla receptorów serotoninowych 1B oraz 2B. Została ona wykonana we współpracy z Węgierską Akademią Nauk i zakładała przesiewanie bazy związków Mcule używając szeregu metod wirtualnego skringingu, w których pierwszą i główną rolę stanowiły Fingerprinty Sąsiadujących Podstruktur. Pozostałe etapy weryfikacji składały się z zastosowania zarówno znanych i powszechnie uznanych metod, takich jak dokowanie czy fingerprinty interakcji, często z autorskimi modyfikacjami usprawniającymi ich wydajność, jak również podejść stworzonych specjalnie na potrzeby tych badań, takich jak zastosowanie analizy konformacji poprzez obliczanie parametru RMSD. Badania składały się z trzech etapów, w którym każdy wykorzystywał Fingerprint Sąsiadujących Podstruktur jako pierwszy filtr przesiewowy, a ponadto zakładał wykorzystanie innych metod do dalszej weryfikacji związków o potencjalnej aktywności oraz selektywności względem wybranych receptorów, oraz każdy z nich został podsumowany zakupem oraz testem wybranych związków in vitro. Pomimo faktu, iż reguły selektywności receptorów nie są dokładnie opisane oraz ilość znanych selektywnych związków dla tych receptorów jest bardzo mała, Doktorantowi udało się znaleźć nowe, selektywne związki dla receptora serotoninowego 2B. Niestety, nie udało się znaleźć żadnych związków selektywnych dla receptora 1B, co doktorant starał się uzasadnić w dyskusji, jednakże ta kwestia mogłaby zostać przebadana dokładniej. Poza publikacją, poszczególne etapy tych badań były prezentowane na międzynarodowych konferencjach naukowych.

Lista prac naukowych bezpośrednio związana z doktoratem obejmuje dwie pozycje:

- (1) Substructural Connectivity Fingerprint and Extreme Entropy Machines-A New Method of Compound Representation and Analysis. Rataj K, Czarnecki W, Podlewska S, Pocha A, Bojarski AJ. *Molecules*. 2018 May 23;23(6). pii: E1242. doi: 10.3390/molecules23061242.
- (2) Fingerprint-Based Machine Learning Approach to Identify Potent and Selective 5-HT_{2B}R Ligands. Rataj K, Kelemen A, Brea J, Loza MI, Bojarski AJ, Keseru GM. *Molecules*. 2018 May 10;23(5). pii: E1137. doi: 10.3390/molecules23051137.

Z kolei lista prac naukowych opublikowanych przez Doktoranta w trakcie pracy nad doktoratem obejmuje dodatkowo kolejne pozycje:

- (3) From Homology Models to a Set of Predictive Binding Pockets-a 5-HT_{1A} Receptor Case Study. Warszycki D, Rueda M, Mordalski S, Kristiansen K, Satała G, Rataj K, Chilmonczyk Z, Sylte I, Abagyan R, Bojarski AJ. *J Chem Inf Model*. 2017 Feb 27;57(2):311-321. doi: 10.1021/acs.jcim.6b00263. Epub 2017 Jan 18.
- (4) GPCRdb: an information system for G protein-coupled receptors. Isberg V, Mordalski S, Munk C, Rataj K, Harpsøe K, Hauser AS, Vroiling B, Bojarski AJ, Vriend G, Gloriam DE. *Nucleic Acids Res*. 2017 Mar 17;45(5):2936. doi: 10.1093/nar/gkw1218.
- (5) GPCRdb: the G protein-coupled receptor database - an introduction. Munk C, Isberg V, Mordalski S, Harpsøe K, Rataj K, Hauser AS, Kolb P, Bojarski AJ, Vriend G, Gloriam DE. *Br J Pharmacol*. 2016 Jul;173(14):2195-207. doi: 10.1111/bph.13509. Epub 2016 Jun 3. Review.
- (6) Multiple conformational states in retrospective virtual screening - homology models vs. crystal structures: beta-2 adrenergic receptor case study. Mordalski S, Witek J, Smusz S, Rataj K, Bojarski AJ. *J Cheminform*. 2015 Apr 9;7:13. doi: 10.1186/s13321-015-0062-x. eCollection 2015.
- ~~(7) Multi-Step Protocol for Automatic Evaluation of Docking Results Based on Machine Learning Methods--A Case Study of Serotonin Receptors 5-HT₆ and 5-HT₇. Smusz S, Mordalski S, Witek J, Rataj K, Kafel R, Bojarski AJ. *J Chem Inf Model*. 2015 Apr 27;55(4):823-32. doi: 10.1021/ci500564b. Epub 2015 Apr 8.~~

- (8) Impact of template choice on homology model efficiency in virtual screening. Rataj K, Witek J, Mordalski S, Kosciolatek T, Bojarski AJ. J Chem Inf Model. 2014 Jun 23;54(6):1661-8. doi: 10.1021/ci500001f. Epub 2014 May 21.
- (9) An application of machine learning methods to structural interaction fingerprints--a case study of kinase inhibitors. Witek J, Smusz S, Rataj K, Mordalski S, Bojarski AJ. Bioorg Med Chem Lett. 2014 Jan 15;24(2):580-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.12.017. Epub 2013 Dec 10.

W renomowanych czasopismach, o wysokim współczynniku wpływu (IF) są to zwykle bardzo rygorystyczne oceny. Tak więc włączony do rozprawy dorobek naukowy magistra Krzysztofa Rataja został już oceniony przez wielu ekspertów.

Kandydat uczestniczył w dwóch projektach naukowych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (lista podana przez Doktoranta w języku angielskim):

- 1) PRELUDIUM (2015/17/N/ST6/03578)
- 2) ETIUDA (2016/20/T/NZ2/00510)

Ocena końcowa

W podsumowaniu mojej oceny rozprawy doktorskiej Pana magistra Krzysztofa Rataja stwierdzam, że prezentowany dorobek naukowy rozprawy oceniam wysoko. Biorąc pod uwagę niewątpliwe walory rozprawy doktorskiej, udane połączenie starannie przeprowadzonych prac obliczeniowych na poziomie fizyki i chemii leków oraz bardzo szerokie walory aplikacyjne oceniam rozprawę doktorską mgr Krzysztofa Rataja jako ważny wkład do naszej wiedzy o chemii leków. Oceniam, że rozprawa ta spełnia zwyczajowe i ustawowe wymogi, stawiane rozprawom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, unaocznia ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w chemii oraz pokazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnoszę zatem do Rady Wydziału ~~Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie~~ Pana magistra Krzysztofa Rataja do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Dariusz Plewczynski, prof. UW