

RECENZJA

Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne magistra farmacji **Tomasza Pieńko** zatytułowanej „Mechanizm transportu przez ścianę komórkową *Escherichia coli* koniugatów witaminy B₁₂ i modyfikowanych oligonukleotydów o działaniu przeciwbakteryjnym” (The mechanism of transport of conjugates of vitamin B₁₂ and modified antibacterial oligonucleotides through the *Escherichia coli* cell wall) wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Joanny Trylskiej oraz Pana dr hab. Tomasza Pawińskiego w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Laboratorium Maszyn Biomolekularnych w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego.

W skład recenzowanej rozprawy doktorskiej wchodzi cztery publikacje, których sumaryczny współczynnik oddziaływania IF (ISI Journal Citation Reports), zgodny z rokiem publikacji jest równy 16,249, zaś punktacja MEiN (przed 2019 – MNiSW) wynosi 370. Są to następujące pozycje:

1. T. Pieńko, J. Czarnecki, M. Równicki, M. Wojciechowska, A. J. Wierzba, D. Gryko, D. Bartosik, J. Trylska. Vitamin B₁₂-peptide nucleic acids use the BtuB receptor to pass through the *Escherichia coli* outer membrane. *Biophys. J.*, 120 (4):725-737, 2021. IF₍₂₀₁₉₎ = 3,854; 100 p. MEiN
2. T. Pieńko, J. Trylska. Extracellular loops of BtuB facilitate transport of vitamin B₁₂ through the outer membrane of *E. coli*. *PLoS Comput. Biol.*, 16 (7): e1008024, 2020. IF₍₂₀₁₉₎ = 4,70; 140 p. MEiN
3. T. Pieńko, J. Trylska. Computational methods used to explore transport events in biological systems, *J. Chem. Inf. Model.*, 59 (5): 1772 - 1781, 2019. IF₍₂₀₁₉₎ = 4,549; 100 p. MEiN
4. T. Pieńko, A. J. Wierzba, M. Wojciechowska, D. Gryko, J. Trylska. Conformational dynamics of cyanocobalamin and its conjugates with peptide nucleic acids. *J. Phys. Chem. B*, 121 (14): 2968 - 2979, 2017. IF₍₂₀₁₇₎ = 3,146; 30 p. MNiSW.

Wyniki badań zostały również przedstawione na pięciu konferencjach (trzy postery, dwa wystąpienia ustne). Badania realizowane w ramach niniejszej rozprawy zostały sfinansowane

ze środków Narodowego Centrum Nauki (granty Symfonia UMO-2014/12/W/ST5/00589 i Preludium UMO-2017/27/N/NZ1/00986) i wsparte grantami obliczeniowymi (GA65-16, GA73 -21) z Interdyscyplinarnego Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego Uniwersytetu Warszawskiego.

Jednym z ważniejszych problemów współczesnej farmakoterapii chorób wywołanych przez bakterie jest antybiotykooporność. Można nawet pokusić się o stwierdzenie, że antybiotyki stały się ofiarami własnego sukcesu. Powszechne stosowanie i nadużywanie antybiotyków prowadzi do ograniczenia ich skuteczności w leczeniu chorób wywoływanych przez bakterie. Szacunkowe dane wskazują, że antybiotykooporność przyczynia się każdego roku do śmierci kilku tysięcy Europejczyków. Dynamika zjawiska antybiotykooporności i związane z tym zagrożenie dla zdrowia publicznego przyczyniło się do wypracowania szeregu inicjatyw, których nadrzędnym celem jest przeciwdziałanie temu zjawisku. Jednym z takich działań jest odpowiedzialne stosowanie antybiotyków. Systematyczne pojawianie się opornych szczepów bakterii wymusiło badania nad odkrywaniem, a także tworzeniem nowych półsyntetycznych i syntetycznych cząsteczek o właściwościach antybakteryjnych. W wyniku przeprowadzonych na przestrzeni wielu lat badań powstało wiele zmodyfikowanych molekuł o zwiększonej skuteczności, jednak w dalszym ciągu powoli tracimy skuteczne opcje terapeutyczne. Główny nurt tworzenia nowych antybiotyków to szukanie substancji o podobnym działaniu do antybiotyków stosowanych obecnie. Jednak oprócz weryfikacji znanych, ciągle poszukuje się nowych celów komórkowych działania antybiotyków. Syntetyczne antysensowne oligonukleotydy mające właściwości hamowania procesu syntezy białek niezbędnych do życia bakterii mają szansę stać się w przyszłości antybiotykami nowej generacji. Jednak największym ograniczeniem ich potencjalnego zastosowania jest nieznaczne przenikanie do wnętrza komórek bakteryjnych. Nadzieję dają ostatnie wyniki badań, które wskazują, że peptydowe kwasy nukleinowe (PNA), które są syntetycznymi analogami kwasów nukleinowych, w połączeniu z witaminą B₁₂ są wychwytywane przez komórki bakterii *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*. Zaproponowano, że koniugaty witaminy B₁₂ i PNA transportowane są do wnętrza komórek bakteryjnych za pomocą białka BtuB, jednak mechanizm molekularny tego procesu nie został wyjaśniony.

