

Prof. dr hab. Andrzej Kutner
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Chemii Leków
Stefana Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. 22 57 20 726, e-mail: andrzej.kutner@wum.edu.pl

Warszawa, 19 listopada 2022

***Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Mai Sołtyka
p.t. „Analiza porównawcza cytotoksycznego oddziaływania pochodnych 2-deoksy-D-
glukozy (2-DG) w modelu in vitro glejaka wielopostaciowego”***

Recenzowana praca doktorska mgr inż. Mai Sołtyka została wykonana pod kierunkiem dr hab. n. med. inż. Beaty Pająk, profesora WIHE, w Samodzielnej Pracowni Genetyki i Biologii Molekularnej tego Instytutu. Promotorem pomocniczym pracy jest dr n. fiz. Marcin Ziemiak z Laboratorium Badań Strukturalnych i Biochemicznych, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego. Doktorantka jest stypendystką projektu OPUS (UMO-2017/25/B/NZ3/00251), a praca doktorska została wykonana w ramach współpracy z Prof. Waldemarem Priebe z MD Anderson Cancer Center (Houston, USA) oraz z Laboratorium Badań Strukturalnych i Biochemicznych Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy ważnego obszaru terapeutycznego jakim jest leczenie glejaka wielopostaciowego (glioblastoma multiforme, GBM). Ten nowotwór pierwotny ośrodkowego układu nerwowego jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów i odznacza się najwyższym stopniem złośliwości. Pomimo wieloletnich badań, rokowania pacjentów z GBM nadal nie są pomyślne, a mediana przeżycia nie przekracza 12 miesięcy. Dalsze badania w tej dziedzinie są więc szczególnie uzasadnione. W terapii GBM nie odnotowano istotnego postępu chemoterapeutycznego od początku lat 80-tych. Wówczas to, Malcolm Stevens z Aston University zsyntetyzował, w ramach pracy doktorskiej nad pochodnymi imidazolokarboksamidu o wysokim stopniu wysycenia atomami azotu, nowy związek, wprowadzony w końcu lat 90-tych do lecznictwa jako temozolomid. Terapia GBM nadal więc polega głównie na zlokalizowaniu i resekcji guza oraz radioterapii połączonej z chemioterapią temozolomidem. Pomimo wysokiej lipofilowości i przenikania bariery krew-

mózg, skuteczność temozolomidu jest wysoce niezadawalająca, a jego wpływ na czas przeżycia pacjentów jest zaledwie kilkumiesięczny. Jak wiadomo, wynika to głównie z podwyższonej aktywacji mechanizmów naprawy DNA u pacjentów nowotworowych. Metodą modyfikacji chemicznych nie udało się znacząco poprawić skuteczności działania temozolomidu w selektywnym alkilowaniu DNA. Z tego względu tym bardziej uzasadnione są próby opracowania nowych bardziej skutecznych chemoterapeutyków z innych klas związków chemicznych i o innym mechanizmie działania.

W ten nurt światowych badań włącza się praca doktorska mgr Mai Sołtyka. Praca ta obejmuje porównanie aktywności cytotoksycznej halogenowych pochodnych 2-deoksy-D-glukozy. Koncepcja pracy polega na ewaluacji efektywnych inhibitorów procesu glikolizy. Realizacja tej koncepcji prowadzi do opracowania związków niskocząsteczkowych, które mogą hamować metabolizm glukozy w komórkach nowotworowych, a tym samym stymulować ich apoptozę. Hamowanie metabolizmu komórek nowotworowych poprzez blokowanie glikolizy może więc być nowym celem interwencji terapeutycznej. Wyniki badań nad 2-deoksy-D-glukozą (2-DG), jako kompetencyjnym inhibitorem glikolizy, stały się pewnie inspiracją dla doktorantki do zainteresowania się tą grupą potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Tym bardziej, że podobnie jak D-glukoza, bardziej lipofilowa 2-DG efektywnie przekracza barierę krew-mózg, przy udziale tych samych transporterów, a aktywność pozostałych dróg syntezy ATP w przypadku glejaka jest ograniczona. Jak opisuje doktorantka we Wstępie i Dyskusji, z uwagi na właściwości farmakokinetyczne (niską odporność metaboliczną i krótki okres półtrwania), sama 2-DG nie osiągała efektywnych stężeń w komórkach. Okazała się jednak nietoksyczna. W ocenie doktorantki, stanowiło to impuls do poszukiwania nowych pochodnych 2-DG o działaniu cytotoksycznym. Doktorantka zwraca też uwagę na fakt, że znakowana radionuklidem ^{18}F -2-fluoro-DG jest stosowana jako marker izotopowy w diagnostyce PET.

