

### **Recenzja**

materiałów habilitacyjnych dr Wiesława Świątnickiego pt.

**„Modelowanie białek i ich kompleksów z ligandami oraz zastosowanie wyników do opracowania terapeutyków i szczepionek”**

w języku angielskim

**”Modeling of proteins and their complexes with ligands and using the results to develop therapeutics and vaccines ”**

oraz osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, zatytułowanego

**Opracowanie drobnocząsteczkowych inhibitorów systemów sekrecji typu III z *Yersinii pestis* i enteropatogennej *E. Coli***

jak również aktywności naukowej Habilitanta i całości jego dorobku naukowego.

W ciągu ostatniej dekady w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w szczególności w dyscyplinie nauk biologicznych, obserwuje się bardzo intensywny rozwój prac łączących badania eksperymentalne wspomagane metodami molekularnego modelowania i bioinformatyki. Taka strategia pozwala na efektywną analizę złożonych biomolekularnych obiektów oraz procesów w których one uczestniczą, jak również na pełniejszą możliwość ich eksperymentalnej weryfikacji. Główne obszary zainteresowań Habilitanta to:

- systemy sekrecji patogenów i ich mechanizmy transportu białek,
- analiza systemów biologicznych i jej zastosowanie w projektowaniu leków i szczepionek,
- zastosowanie przesiewowych metod obliczeniowych w ramach strategii *gene-to-drug design*.

Badania tego typu znajdują praktyczne zastosowania w biotechnologii i biomedycynie.

### **Ocena osiągnięcia naukowego habilitanta**

Podstawą oceny osiągnięcia naukowego dr Świątnickiego są materiały habilitacyjne zawierające m.in. autoreferat oraz jedenaste współautorskich publikacji w większości których jest on wiodącym współautorem.

Publikacje są następujące (procentowa ocena wkładu Autora oraz liczba cytowań w nawiasach):

1. Bzdion L, Krezel H, Wrzeszcz K, Grzegorek I, Nowinska K, Chodaczek G, **Swietnicki W**. Design of small molecule inhibitors of type III secretion system ATPase EscN from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Acta Biochim Pol.* 2017;64(1):49-63. doi: 10.18388/abp.2016\_1265. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27864920.

- IF=1.46 (75%, 9)
2. **Swietnicki W**, Carmany D, Retford M, Guelta M, Dorsey R, Bozue J, Lee MS, Olson MA. Identification of small-molecule inhibitors of *Yersinia pestis* Type III secretion system YscN ATPase. *PLoS One*. 2011;6(5):e19716. doi: 10.1371/journal.pone.0019716. Epub 2011 May 18. PMID: 21611119; PMCID: PMC3097197.  
IF=2.74 (75%, 39)
  3. **Swietnicki W**, O'Brien S, Holman K, Cherry S, Brueggemann E, Tropea JE, Hines HB, Waugh DS, Ulrich RG. Novel protein-protein interactions of the *Yersinia pestis* type III secretion system elucidated with a matrix analysis by surface plasmon resonance and mass spectrometry. *J Biol Chem*. 2004 Sep 10;279(37):38693-700. doi: 10.1074/jbc.M405217200. Epub 2004 Jun 22. PMID: 15213222.  
IF=4.24 (75%, 27)
  4. Raab R, **Swietnicki W**. *Yersinia pestis* YopD 150-287 fragment is partially unfolded in the native state. *Protein Expr Purif*. 2008 Mar;58(1):53-60. doi: 10.1016/j.pep.2007.11.001. Epub 2007 Nov 17. PMID: 18160307.  
IF=1.51 (75%, 5)
  5. Bozue J, Cote CK, Webster W, Bassett A, Tobery S, Little S, **Swietnicki W**. A *Yersinia pestis* YscN ATPase mutant functions as a live attenuated vaccine against bubonic plague in mice. *FEMS Microbiol Lett*. 2012 Jul;332(2):113-21. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02583.x. Epub 2012 May 21. PMID: 22537022.  
IF=1.99 (75%, 9)
  6. **Swietnicki W**, Powell BS, Goodin J. *Yersinia pestis* Yop secretion protein F: purification, characterization, and protective efficacy against bubonic plague. *Protein Expr Purif*. 2005 Jul;42(1):166-72. doi: 10.1016/j.pep.2005.02.016. Epub 2005 Mar 17. PMID: 15939303.  
IF=1.51 (375%, 31)
  7. **Swietnicki W**, Petersen R, Gambetti P, Surewicz WK. pH-dependent stability and conformation of the recombinant human prion protein PrP(90-231). *J Biol Chem*. 1997 Oct 31;272(44):27517-20. doi: 10.1074/jbc.272.44.27517. PMID: 9346881.  
IF=4.24 (75%, 239)
  8. **Swietnicki W**, Petersen RB, Gambetti P, Surewicz WK. Familial mutations and the thermodynamic stability of the recombinant human prion protein. *J Biol Chem*. 1998 Nov 20;273(47):31048-52. doi: 10.1074/jbc.273.47.31048. PMID: 9813003.  
IF=4.24 (75%, 167)
  9. Zhang Y, **Swietnicki W**, Zagorski MG, Surewicz WK, Sönnichsen FD. Solution structure of the E200K variant of human prion protein. Implications for the mechanism of pathogenesis in familial prion diseases. *J Biol Chem*. 2000 Oct 27;275(43):33650-4. doi: 10.1074/jbc.C000483200. PMID: 10954699.  
IF=4.24 (20%, 100)
  10. Knaus KJ, Morillas M, **Swietnicki W**, Malone M, Surewicz WK, Yee VC. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol*. 2001 Sep;8(9):770-4. doi: 10.1038/nsb0901-770. PMID: 11524679.  
IF=11.98 (50%, 415)
  11. **Swietnicki W**, Barnie AM, Dyas BK, Ulrich RG. Zinc binding and dimerization of *Streptococcus pyogenes* pyrogenic exotoxin C are not essential for T-cell stimulation. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):9885-95. doi: 10.1074/jbc.M206957200. Epub 2002 Dec 8. PMID: 12473669.  
IF=4.24 (75%, 2)

Sumaryczny IF w/w prac wynosi 42.43 a sumaryczna liczba cytowań 1043. Największy wkład daje Nature Structural Biology (pozycja [10]). Prace które dają najistotniejszy merytoryczny wkład do zdefiniowanego przez Habilitanta osiągnięcia naukowego to prace [1-6]. Prace można w przybliżeniu podzielić na dwie grupy tematyczne:

Grupa 1. Zastosowanie realizowanych badań do opracowania terapeutyków i szczepionek przeciwko patogenowi *Yersinia pestis* oraz enteropatogennej *Escherichia coli*. W szczególności uzyskane zostały następujące wyniki - zwróć przy tym uwagę m.in. na rolę metod molekularnego modelowania:

1. ATPaza YscN systemu wydzielania typu III w patogenie *Yersinia pestis* jest niezbędna dla jego wirulencji, może być zatem również celem specyficznych terapeutyków antybakteryjnych i jako alternatywa dla antybiotyków. Ponadto szczepionka przeciwko *Y. pestis* może być skonstruowana w oparciu o metody inżynierii genetycznej poprzez usunięcie genu kodującego niezbędną ATPazę YscN. Strategia może być zastosowana do opracowania innych szczepionek dla ludzkich patogenów.
2. Zaproponowane zostały niskocząsteczkowe inhibitory dla ATPaz z wykorzystaniem metod molekularnego modelowania. Przeszukano bazę związków chemicznych ZINC, która zawiera około 5 milionów dostępnych na rynku leko-podobnych związków chemicznych. Dokowanie biblioteki niskocząsteczkowych związków do białka YscN osiągnięto za pomocą procedury przesiewowego potoku DOVIS, który to procedura dokowania zaimplementowana jest w znanym pakiecie AutoDock 4.0. Białko było sztywne (co jest pewnym ograniczeniem), ale molekuly o niskiej masie cząsteczkowej posiadały zdolność dopasowywania się do centrum wiążącego przy zmianie ich torsyjnych kątów.

Przetestowane eksperymentalnie najlepsze inhibitory zdawały wartości IC<sub>50</sub> poniżej 20 mM w teście ATPazy *in vitro* - stwierdzono przy tym, że hamują homologiczne białko BsaS z *Burkholderia mallei* T3SS w podobnych stężeniach. Ponadto związki całkowicie hamowały wydzielanie YopE przez atenuowaną *Y. pestis* w hodowli komórek bakteryjnych i komórek ssaków w stężeniach mM. Prawdopodobnie tę samą strategię można zastosować do wielu innych powszechnych ludzkich patogenów wykorzystujących układ wydzielniczy typu III, w tym enteropatogennych *Salmonella typhimurium*, *E. Coli*, *Shigella flexneri* jak i *Burkholderia mallei/pseudomallei*.

3. *Enteropatogenna E. coli* (EPEC) jest ludzkim patogenem wykorzystującym układ sekrecyjny typu III do dostarczania białek bezpośrednio do organizmu człowieka. System zawiera ATPazę EscN, która jest niezbędna do odłączenia białek od ich kompleksów z białkami opiekuńczymi. Strukturę ATPazy EscN (kod PDB: 2obm) wykorzystano do obliczeń przesiewowych względem drobnocząsteczkowych inhibitorów blokujących jej miejsce aktywne. Po analizie QSAR stwierdzono, że dwie pochodne są kompetycyjnymi inhibitorami EscN zdolnymi do blokowania aktywności ATPazy z Ki poniżej 50  $\mu$  M. Jeden kandydat,

WEN05-03, z  $K_i=16\pm 2 \mu\text{M}$ , był minimalnie toksyczny dla komórek ssaków. W modelu infekcji komórkowej komórek HeLa z EPEC, związek WEN05-03 całkowicie zablokował tworzenie klastrów aktyn przy stężeniu  $100 \mu\text{M}$ , gdy analizowano je za pomocą mikroskopii konfokalnej. Drugim najlepszym inhibitorem aktywności ATPazy EscN był WEN04-34 z  $K_i=46\pm 2 \mu\text{M}$ . Jednak związek był wysoce toksyczny dla linii komórkowej BALB/3T3. Podsumowując, prace identyfikują związek blokujący bakteryjną ATPazę w jej aktywnym miejscu bez powodowania toksyczności w stosunku do komórek gospodarza. To pierwsze takie badania pokazujące wykonalność wykorzystania ATPazy systemu wirulencji bakterii jako celu dla stosunkowo nietoksycznych związków - oferujące możliwość alternatywnych nieantybiotykowych strategii.

Grupa 2. Prace te skoncentrowane są na badaniach białek prionowych. W szczególności pokazano że struktura białka prionowego może być konformacyjnie zmienna – co pozwala na klasteryzację konformerów do kilku aktywnych biologicznie struktur. Przemiany konformacyjne mogą być indukowane m.in. za pomocą zmiany pH środowiska, natomiast mutacje związane z chorobami prionowymi mogą być m.in. powiązane z zaburzeniami równowagi monomer-dimer białek prionowych.

Aczkolwiek uważam prace Habilitanta zajmujące się tą tematyką za bardzo wartościowe, to brak mi trochę w nich bardziej abstrakcyjnego spojrzenia na mechanizmy przemian konformacyjnych struktur białkowych, które ostatecznie definiują ich funkcje – fizjologiczne lub patogenne.

Generalnie struktura białek zależy naturalnie od sekwencji, ale również zależy od lokalnego molekularnego otoczenia – przez to ostatnie rozumiem zarówno specyficzne oddziaływania, np. z innymi białkami, jak również mniej specyficznymi, takimi jak np. pH. Co więcej z punktu widzenia pojedynczej molekuly białka inne molekuly tego samego białka mogą stanowić dla niego lokalne otoczenie molekularne. W ten sposób można rozszerzyć strukturalny model białek prionowych na proces autokatalicznego procesu przekształcania się formy fizjologicznej do formy patogennej. Jeżeli przyjmie się taki rozszerzony model, to ostateczna forma białek wynika z przejścia do minimum energii swobodnej – może nim być minimum globalne lub długożyciowy stan metastabilny. Jest to mechanizm dobrze opisywany w ramach ugruntowanych praw fizyki i chemii.

Taki model pozwala opisać i zrozumieć zarówno mechanizmy przechodzenia form białek prionowych pomiędzy stanami fizjologicznymi i patogennymi, jak i np. przemiany konformacyjne DNA pomiędzy formami A, B i Z.

Generalnie pomimo wyżej wymienionych niewielkich uwag krytycznych, prace grupy 2 charakteryzują się wysokim poziomem naukowym i są szeroko cytowane. Zastosowane metod molekularnego modelowania i teoretycznej chemii obliczeniowej są ugruntowane i dobrze znane z punktu widzenia potencjalnych zastosowań. Cel naukowy prac dr Świątnickiego poprzez połączenie

prac eksperymentalnych i obliczeniowych wykracza poza tradycyjne konwencjonalne podejścia, koncentrując się na jednym typie badań, i jest efektywny.

Jeżeli chodzi o **zastosowania** to opracowane metody, prezentowane m.in. w pracy [1], skoncentrowane były na opracowaniu drobnocząsteczkowych związków blokujących wirulencje enteropatogennej *E. coli*. (projekt finansowany przez Narodowe Centrum Badan i Rozwoju). Doprowadziły one do jednego patentu oraz jednego wniosku patentowego w Polskim Urzędzie Patentowym, których współautorem jest Habilitant:

1. PAT.226024: *New application of N-[2-[4-(4-methoxyphenyl)-1,3-thiazol-2-yl]ethyl]-2-oxo-1,5,6,7-tetrahydrocyclopenta[b]pyridino-3-carboxamide,*
2. Wniosek # P.409676: *New application of 2-(phenylsulfanyl)-acetamide derivatives.*

Badania były prowadzone od etapu obliczeniowego wyszukiwania związków wiążących się do miejsca aktywnego ATPazy EscN, testowania ich w blokadzie hydrolizy przez rekombinowane białko oraz blokadzie sekrecji efektorów i infekcji komórek ludzkich.

Dr Świętnicki jest pierwszym i/lub korespondencyjnym autorem większości prac (za wyjątkiem prac [9] i [10]). Być może w niektórych pracach jego wkład oceniany na 75 % jest nieco zawyżony (np. prace [3, 5, 8, 11]) ale nawet gdyby był on 10-20 % niższy, to jednak wystarcza to na uznanie jego dominującego wkładu w stworzenie naukowego osiągnięcia będącego przedmiotem postępowania habilitacyjnego.

W związku z powyższym pozytywnie oceniam osiągnięcie naukowe Habilitanta.

### **Ocena aktywności naukowej i całości dorobku naukowego habilitanta**

Oprócz prac stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej dr Wiesław Świętnicki jest współautorem 3 publikacji opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora w roku 1995 i 10 publikacji opublikowanych po doktoracie w dobrych i bardzo dobrych czasopismach naukowych.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że prace badawcze były prezentowane przez dr Świętnickiego w postaci 5-ciu plenarnych lub zaproszonych wykładów na międzynarodowych konferencjach.

Całkowita liczba cytowań bez autocytowań dr Wiesława Świętnickiego wynosi 2155, Indeks Hirscha, wg. *Web of Science* wynosi 19, a całkowita liczba punktów MNiSW 1490.

Dr Świętnicki od 2012 roku pracuje w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, a wcześniej od roku 1996 pracował kolejno w: Case Western Reserve University (Cleveland, OH, USA), w U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (Ft. Detrick,

MD, USA), w R&D Command-Edgewood Chemical Biol. Center (Aberdeen Proving Ground, MD, USA), w Uniformed Services University (Bethesda, MD, USA) jak również we Wrocławskim Centrum Badawczym EIT+ (Wrocław, Polska). Zdobył więc bardzo duże doświadczenie w realizacji różnorodnych projektów badawczych, w tym również jako kierownik kilku projektów.

Dr Świętnicki otrzymuje również do recenzji prace z dobrych i bardzo dobrych międzynarodowych naukowych czasopism. Poza tym, choć w sposób umiarkowany, angażuje się w popularyzację nauki.

W związku z tym wysoko oceniam aktywność naukową i całość dorobku naukowego Habilitanta.

Konkludując uważam, że przedstawione osiągnięcie naukowe dr Wiesława Świętnickiego zatytułowane "Opracowanie drobnocząsteczkowych inhibitorów systemów sekrecji typu III z *Yersinia pestis* i enteropatogennej *E. Coli*" przedstawione w materiałach habilitacyjnych, jak i cały jego dorobek naukowy oraz wysoka aktywność naukowa w pełni spełniają wymagania ustawowe (Roz. MNiSW z dnia 1.09.2011, Dz. U. Nr 196, poz. 1165) i zwyczajowe stawiane kandydatom do uzyskania stopnia doktora habilitowanego – w tym przypadku w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych.

Wnoszę o dopuszczenie dr Wiesława Świętnickiego do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.



Prof. dr hab. Bogdan Lesyng