Magister Tomasz Pieńko podjął się ambitnego zadania dotyczącego zweryfikowania dynamiki konformacyjnej koniugatów witaminy B₁₂ i PNA oraz określenia mechanizmu transportu

wolnej witaminy B₁₂ i koniugatu witaminy B₁₂-PNA przez białko BtuB w komórkach bakterii *Escherichia coli*. Biorąc pod uwagę narastające zjawisko antybiotykooporności z przekonaniem uważam, że podjęty przez Doktoranta temat rozprawy jest w pełni uzasadniony.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została podzielona na pięć rozdziałów: wprowadzenie, wyniki, wnioski i perspektywy, dane uzupełniające oraz oświadczenia współautorów prac. Praca poprzedzona jest zestawieniem danych bibliograficznych czterech publikacji stanowiących podstawę dysertacji na stopień doktora nauk farmaceutycznych oraz streszczeniem w języku angielskim i polskim.

W pierwszym rozdziale dysertacji – wprowadzeniu, mgr Pieńko wyczerpująco omówił zagadnienia stanowiące podstawę teoretyczną prowadzonych badań. Przygotował między innymi historię rozwoju antybiotyków, problem antybiotykooporności oraz potencjalne ścieżki rozwoju nowych leków o właściwościach antybakteryjnych. Główny nacisk położony został na przedmiot zainteresowań naukowych mgr Pieńko, tj. peptydowe kwasy nukleinowe (PNA), w tym ich strukturę chemiczną oraz zastosowanie kliniczne i diagnostyczne. W kolejnych podrozdziałach rozprawy doktorskiej mgr Pieńko rzetelnie uzasadnił podjętą tematykę badawczą oraz przedstawił cele naukowe podjęte w pracy doktorskiej. Aby wyjaśnić mechanizmy transportu przez błonowy konieczne jest zbadanie ich na poziomie atomowym. Stąd też metody obliczeniowe, takie jak dynamika molekularna, są coraz częściej stosowane w celu wyjaśnienia procesu transportu. Magister Tomasz Pieńko przeprowadził gruntowny przegląd literatury dotyczący obliczeniowych metod badania transportu przez białka znajdujące się w błonie komórkowej, w celu wyboru odpowiedniej metodologii podczas pracy naukowej. Zaowocowało to opublikowaniem pracy przeglądowej zatytułowanej „Computational methods used to explore transport events in biological systems”. W artykule tym Doktorant przedstawił różne metody dynamiki molekularnej (MD) i dynamiki Browna (BD), które są najczęściej stosowane do badania transportu komórkowego z udziałem transporterów i kanałów białkowych oraz podał odpowiednie przykłady ich wykorzystania. Co bardzo istotne, mgr Pieńko w przystępny sposób opisał techniczne aspekty omawianych metod, a także przykłady ich nowych wariantów lub kombinacji, które zostały z powodzeniem zastosowane w badaniach dotyczących transportu przez błony biologiczne.

