

Tytuł rozprawy doktorskiej:

- w języku polskim:

*"Mechanizm transportu przez ścianę komórkową *Escherichia coli* koniugatów witaminy B₁₂ i modyfikowanych oligonukleotydów o działaniu przeciwbakteryjnym"*

- w języku angielskim:

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

Rozprawa doktorska została przygotowana w:

- Zakładzie Chemii Leków na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego,
- Laboratorium Maszyn Biomolekularnych w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Streszczenie

Narastająca oporność bakterii na klasyczne antybiotyki jest jednym z głównych wyzwań dla współczesnego systemu ochrony zdrowia. Wobec tego, istnieje konieczność opracowania leków przeciwbakteryjnych działających na nowe cele molekularne. Interesującą grupą związków, które mają szansę stać się w przyszłości antybiotykami nowej generacji są antysensowne modyfikowane oligonukleotydy. Niestety, ich aktywność jest ograniczona przez słabe przenikanie do wnętrza komórek bakteryjnych.

Ostatnie badania wykazały, że oligomery peptydowego kwasu nukleinowego (PNA) połączone z witaminą B₁₂ (zwaną również kobalaminą) są pobierane przez komórki bakterii *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium*. Pojawiła się hipoteza, że koniugaty witaminy B₁₂ i PNA wykorzystują zewnątrz błonowe białko BtuB do przechodzenia przez ścianę komórkową bakterii, analogicznie do wolnej witaminy B₁₂. Niestety, mechanizm molekularny tego transportu był dotychczas nieznan. Co więcej, nie było nawet wiadomo, w jaki sposób witamina B₁₂ przechodzi przez białko BtuB i jak witamina B₁₂ połączona z PNA wpływa na jego strukturę.

Mając na uwadze powyższe, głównymi celami niniejszej pracy było zbadanie dynamiki konformacyjnej koniugatów witaminy B₁₂-PNA, a także mechanizmu transportu wolnej witaminy B₁₂ i koniugatu witaminy B₁₂-PNA przez białko BtuB u *Escherichia coli*.

Aby rozwiązać powyższe problemy badawcze, wykorzystałem metody pełnoatomowej dynamiki molekularnej (MD). Do symulacji koniugatów witaminy B₁₂-PNA w wodzie zastosowałem klasyczną MD. Zaobserwowałem, że w środowisku wodnym koniugaty przyjmują strukturę zwartą i globularną, podobnie do wolnego PNA. Jednakże, po połączeniu z kobalaminą, PNA częściej wydłuża swoją strukturę, silniej oddziałując z rozpuszczalnikiem, niż w stanie wolnym. Przewiduje się, że takie zachowanie koniugatów witaminy B₁₂-PNA może być korzystne w przypadku ich aktywności biologicznej.

W przypadku symulacji dotyczących transportu witaminy B₁₂ i koniugatu witaminy B₁₂-PNA przez BtuB wykorzystałem sterowaną dynamikę molekularną (SMD) i metodę *umbrella sampling* (US) sprzężoną z *Gaussian Force - Simulated Annealing* (GF-SA). Metodę GF-SA opracowałem w celu przyspieszenia dynamiki konformacyjnej zewnątrzkomórkowych pętli BtuB i PNA w koniugacie wzdłuż drogi transportu.

Dzięki zastosowaniu SMD, przeprowadziłem częściowe rozwinięcie domeny luminalnej białka BtuB, która wypełnia jego światło. W ten sposób powstał wąski kanał, przez który mogła przedostać się witamina B₁₂ i jej koniugat z PNA. Następnie zastosowałem metodę SMD, aby przyspieszyć ich transport przez BtuB przy ustalonej pozycji rozwiniętej domeny luminalnej.

Metoda GF-SA pozwoliła mi odkryć, że zewnątrzkomórkowe pętle BtuB działają w mechanizmie indukowanego dopasowania podczas wiązania i późniejszego przenikania witaminy B₁₂ i koniugatu witaminy B₁₂-PNA. W trakcie transportu kobalaminy, pętle zbliżają się do siebie "wpychając" ją do wnętrza białka. W przypadku koniugatu witaminy B₁₂-PNA, pętle BtuB również dostosowują swój układ do oddziaływania z dużą cząsteczką PNA. Jednakże, to zdolność PNA do dopasowania swojej struktury w zależności od środowiska jest kluczowa dla przenikania koniugatu przez białko. Podczas gdy w wodzie PNA jest ciasno zwinięte, w trakcie transportu rozwija się, tworząc szereg oddziaływań z aminokwasami wewnątrz białka BtuB.

Wygenerowana przez SMD droga przenikania witaminy B₁₂ i koniugatu witaminy B₁₂-PNA została skorygowana za pomocą symulacji US. Mimo to, dopiero po sprzężeniu metody US z GF-SA, uzyskałem stabilny profil energii swobodnej ich transportu. Zaobserwowałem, że przenikanie kobalaminy i jej koniugatu z PNA do

wnętrza białka jest procesem korzystnym energetycznie. Z kolei, rozwinięta domena luminalna zapewnia dodatkową stabilizację po stronie peryplazmatycznej, dzięki czemu transport witaminy B₁₂ i koniugatu witaminy B₁₂-PNA jest praktycznie jednokierunkowy - do wnętrza komórki.

Przeprowadzone w ramach tej pracy symulacje MD wykazały, że struktura i dynamika białka BtuB warunkuje wydajny i specyficzny transport witaminy B₁₂ przez błonę zewnętrzną bakterii *E. coli*. Pokazały one również, że białko BtuB może przystosować się do przenoszenia tak dużej cząsteczki, jaką jest koniugat witaminy B₁₂ i PNA. W konsekwencji, zrozumienie mechaniki działania BtuB może znacząco przyczynić się do opracowania nowych, skutecznych strategii w walce z bakteriami chorobotwórczymi.