W wyniku badań zespołu Prof. Waldemara Priebe okazało się, że enzymatyczną transformację 2-DG można korzystnie zahamować poprzez podstawienie atomu wodoru przy C-2 atomami chlorowca. Podobny efekt uzyskano poprzez regioselektywne acetylowanie 2-DG na C-3 i C-6 i otrzymanie 3,6-di-O-acetylo-2-deoxy-D-glukozy, kodowanej jako WP1122.

Zgodnie z wymaganiami, rozprawa doktorska ma tradycyjny układ i zawartość. Praca zawiera Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, jako część teoretyczną, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki badań własnych, Dyskusję, Wnioski i Piśmiennictwo. W Streszczeniu doktorantka przedstawiła interesująco i zwięźle podstawy teoretyczne, znaczenie tematyki i przedmiot badań. Szczegółowo natomiast przedstawiła różnorodne cele pracy,

obejmujące analizę efektów biologicznych, molekularnego mechanizmu działania badanych związków, ustalenie zależności struktura-aktywność, badanie wpływu związków na aktywność HK2, a także biosyntezę tego białka. Doktorantka podsumowała również wyniki przeprowadzonych badań, wynikające z nich wnioski oraz możliwości ich kontynuacji. Wersja angielska Streszczenia jest przygotowana poprawnie. Obszerny wykaz skrótów zawiera prawidłowe, angielskie i polskie, nazwy chemiczne i biologiczne, zgodne z nomenklaturą.

Wstęp ma charakter ciekawego artykułu przeglądowego na temat patogenezy glejaka, jego diagnostyki, mechanizmu karcynogenezy i aktualnych metod terapeutycznych. Opis ten został rozszerzony o przedstawienie metabolizmu komórek nowotworowych z wykazaniem znaczenia glikolizy w tym procesie, jako miejsca potencjalnej interwencji terapeutycznej. Doktorantka opisała przekonująco budowę i funkcje czynników transkrypcyjnych HIF w przeprogramowaniu metabolizmu komórek nowotworowych. Szczególnie starannie został opisany enzymatyczny mechanizm glikolizy tlenowej oraz kluczowe znaczenie heksokinazy 2, która stała się również obiektem badań biotechnologicznych doktorantki. W sposób bardzo poglądowy przedstawiony został szlak enzymatyczny glikolizy i możliwości interwencji w poszczególne jego etapy za pomocą licznych związków niskocząsteczkowych. Na tym tle doktorantka uzasadniła zainteresowanie pochodnymi 2-deoksy-D-glukozy i izomerycznej pochodnej mannozy, które to związki stanowiły przedmiot badań. Doktorantka przedstawiła następnie aktualne poglądy na temat autofagii i jej roli w procesie prowadzącym do apoptozy. Równie dokładnie został opisany udział 2-DG w posttranslacyjnej N-glikozylacji oraz mechanizm jej cytotoksyczności. Doktorantka dokonała również krytycznej analizy stanu badań przedklinicznych i klinicznych samej 2-DG i przekonująco wyjaśniła przyczyny niepowodzeń związanych z próbą wykorzystania tego związku w terapii przeciwnowotworowej. W tym miejscu doktorantka uzasadniła również celowość dalszych badań nad pochodnymi 2-DG o poprawionej farmakokinetyce, a w szczególności halogenowych pochodnych 2-DG, które mogą zachować przeciwnowotworowe działanie 2-DG przy podwyższonej odporności metabolicznej. W tej części pracy doktorantka wykazała się znajomością ostatnich doniesień literaturowych w dziedzinie pracy i obszarach pokrewnych oraz umiejętnością przystępnego przedstawienia skomplikowanych zagadnień z obszaru biologii molekularnej, biochemii i chemii medycznej. Część teoretyczna pracy jest ściśle związana z badaniami eksperymentalnymi doktorantki i bardzo dobrze wprowadza w zagadnienia stanowiące przedmiot badań własnych. Wszystkie dyskutowane zagadnienia zostały bardzo dobrze wyjaśnione i udokumentowane, w oparciu o najnowsze osiągnięcia w

dziedzinie pracy. Część teoretyczna jest ponadto bogato ilustrowana dobrze dobranymi rycinami z cytowanych publikacji.

Zgodnie z wyjaśnieniem zawartym w Części teoretycznej, głównym celem pracy doktorskiej była analiza porównawcza aktywności przeciwnowotworowej i zbadanie mechanizmów działania 2-DG i jej nowych mono- i dihalogenowych (chloro-, bromo-, jodo-, fluoro- i difluoro-) oraz acetylowych pochodnych jako potencjalnych inhibitorów glikolizy i substancji czynnych leku w terapii GBM. Ponadto, za cel pracy doktorantka przyjęła wskazanie pochodnych 2-DG o największym potencjale przeciwnowotworowym. W celu ustalenia znaczenia położenia podstawnika w strukturze 2-DG, doktorantka zaplanowała analizę także halogenowych pochodnych bliskiej strukturalnie mannozy. Zaplanowała też porównanie skuteczności halogenowych pochodnych i acetylowanej pochodnej 2-DG, WP1122.

Cele pracy były rozległe i bardzo różnorodne, a badania zmierzające do ich uzyskania interdyscyplinarne. Poza oceną aktywności biologicznej, celem pracy była również charakterystyka fizyko-chemiczna nowych pochodnych, w tym zbadanie czystości i homogenności pochodnych, krystalizacja i analiza rentgenostrukturalna oraz ocena oddziaływania i skuteczności hamowania aktywności enzymów glikolitycznych, w tym heksokinazy 2 oraz izomerazy glukozy-6-fosforanowej (PGI). Ponadto, celem pracy było uzyskanie rekombinowanego białka HK2 w systemie bakteryjnym oraz podjęcie prób jego krystalizacji w kompleksie z halogenową pochodną, w celu oceny różnic w oddziaływaniu z enzymem, w zależności od rodzaju chlorowca.

W kolejnej części zostały dokładnie opisane zastosowane w pracy materiały i metody enzymatyczne i biochemiczne hodowli komórkowej i zastosowanych nowoczesnych metod badawczych *in vitro*, w tym ocenę zmian ultrastruktury komórek nowotworowych metodą mikroskopii elektronowej. Przedstawiono kolejne etapy wytworzenia rekombinowanego białka ludzkiej heksokinazy 2 oraz jego izolacji i wielostopniowego oczyszczenia. W bardzo czytelny sposób przedstawiono wzory strukturalne badanych związków z zaznaczeniem nowych podstawników 2-DG.

W części badań własnych doktorantka przedstawiła wyniki i dyskusję rozległych badań aktywności biologicznej badanych związków za pomocą licznej serii testów i analiz na dwóch liniach komórkowych, U87 oraz U251, ludzkiego glejaka wielopostaciowego. Doktorantka dokonała oceny żywotności komórek testem MTS, oceny proliferacji komórek testem BrdU, oceny syntezy białka testem z sulforodaminą (SRB), oceny natężenia przebiegu glikolizy na podstawie ilości wytworzonego kwasu mlekowego, ocenę indukcji autofagii, analizy aktywności HK2 i analizy aktywności izomerazy glukozy-6-fosforanu (PGI), analizy zmian

ekspresji białek metodą Western-blot oraz analizy statystycznej uzyskanych wyników. Zgodnie z zasadami w sztuce, wszystkie doświadczenia doktorantka wykonała w co najmniej 3 niezależnych powtórzeniach.

W wyniku przeprowadzonych badań doktorantka stwierdziła, że wszystkie badane związki wykazują aktywność cytotoksyczną względem komórek GBM. W porównaniu do 2-DG, analogi 2-FG, 2-FM, 2-DFG oraz 2-IM i 2-IG wykazują istotnie wyższą aktywność, podczas gdy 2-bromo- i 2-chloropochodne wykazują niską aktywność. W ten sposób doktorantka wykazała, że rodzaj podstawnika przy C-2 w badanym analogu 2-DG i niewielkie zmiany strukturalne wpływają w istotnym stopniu na aktywność biologiczną.

Szczególnie interesujące są wyniki doktorantki dotyczące oddziaływania 2,2-difluoro-2-deoksy-D-glukozy (2,2-diFG) oraz 2-jodo-2-deoksy-D-mannozy (2-IM), ze względu na ich niskie wartości IC50. Wyniki analiz cytotoksyczności zostały uzupełnione o analizę aktywności HK2 po podaniu badanych związków. Doktorantka wykazała, że najsilniejszym inhibitorem aktywności HK2 są 2,2-diFG oraz jodowe pochodne. Mono fluorowa pochodna 2-FG nie wykazała istotnych efektów hamujących aktywność HK2, z czego doktorantka poprawnie wnioskuje, że wskazuje to na dodatkowe efekty biologiczne działania tej pochodnej. Przeprowadzone przez doktorantkę analizy mechanizmu śmierci komórek potwierdziły, że efekt cytotoksyczny halogenowych pochodnych 2-DG jest związany z indukcją apoptozy komórek.

W dziedzinie prac fizyko-chemicznych, doktorantka potwierdziła profil chemiczny oraz czystość badanych związków, co jest kluczowe dla weryfikacji jakości prowadzonej syntezy. Opracowała również warunki krystalizacji badanych związków i otrzymała monokryształy 2-FG, 2-FM, 2-CG, 2-CM oraz 2-IG odpowiednie do badań krystalograficznych. W podsumowaniu doktorantki, w wyniku tych badań stwierdzono, że wszystkie badane pochodne 2-DG występują w ciele stałym w postaci struktury piranozowej, w najkorzystniejszej energetycznie konformacji krzesłowej tego pierścienia. Sieci krystaliczne wykazały strukturę warstwową, a odległości między warstwami zależą od wielkości atomu chlorowca.

Istotnym osiągnięciem biotechnologicznym doktorantki jest otrzymanie, metodą inżynierii genetycznej, rekombinowanego białka ludzkiej heksokinazy 2. Doktorantka wykonała optymalizację reakcji PCR insertu oraz wektora i przeprowadziła klonowanie molekularne techniką Gibson Assembly oraz transformację do szczepu ekspresyjnego *E. coli* BL21(DE3) w zoptymalizowanych warunkach ekspresji. Przeprowadziła skuteczne oczyszczenie białka HK2 metodą chromatografii powinowactwa do unieruchomionego jonu metalu oraz chromatografii wykluczenia i potwierdziła zachowanie aktywności otrzymanego

białka. O precyzji badań eksperymentalnych doktorantki świadczą zamieszczone kopie elektroforegramów i uzyskane powtarzalne rozdziały. Krystalizacja kompleksu HK2 i wybranej halogenowej pochodnej 2-DG oraz ustalenie struktury krystalograficznej tego białka jest przedmiotem obecnych badań. Analiza hamowania HK2 przez halogenowe pochodne w układzie pozakomórkowym wykazała, że najsilniejsze hamowanie enzymu zachodzi w obecności 2-IM, oraz 2,2-diFG, co znajduje potwierdzenie w badaniach *in vitro*.

W pracy zwraca uwagę wyjątkowo wnikliwie przeprowadzona dyskusja, precyzyjne podsumowanie najważniejszych dokonań oraz wynikające z nich wnioski. Dyskusja znakomicie uzupełnia przedstawienie problemów badawczych podniesionych we Wstępie i przeanalizowanych w Badaniach własnych. Świadczy to o dojrzałości naukowej doktorantki i umiejętności krytycznej oceny wartości i znaczenia własnych badań na tle najnowszych doniesień literaturowych. W dyskusji doktorantka przedstawiła aktualne tendencje w badaniach metabolizmu komórek nowotworowych i terapii skierowanych w ten cel terapeutyczny. Na tym ogólnym tle opisane zostały postępy w badaniach nad wykorzystaniem hamowania glikolizy w terapii przeciwnowotworowej, a w szczególności nad wykorzystaniem inhibitorów HK2, również za pomocą 2-DG, z krytycznym podsumowaniem zalet i wad tego związku. Doktorantka wykazała, jaki wkład wnoszą nowe pochodne do tego obszaru wiedzy i jaki, niektóre z nich, stanowią postęp. Szczególnie interesujące jest w tej części dyskusji szczegółowe uzasadnienie, z obszaru chemii strukturalnej, analizy konformacyjnej i chemii medycznej, dlaczego wysoka aktywność fluorowej pochodnej jest całkowicie zgodna z oczekiwaniem. Doktorantka wysoce profesjonalnie wyjaśniła, dlaczego można uważać, że fluoropochodna w najlepiej naśladuje naturalną 2-DG i może wykazywać najwyższe powinowactwo do HK2, a z tego względu wykazywać również najwyższą aktywność cytotoksyczną. Doktorantka przedyskutowała również znaczenie heterogenności nowotworu i zaobserwowane nowe zjawisko zróżnicowanej wrażliwości obu linii tego samego nowotworu, różnych morfologicznie i genetycznie, na działanie badanych pochodnych. Ze swoich obserwacji doktorantka wyciągnęła daleko idące i ważne wnioski dotyczące zróżnicowanej reakcji pacjentów na standardową chemoterapię i uzasadniła na tej podstawie konieczność terapii spersonalizowanej.

Starannie została wybrana literatura do pracy, zarówno w postaci przełomowych publikacji z lat 80-tych i 90-tych jak i najważniejszych prac wyłowionych z zalewu publikacji z ostatnich lat. Nie jest to jeszcze powszechnie praktykowane w pracach doktorskich, ale dużym ułatwieniem dla recenzenta i czytelników pracy byłoby zamieszczenie również odnośników identyfikujących publikację jako dokument cyfrowy (Digital Object Identifier, doi). Może to

pozwoliłoby na uniknięcie cytowania takich pozycji jak 199, gdzie informacje podane na wskazanej stronie internetowej na temat 2-DG są nieaktualne w stosunku do stanu opisanego w pracy.

Niemiłym obowiązkiem recenzenta jest wskazanie niedoskonałości w pracy. W tym przypadku ich znalezienie było szczególnie trudne, a zasadniczych uchybień nie znaleziono. Jedyna uwaga ogólna polega na tym, że drobne wątpliwości może budzić niezbyt jednoznaczne wykazanie w pracy nielicznych doświadczeń wykonanych nie przez doktorantkę, a przez współpracujących badaczy. Można się, np. jedynie domyślać, że o ile próby krystalizacji halogenowych pochodnych 2-DG zostały wykonane przez doktorantkę, to już chyba badania ich dyfrakcji rentgenowskiej, których wyniki również zamieszczono w pracy, zostały pewnie wykonane przez współpracowników. Brak tej jednoznaczności może niepotrzebnie osłabić ocenę interdyscyplinarnych dokonań własnych doktorantki. Te niejednoznaczności mogą wynikać z zastosowanej w opisie badań własnych formy bezosobowej. Przedstawienie opisu w pierwszej osobie liczby pojedynczej, jak np. wykonałam, ustaliłam, wykrywałam, zamiast wykonano, ustalono, wykryto, może usunąć wszelkie wątpliwości i dać mocniejszą podstawę do rzetelnej oceny imponujących dokonań doktorantki.

Doktorantka zrealizowała w pełni wszystkie różnorodne cele pracy, a uzyskane wyniki są na tyle interesujące, że skłaniają do kontynuowania badań, szczególnie nad rozwiązaniem struktury białka HK2. Ponadto, doktorantka jest współautorką dwóch publikacji w renomowanych czasopismach międzynarodowych (*Biomolecules* i *International Journal of Molecular Sciences*, IF 5,9 i 6,2), w których zostały opublikowane niektóre wyniki badań wchodzących w zakres pracy doktorskiej. Oczywiście, informacja o tych publikacjach powinna być zamieszczona w pracy. Znaczny potencjał publikacyjny zawarty jest w badaniach biotechnologicznych doktorantki, do wykorzystania po uzyskaniu monokryształu i rozwiązaniu struktury krystalograficznej HK2.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia z nadmiarem wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Składam więc Radzie Naukowej Wojskowego Instytutu Medycyny Lotniczej wniosek o dopuszczenie mgr Mai Sołtyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jestem również przekonany, że z uwagi na obszerny interdyscyplinarny charakter pracy, uzyskane wyniki badań i sposób ich prezentacji, przedstawiona do recenzji dysertacja zasługuje na wyróżnienie i taki wniosek również składam Radzie.