Badania własne mgr Pieńko zaplanował dobrze i konsekwentnie zrealizował, a uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w postaci trzech publikacji oryginalnych o wysokim współczynniku oddziaływania Impact Factor. Poszczególne publikacje przeszły już proces recenzji przed ich przyjęciem do druku. Warto byłoby jednak tak istotną część dysertacji, jaką są wyniki uzupełnić o zwięzłe zaprezentowanie najważniejszych rezultatów wykonanych badań, co podkreśliłoby wartość naukową całej rozprawy.

Pierwszą część rozdziału „Wyniki” stanowi publikacja zatytułowana: „Conformational dynamics of the vitamin B₁₂-peptide nucleic acids conjugates”. Przedstawia ona analizę struktury i dynamiki koniugatów cyjanokobalaminy z monomerem i oligomerem PNA, a także wolnego oligomeru PNA w środowisku wodnym. W badaniach tych wykorzystano metodę dynamiki molekularnej (MD) oraz spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Doktorant wykazał, że w środowisku wodnym koniugaty przyjmują strukturę zwartą i globularną, podobnie do wolnego PNA. Istotnym wynikiem było udowodnienie, że oligomer PNA skoniugowany z witaminą B₁₂ ma wydłużoną strukturę i jest bardziej narażony na działanie rozpuszczalnika. Najważniejszym osiągnięciem tej publikacji jest wykazanie, że cyjanokobalamina przyłączona do oligomeru PNA zwiększa elastyczność PNA w sposób, który mógłby być korzystny dla jego hybrydyzacji z naturalnymi oligomerami kwasu nukleinowego. Wpływ cyjanokobalaminy na właściwości fizykochemiczne PNA może być ważny dla rozpoznania ostatecznego celu molekularnego, a sama witamina B₁₂ wykorzystując własne transportery białek, może również pomóc PNA w penetracji komórek bakteryjnych.

Kolejnym etapem badań Pana magistra Pieńko była analiza transportu witaminy B₁₂ przez receptor BtuB w komórkach bakterii *E. coli* (publikacja pt. „Transport of vitamin B₁₂ through the outer-membrane protein BtuB in Escherichia coli”). W celu przeprowadzenia badań doktorant wykorzystał sterowaną dynamikę molekularną (SMD) i metodę umbrella sampling (US) sprzężoną z Gaussian Force – Simulated Annealing (GF-SA). Umożliwiło to szczegółowe ustalenie transportu kobalaminy przez receptor BtuB oraz wykazało istotną rolę mobilności pętli zewnątrzkomórkowych BtuB dla wiązania i transportu kobalaminy. Istotnym odkryciem Doktoranta jest fakt, że zewnątrzkomórkowe pętle BtuB działają w mechanizmie indukowanego dopasowania podczas wiązania i transportu witaminy B₁₂. Wyniki zaprezentowane w tej publikacji mogą mieć znaczenie w zakresie transportu cząsteczek antybiotyków do komórek bakteryjnych wykorzystujących ten system transportu.

W ostatniej pracy oryginalnej włączonej do dysertacji doktorskiej magister Pieńko ocenił mechanizm transportu koniugatów witaminy B₁₂ z PNA do komórek bakterii *E. coli*. Witamina B₁₂ przenika do komórek bakterii *E. coli* przez układ transportowy zależny od TonB i jest rozpoznawana przez specyficzny dla witaminy B₁₂ receptor BtuB. Wyniki uzyskanych badań wskazują, że transport koniugatu witaminy B₁₂-PNA wymaga receptora BtuB. Zatem można wnioskować, że koniugat przechodzi przez błonę zewnętrzną tą samą drogą, jaką pobierana jest wolna witamina B₁₂. Przeprowadzona analiza wskazuje, że podczas transportu koniugatu witaminy B₁₂ i PNA pętle BtuB dostosowują swój układ do oddziaływania z dużą cząsteczką PNA. Jednak, jak Doktorant wskazuje, to zdolność PNA do dopasowania swojej struktury w zależności od środowiska jest kluczowa dla przenikania koniugatu przez BtuB. W wodzie PNA jest ciasno zwinięte, natomiast w trakcie transportu rozwija się i oddziałuje z aminokwasami wewnątrz białka BtuB. Do pozostałych istotnych osiągnięć Doktoranta należy zaliczyć wykazanie, że transport koniugatu jest procesem korzystnym energetycznie oraz, co istotne, procesem jednokierunkowym, przebiegającym do wnętrza komórki.

