

Data: Toruń, 30 marca, 2021

L. Dz.

Prof. dr hab. Wiesław Nowak
Katedra Biofizyki
Instytut Fizyki
Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu
87-100 Toruń, ul. Grudziądzka 5
(wiesiek@umk.pl)

**RECENZJA rozprawy doktorskiej
Mgr. farm. Tomasza Pieńko pt.**

**“The mechanism of transport of conjugates of vitamin B12 and modified
antibacterial oligonucleotides through the *Escherichia coli* cell wall”**

W XXI wieku trudno jest sobie wyobrazić świat bez antybiotyków. Jednak powszechne nadużywanie tych jakże skutecznych związków chemicznych w praktyce medycznej może sprawić, że w wielu stosunkowo prosto uleczalnych przypadkach medycyna stanie się bezradna. Bakterie mają zdolność do uodporniania się na wiele rodzajów antybiotyków, zatem tylko intensywne poszukiwanie nowych klas związków chemicznych prowadzących do selektywnej śmierci komórek bakteryjnych, bez znacznych skutków ubocznych, daje nadzieje na utrzymanie w gotowości naszego arsenału do walki z chorobami.

Praca doktorska mgr Tomasza Pieńko poświęcona jest badaniu mechanizmów transportu specyficznych nukleotydów, które mają duży potencjał jako antybiotyki kolejnej generacji. Przedmiotem zainteresowania doktoranta są peptydowe kwasy nukleinowe (PNA). W odróżnieniu od klasycznych DNA czy RNA, szkieletem biopolimeru nie jest łańcuch fosforanowo-cukrowy, lecz polimer oparty na merach N-(2-aminoetylo)-glicyny, połączonych wiązaniami peptydowymi. Każda podjednostka może mieć jako grupę boczną jedną z zasad nukleinowych (A,T,C,G). PNA ma korzystne właściwości chemiczne: jest stabilny, nawet w środowisku kwaśnym, odporny na trawienie enzymami, a przede wszystkim zdolny do parowania np. z RNA. Od ponad 20 lat oligonukleotydy PNA są badane jako potencjalne antybiotyki. Projektowanie potencjalnych leków polega na tym, że w tych związkach dobiera się odpowiednie „antysensowne” sekwencje do mRNA tak, aby np. zablokować selektywnie ekspresję genów *Staphylococcus aureus*. Antybiotyk oparty na PNA, aby mógł zadziałać, musi być dostarczony do komórki bakteryjnej. Nie jest to trywialne zadanie. Nie ma takich PNA wykorzystywanych w przyrodzie i nie są znane mechanizmy efektywnego transportu PNA do wnętrza komórek.

Doktorant, zapewne za namową promotorów Prof. dr hab. Joanny Trylskiej i Dr hab. Tomasza Pawińskiego, przy wydatnym udziale pomysłów prof. Doroty Gryko, zajął się zbadaniem oryginalnego zagadnienia: transportu oligomerów PNA przy pomocy wehikułu molekularnego – witaminy B₁₂ (kobalaminy). Niektóre bakterie (np. *E. Coli*, *Salmonella Typhimurium*) mają wydajne mechanizmy transportu B₁₂ do swojego wnętrza. Zatem, gdyby tak podsunąć bakterii kawałek PNA okraszony przynętą, to może się „złakomi” i poczęstuje się zatrutą przekąską? Strategia ta wydaje się sensowna, zwłaszcza, że niedawne eksperymenty pokazują, że taki transport koniugatów B₁₂-PNA jest możliwy. Pan mgr T. Pieńko zajął się w swojej rozprawie rozpoznawaniem mechanizmu tego transportu na poziomie molekularnym.

Sam pomysł pracy doktorskiej i temat uważam za świetny, bardzo dobrze dobrany, ważny i ambitny. Jako główną metodę badawczą wybrano bardzo mi bliskie modelowanie molekularne dynamiki (MD) tych biopolimerów. W zasadzie metody MD znane są od wielu lat, pięknie się rozwijają, m.in. dzięki ogromnemu spadkowi ceny mocy obliczeniowych i zasobów komputerowych, jednak od razu widać, że postawiony doktorantowi temat nie jest trywialny. Dwa główne problemy są następujące:

(1) nie ma dobrze ugruntowanych modeli B₁₂-PNA;

(2) nie ma modeli transportu przez białkowy system bakteryjny BtuB, który jest duży i złożony. Doktorant bardzo dobrze poradził sobie z tymi problemami dzięki czemu zebrał wyniki badań w postaci czterech obszernych publikacji składających się na recenzowaną rozprawę. Uważam, że główne cele rozprawy, jakimi było: (a) zbadanie do jakiego stopnia witamina B₁₂ wpływa na konformacje PNA w koniugatach; (b) określenie mechanizmu transportu witaminy B₁₂, a następnie układu B₁₂-PNA przez zewnętrzną błonę bakterii *Escherichia coli* przez por tworzony za pomocą białka BtuB zostały w pełni osiągnięte. Tytuł rozprawy dobrze oddaje jej zawartość.

Praca doktorska powstała na Wydziale Farmacji Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (Zakład Chemii Leków) oraz w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego (Laboratorium Maszyn Biomolekularnych), pod kierunkiem, odpowiednio, Pana dr hab. Tomasza Pawińskiego i Pani prof. dr hab. Joanny Trylskiej. Napisana jest w języku angielskim (b. poprawnym), składa się z Streszczeń (PL, ENG), Wykazu publikacji ((4 z doktoratu +8 innych!) i konferencji (5, w tym USA), Wstępu (Rozdział 1, 12 stron), Rozdziału 2 z wynikami podzielonego na trzy sekcje (cykl 3 publikacji, 60 stron b. drobnego druku), Rozdziału 3 zawierającego wnioski z rozprawy i perspektywy dalszych badań), oraz wydzielonego w formie Rozdziału 4 zestawu materiałów dodatkowych (SI), zwykle zamieszczanych „on line” przy publikacjach - 46 stron, głównie wykresy i ryciny). W Rozdziale 5 zamieszczono starannie przygotowany wykaz oświadczeń współautorów publikacji składających się na rozprawę, z konkretnie i merytorycznie zaznaczonymi wkładami poszczególnych autorów. W oparciu o te oświadczenia wkłady doktoranta do poszczególnych publikacji kształtują się na poziomie 90%, 50%, 85%, i 50%, wszędzie jest On pierwszym autorem, zatem nie mam wątpliwości, że są one dominujące. Tutaj jest okazja, by odnieść się do często wymaganego szacowania wkładu procentowego autorów. Jak zapewne wszyscy wiemy, jest to zabieg czysto administracyjny i „niefizyczny”, ponieważ nie ma zdefiniowanej jednostki „wkładu do publikacji” (może wprowadzić nowa jednostkę, np. 1 Nowak??), ani procedury jego obliczania czy lepiej pomiaru, to określenie wkładu współautora na poziomie 3 % pozostawię bez komentarza. „Trzeba” - to podajemy, jednak błąd takiego oszacowania moim zdaniem jest nieuchronny. W załączonych oświadczeniach są na szczęście opisy co kto zrobił, i to pozwala mi bez wątpliwości ocenić ogromny wkład doktoranta w uzyskanie prezentowanych wyników.

Rdzeń rozprawy stanowią następujące publikacje:

- [1] T. Pienko, 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.
- [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.
- [3] T. Pieńko, J. Trylska. Computational methods used to explore transport events in biological systems, *J. Chem. Inf. Model.*, 59(5):1772-1781, 2019.
- [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.

Rozdział 1, zawiera jasno i zgrabnie napisane wprowadzenie w tematykę badawczą. Autor streszcza historię rozwoju antybiotyków, omawia przykładowy mechanizm lekooporności przeciwko antybiotynom β -laktamowym na przykładzie bakterii Gram-ujemnej, prezentuje witaminę B₁₂ oraz szkicuje mechanizm transportu (dwuetpowy) B₁₂, który jest najlepiej poznany dla *Escherischia coli*. W rozdziale tym jasno jest postawiony główny problem badawczy: w jaki sposób B₁₂ z przyłączonym PNA może dostawać się do wnętrza bakterii, zwłaszcza jak przechodzi przez zewnętrzną błonę komórkową. Zgodnie z wymaganiami formalnymi Wydziału, w rozdziale wstępnym zamieszczona jest obszerna praca przeglądowa [1] na temat metod obliczeniowych stosowanych do badania zjawisk transportowych w układach biologicznych. Autorzy koncentrują się na przeglądzie metod stosowanych do transportu przez błony komórkowe i dlatego zapewne nie wspominają o niedawnych pracach, m.in., autora tej recenzji, poświęconych modelowaniu transportu ligandów w białkach ([Ligand diffusion in proteins via enhanced sampling in molecular dynamics](#), J Rydzewski, W Nowak, Physics of Life Reviews 22, 58-74). Z całej gamy dostępnych metod MD więcej uwagi poświęcono (i słusznie) metodom tzw. wzmocnionego próbkowania (*enhanced sampling*). Badanie przechodzenia dużego indywiduum, jakim może być np. cząsteczka antybiotyku, przez mały otwór w kanale transportowym bakterii metodą klasycznej MD wymagałoby bardzo długich i niedostępnych praktycznie czasów symulacji. Stosuje się zatem rozmaite zabiegi, prowadzące się głównie do przykładanie „sztucznych sił” wymuszających zachodzenie zjawisk normalnie rzadkich, w krótkim czasie (np. 100 ns), dostępnym symulacjom komputerowym. Znaczna część wyników doktoranta oparta jest na takim nierównowagowym podejściu, zatem omówienie tych właśnie metod w kontekście transportu przez błony, w rozdziale wstępnym uważam za bardzo trafne.

Artykuł napisany jest ładnie, zwięzłym i informatywnym językiem, odwołuje się do dokładnie 100 na ogół bardzo aktualnych publikacji oryginalnych. Na pewno dowodzi bardzo dobrej orientacji kandydata do stopnia naukowego doktora w metodach obliczeniowych ważnych dla prowadzonych projektów. Bardzo pomysłowy jest abstrakt graficzny. Drobne zastrzeżenie może budzić jedynie sam skład omawianego artykułu przeglądowego, przez to, że umieszczono Tabelę 1 na samym początku, a jest tam cała lista odnośników do literatury, zatem cytowania w trakcie czytania tekstu pojawiają się dość losowo, czyli nie w rosnącym porządku. Oczywiście to już była decyzja redakcji jak złożyć ten artykuł w druku. Czasopismo w jakim artykuł się ukazał (J Chem Inf Model) ma b dobrą renomę w branży i 140 pkt na liście ministerialnej (nawet po niedawnych modyfikacjach punktacji).

Rozdział 2, zawierający oryginalne wyniki, otwiera praca [2] poświęcona zbadaniu dynamiki konformacyjnej koniugatu kobalaminy z 14-to członowym PNA podczepionym linkerem. Wcześniej nigdy taki układ nie był modelowany. Wyniki symulacji MD korelują z prezentowanymi jednocześnie wynikami badan techniką NMR (widma ROESY). Generalny wniosek jest taki, że postać konformacyjna PNA zależy od tego czy jest on połączony z B₁₂ czy nie. Autorzy sugerują, że bardziej zwarta konformacja PNA w koniugacie może ułatwiać transport tego układu do wnętrza bakterii. Wyniki dla mnie nie są zaskakujące, system z tak dużą liczbą stopni swobody, elastyczny, w roztworze wodnym na pewno ma sporą swobodę konformacyjną. Obserwowane oddziaływania stakingowe pomiędzy zasadami też są „spodziewane”. Jednak ocena tego, jakie konformacje dominują i co warto wziąć jako punkt startowy do badania zjawisk transportowych – to już wymaga zrobienia tych przynajmniej mikrosekunowych obliczeń symulacyjnych. W publikacji jest wzmianka o obliczeniach rozkładu ładunku w B₁₂ programem Gaussian09. Byłbym ciekaw (na obronie) jaka metoda obliczeniowa konkretnie została wykorzystana, wg

mnie nie jest to trywialne zagadnienie jeśli chce się modelować układ organiczny z jonem kobaltu w centrum.

W publikacji [3] pojawiają się dwa ważne wątki: (1) Badanie roli zewnętrznych pętli białka transportowego BtuB (2) Propozycja nowej metody obliczeniowej MD – GF-SA (*Gaussian Force Simulated Annealing*). Praca ta robi bardzo dobre wrażenie i podobała mi się, bowiem interesuję się nanomechaniką białek. Oczywiście wiemy, że wyniki pochodzą z modelowania i należy podchodzić do wniosków z ostrożnością, są one jednak ciekawe. Okazuje się, że transport badanego układu przez BtuB nie jest możliwy bez poważanego rozwinięcia części transportera przesłaniającej światło „pora”. Zwykle obliczenia profili energii swobodnej (US) nie dają tu zadowalających rezultatów, trzeba było opracować metodę (właśnie GF-SA) znacznie przyspieszającą próbkowanie przestrzeni konformacyjnej w wybranych rejonach. To czy taka procedura, jednak mocno nierównowagowa, dobrze oddaje to, co się dzieje w naturze, jest tematem dyskusji. Autorzy postulują, że musi być silna adaptacja pętli, i ja podzielałam ten pogląd. Do badań tego zagadnienia włączają się inne grupy. W niedawnej pracy (Nyenhuis, D. A., T. D. Nilaweera, and D. S. Cafiso. 2020. *Native cell environment constrains loop structure in the Escherichia coli cobalamin transporter BtuB*. *Biophys.J.*119:1550–1557.) pokazano, że w naturalnym środowisku zewnętrzne pętle BtuB nie wykazują dużej ruchliwości i pełnią raczej rolę selekcyjną przy transporcie kobalaminy. Byłbym ciekaw opinii doktoranta, jak wyniki modelowania pętli „pasują” do tych nowych danych doświadczalnych? Czy fakt zaniedbania wpływu ATP na proces transportu przez BtuB (jest on aktywny) ma tu jakieś znaczenie?

Omawiana praca [3] zwiera mnóstwo szczegółowych danych z doświadczeń numerycznych, nie ma potrzeby opisywania ich w recenzji, jest to jednak kopalnia informacji dla osób zajmujących się w przyszłości badaniem tego ważnego układu białkowego jakim jest BtuB. Warto natomiast wspomnieć na czym polega nowatorskość pomysłu z metodą GF-SA. Podejście inspirowane jest metodą Simulated Annealing (SA) czyli symulowanego wyżarzania. Dla pokonania barier energetycznych przeszkadzających w zmianach konformacji białek i pełnym przeszukiwaniu przestrzeni konformacyjnej stosuje się w SA ponoszenie temperatury, która w toku dalszych symulacji się obniża (schładzanie). Tutaj doktorant wraz z zespołem zaproponowali by losowo (z rozkładu Gaussa) wybierać kąty torsyjne determinujące ułożenie pętli, wydajnie generować różne ich ustawienia i dopiero potem minimalizować energię układu. Pomysł jest w zasadzie prosty, ale bardzo użyteczny i pomógł dostać to o co w projekcie chodziło – rozsądne próbkowanie w rozsądnym czasie. Wykonano przy tym nie tylko pracę koncepcyjną ale i programistyczną. Zakładam, że metoda jest ogólnodostępna i może się przydać innym badaczom, a to może być trwałym wkładem doktoranta w dziedzinę modelowania biomolekuł i leków.

Praca [4] jest zwieńczeniem projektu doktorskiego, bowiem tutaj opisane są badania układu o jaki chodziło: transport witaminy B₁₂ wyposażonej w „przyczepkę” w postaci peptydowego kwasu nukleinowego (koniugat), który ma być bronią przeciwko bakteriom. Należy zauważyć, że w publikacji tej znajdziemy wiele oryginalnych wyników doświadczalnych, skupię się jedynie na omówieniu części związanej z modelowaniem. Model układu biologicznego był bardzo heterogeniczny i samo zbudowanie go uważam za poważne osiągnięcie doktoranta. Zebranie wielu różnych parametrów, ustawienie systemu w modelu błony, zadbanie o odpowiednie stany protonowania aminokwasów polarnych i kwasowo-zasadowych - to wymaga bardzo dobrej orientacji w warsztacie biofizyki obliczeniowej. Dla mnie nowością w tym modelu było zastosowanie bardzo złożonego składu błony modelowej oraz zadbanie o to, by była ona asymetryczna, b. rzadko widzi się to w publikacjach tego typu, a takie podejście, może nie

wnosi aż tak silnych efektów na dynamikę jednak podnosi znacznie realizm modelu. Doświadczalni biofizycy coraz więcej uwagi przykładają do roli składu błon biologicznych w regulacji fizjologii organizmów, np. taki fosfolipid PIP2 decyduje o działaniu kanałów potasowych Kir6.2/SUR1, zatem przyjęcie tej trudnej i pracochłonnej strategii uznaję za b. słuszne. Cały układ liczył ok. 250 000 atomów, co jeszcze niedawno stanowiło wielkie wyzwanie obliczeniowe. Właściwe obliczenia, w tym termodynamiczne, poprzedzało otwarcie drogi dla koniugatu B₁₂-PNA poprzez wstępne rozwinięcie jednej w wewnętrznych domen BtuB. Może dokładnie tego nie zrozumiałem, ale zdaje się, że taki zabieg, dość drastyczny, można uzasadnić faktem, że białko transportowe wchodzi w interakcje z jeszcze innym białkiem z błony wewnętrznej (TonB) i doktorant w ten właśnie sposób utorował drogę do transportu PNA. Następnie znów stosowano GF-SA by optymalizować ułożenie pętli przy wejściu do kanału. Korzystając z pozycji konformacji z SMD, wykonano też obliczenia profilu energii swobodnej wzdłuż osi kanału (ale tak naprawę w zmiennych kolektywnych) i oceniono jaki jest mechanizm molekularny i energetyka procesu transportu. Okazało się że ten koniugat B₁₂-PNA przechodzi do wnętrza (peryplazmy) i przejście to jest faworyzowane energetycznie. Bariera dla tego procesu wynosi ok. 12 kcal/mol, a do powrotu na zewnątrz jest ponad 2 razy wyższa (29 kcal/mol). Uzyskano zatem informację, jak przebiega transport i jaki jest jego koszt energetyczny.

Wyniki z pracy [4] opublikowano w prestiżowym Biophys. J. i na pewne będą one zauważone i dyskutowane. Konkluzja tej pracy jest taka, że pomysł dostarczania leku przy pomocy witamy B₁₂ jako przynęty jest w przypadku PNA sensowny, i można zapewne rozszerzyć tę strategię na inne biologicznie aktywne związki. Nie wiem tylko, czy za dużo witamy B₁₂ w organizmie nie zaszkodzi? Byłbym też ciekaw dowiedzieć się na obronie, Jak doktorant wyobraża sobie „odcięcie” główicy PNA od nośnika B₁₂ wewnątrz komórki? PNA musi być wolny, aby hybrydyzował z RNA i wywoływał efekt w bakterii.

Strona redakcyjna recenzowanej rozprawy nie budzi zastrzeżeń i jest wzorowa. Szukałem jakich tradycyjnych literówek i może przez wiosenny brak mojej koncentracji niczego nie znalazłem. Jakość rysunków też jest bardzo dobra. Wnioski zawarte w ostatniej części są podane jasno, z odpowiednim krytycyzmem, zaś plan dalszych badań uważam za ciekawy i możliwy do zrealizowania.

Cieszę się, że Wydział Farmaceutyczny WUM zdecydował się wesprzeć tego typu interdyscyplinarny projekt doktorski, bowiem jest to podejście nowoczesne, które oczywiście może być krytykowane („to tylko teoria”), ale jest mocno widoczne w literaturze światowej, Naiwnością jest sądzić, że będziemy komputerowo generować leki na wszystko, natomiast błędem byłoby nie zrozumieć molekularnych procesów dostarczania leków do komórek i istoty ich selektywności, czy powinowactwa do celów biologicznych. Ten doktorat pokazuje, że mamy lokalnie duży potencjał badawczy w tym ważnym dla nauki i społeczeństwa obszarze.

Na zakończenie przytoczę cytaty ze starożytnego dzieła chińskiego (ok. 500 lat BC) „Sztuka Wojny” Sun Tzu: „Zbrojenie się zapowiada wojnę, a wojna jest kwestią wielkiej wagi. Ktoś, kto się w nią wplątał bez uprzedniego przygotowania, może być poczytywany za głupca”

Pan mgr farm. Tomasz Pieńko, wraz zespołem, nie może być „poczytywany za głupca”: wojna z patogenami trwa (choćby takimi jak wirus SARS-Cov-2) i czas spędzony nad doskonaleniem broni farmaceutycznej był w mojej opinii czasem mądrze spędzonym.

KONKLUZJA

Pan mgr Tomasz Pieńko, przygotował bardzo dobrą, interdyscyplinarną rozprawę doktorską. Wykonał dużą pracę zdobywając kompetencje w dziedzinie modelowania komputerowego i zastosował je umiejętnie do zdobycia nowych informacji mechanizmie transportu potencjalnych leków. Uzyskał wartościowe wyniki i opublikował je w kilku specjalistycznych czasopismach o światowym zasięgu.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. farm. Tomasza Pieńko stanowi oryginalne rozwiązanie trudnego problemu naukowego. Demonstruje ona dużą wiedzę i umiejętności praktyczne doktoranta w badaniu, a zwłaszcza w modelowaniu, białek, witaminy B₁₂ i kwasów nukleinowych. Rozprawa i dorobek publikacyjny dowodzą, że doktorant ma umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. **Rozprawa w pełni spełnia wymagania ustawowe oraz zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie Pana magistra farmacji Tomasza Pieńko do dalszych etapów postępowania prowadzącego do uzyskania stopnia naukowego doktora.**

*Analizując jakość prowadzonych badań, charakter interdyscyplinarny, ich stopień trudności technicznej, liczbę uzyskanych wyników opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach specjalistycznych (Biophys. J., PLOS Comp. Biol.) z przekonaniem **wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy**, zgodnie ze zwyczajami panującymi na Wydziale.*



Wiesław Nowak, prof. zw.