W skład rozprawy doktorskiej Pana magistra Pieńko wchodzi także trójstronicowy rozdział obejmujący wnioski oraz perspektywy, w którym magister Pieńko przedstawia swoje aktualnie prowadzone badania oraz stawia nowe hipotezy badawcze w zakresie transportu witaminy B₁₂ i jej koniugatów PNA w komórkach bakteryjnych. Wszystko to świadczy o rzetelnym zrozumieniu tematu, konsekwencji w realizacji zmierzonego celu, umiejętności zadawania pytań oraz poszukiwania odpowiedzi na nie. Na podstawie przygotowanej dysertacji można wnioskować, że doktorant wykazuje dobre zrozumienie zagadnień teoretycznych z zakresu tematu, potrafi dobrze zaplanować badania własne i konsekwentnie je zrealizować oraz potrafi podsumować i krytycznie omówić wyniki w odniesieniu do efektów uzyskanych przez innych autorów. Celowym w moim odczuciu byłoby uzupełnienie dysertacji o zwięzłą charakterystykę stosowanych w badaniach przez Doktoranta metod.

Piśmiennictwo jest dobrane odpowiednio i liczy 52 pozycje, w większej części pochodzące z ostatnich dziesięciu lat. Należy jednak podkreślić, że Doktorant odwołuje się także do pierwszych źródłowych publikacji, które stanowią kroki milowe w zakresie transportu cyjanokobalaminy w komórkach bakteryjnych. Załączone pozycje bibliograficzne to głównie literatura naukowa, opublikowana w znanych, liczących się czasopismach. Dobór literatury

uważam za odpowiedni a jej wykorzystanie we wstępie dysertacji potwierdza umiejętność korzystania z zasobów piśmiennictwa fachowego.

Do pracy dołączone zostały oświadczenia współautorów, które wskazują na wiodący udział magistra w przygotowaniu prac. Magister Pieńko brał udział w opracowaniu koncepcji i planu badań, wykonał oraz interpretował wyniki analiz komputerowych. Przygotowywał także przeważającą większość wykresów i rycin, napisał wstępne wersje publikacji oraz sporządził materiały uzupełniające.

Rozprawa przygotowana jest z dużą starannością, napisana jest precyzyjnym językiem i trudno dopatrzyć się jakichkolwiek błędów, w tym także językowych czy edytorskich (wyjątkiem są podwójne spacje w kilkunastu miejscach). Recenzowana dysertacja zasługuje na szczególne uznanie, dowodzi o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym oraz ogromnej biegłości w zakresie modelowania molekularnego Pana magistra. Chciałabym podkreślić, że wartość merytoryczna przedłożonej rozprawy doktorskiej jest wysoka. Podsumowując, podjęcie przez magistra Pieńko niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne z punktu widzenia aplikacyjnego. Postawione cele badawcze pracy doktorskiej zostały wykonane, a uzyskane oryginalne wyniki mają charakter poznawczy i wnoszą znaczący wkład w rozwój dziedziny.

Wnioski końcowe

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska zatytułowana „The mechanism of transport of conjugates of vitamin B₁₂ and modified antibacterial oligonucleotides through the *Escherichia coli* cell wall” spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Na tej podstawie wnioskuję do **Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego** o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie **mgr farm. Tomasza Pieńko** do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk medycznych i o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Jednocześnie ze względu na wysokie wartości naukowe rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie.