



Prof. dr hab. Barbara Nawrot
Koordynator Działu Chemii Bioorganicznej
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN
Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
Tel. +48-42-6803248, 604-783945
www.cbmm.lodz.pl



Łódź, 10 maja 2018 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Zbigniewa Kochla p.t.
„Badania *in silico* i *in vitro* nad nowymi nieglukozowymi inhibitorami
heksokinazy typu II”**

Rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Zbigniewa Kochela została wykonana w Katedrze Biofizyki Medycznej Instytutu Biofizyki, na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Anety Kocevy-Chyły. Przedmiotem Rozprawy są badania podstawowe z zakresu chemii i biologii medycznej, których celem było wyselekcjonowanie (metodami bioinformatycznymi) do syntezy chemicznej nowych związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej i scharakteryzowanie tych właściwości w systemie komórkowym. Doktorant klarownie sprecyzował powody, dla których podjęcie badań w tematyce związków przeciwnowotworowych jest ważne i w pełni uzasadnione. Wymienił tutaj globalny wzrost zachorowalności na choroby nowotworowe, brak selektywnej i skutecznej terapii o zminimalizowanych skutkach ubocznych, wysoką toksyczność stosowanych chemioterapeutyków oraz brak skutecznych metod jej ograniczania i, w końcu, brak skutecznych leków eliminujących macierzyste komórki nowotworowe.

Za cel terapeutyczny (dobrze udokumentowany) Doktorant obrał enzym o aktywności fosfotransferazy uczestniczący w pierwszym etapie glikolizy, a dokładniej jeden z czterech homologów tego białka, tj. heksokinazę typu II (HKII). Enzym ten katalizuje transformację glukozy do 6-fosforanu glukozy (G6P). Występuje zarówno w cytoplazmie, jak i w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, głównie w komórkach wrażliwych na insulinę. W komórkach nowotworowych, wykazujących fenotyp glikolityczny, dochodzi do podwyższonej ekspresji heksokinazy II, przy czym udział aktywności mitochondrialnej tego białka w komórce stanowi około 70% jego całkowitej aktywności. Białko HKII hamuje proces indukcji apoptozy, sprzyjając rozwojowi nowotworu, zaś obniżenie poziomu ekspresji HKII prowadzi do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych.

Doktorant wybrał do badań dwa modele komórek nowotworowych z podwyższoną ekspresją białka HKII, a mianowicie ludzkie komórki raka wątroby linii HepG2, oraz mysie macierzyste komórki nowotworowe linii P19, badane w formie niezróżnicowanej (P19SCs) i zróżnicowanej (P19dSCs). Jasno sprecyzował cel pracy, którym było wyselekcjonowanie w badaniach *in silico* nowych związków, potencjalnych inhibitorów HKII, ich synteza (w ramach współpracy) oraz weryfikacja aktywności w systemie komórkowym (także z użyciem rekombinowanego białka HKII), w tym zbadanie ich właściwości cytotoksycznych,

cytostatycznych i anty-proliferacyjnych, oraz zbadanie wpływu inhibicji aktywności heksokinazy typu II na potencjał i integralność błony mitochondrialnej i poziom reaktywnych form tlenu (RFT).

Wyselekcjonowano łącznie 22 związki chemiczne, w tym dostępne komercyjnie 4 związki opisane w literaturze jako inhibitory heksokinazy II (jasmonian etylu JM, klotrimazol KLO, metformina MET i kwas 3-bromopirogronowy 3-BR) oraz dostępne komercyjnie dwa związki (kwas cytrazynowy CA i kwas szikimowy SA) wyselekcjonowane *in silico* na podstawie dokowania molekularnego do struktury białka w konformacji zamkniętej. Ponadto Doktorant przeprowadził badania *in silico* wykorzystując metodę wirtualnych wysoko-przepustowych badań przesiewowych (HTS) i z biblioteki ponad 500 tysięcy struktur (związków dostępnych komercyjnie w bibliotece CoCoCo – ang. *Commercial Compound Collection*) wyselekcjonował 103 struktury, z których, po bardziej szczegółowej analizie ułożenia ligandów w centrum aktywnym enzymu (metodą dokowania molekularnego), wytypował kilka pochodnych dibezwodnika kwasu 3,3',4,4'- benzofenono-tetrakarboksyłowego (BTDA). Szkoda, że Doktorant nie wyjaśnił na czym polega różnica pomiędzy strukturą białka w konformacji zamkniętej i otwartej. Proszę o ustosunkowanie się do tego problemu podczas publicznej obrony Rozprawy i wyjaśnienie, dlaczego badania prowadzono na różnych konformacyjnie formach białka i co z tego wynika. Czy wynik pokazany na rysunku 5.2 (lepiej byłoby Rycinie 5.2) to struktura białka w konformacji zamkniętej czy otwartej? Poza tym, otrzymane wyniki nie były zinterpretowane w kontekście zależności od konformacji białka.

Badania *in silico* pozwoliły na wytypowanie związków do badań biologicznych. W tym celu zsyntetyzowano 11 związków - pochodnych BTDA (oznaczone **27-31**, **60**, **64**, **65**, **136**, **137** i **MBL001**, w ramach współpracy z Zespołem prof. Krzysztofa Walczaka z Politechniki Śląskiej), oraz 2 związki (**C4** i **C6**) z grupy pochodnych benzamidów, zaprojektowane przez mgr Tomasza Frączka z zespołu prof. Piotra Panetha (PŁ), a zsyntetyzowane w zespole Prof. K. Walczaka. Do badań użyto także 3 związki wzorcowe (**BTDA**, **2DG**, **GSH**).

W pierwszym etapie badań eksperymentalnych Doktorant ocenił wpływ związków na proliferację zróżnicowanych i niezróżnicowanych komórek P19 i komórek HepG2, wykorzystując metody z sulforodaminą B oraz z resazuryną i wykazał, że spośród nowych związków jedynie cztery (**27,29,31** i **60**) wykazują pożądaną cytotoksyczność w badanych komórkach. Natomiast, spośród czterech opisanych w literaturze inhibitorów heksokinazy II tylko klotrimazol użyty w niskich stężeniach (do 10 μM) obniżał przeżywalność komórek HepG2. Co interesujące, Doktorant wykazał, że otrzymane różnymi metodami wartości parametru IC_{50} dla badanych związków były rozbieżne i znacznie wyższe (niższa aktywność cytotoksyczna) przy pomiarach za pomocą testu z resazuryną (oznaczania frakcji metabolicznie aktywnych komórek), a różnica ta pogłębiała się wraz ze wzrostem stężenia związku i czasem inkubacji. Czy Doktorant ma pogląd, dlaczego obserwowane są takie różnice? Poza tym, mam pytanie odnośnie wyników pokazanych na Rysunku 5.18 (dla związku 3BP). Jak wytłumaczyć wzrost przeżywalności komórek po 24 godzinnej inkubacji dla związku użytego w wysokim stężeniu? Czy nie jest to błąd pomiaru? Warto byłoby zweryfikować ten wynik dla stężenia wyższego niż 150 μM , zwłaszcza, że wydłużony czas inkubacji cofa obserwowany efekt.

Następnie Doktorant ocenił wpływ związków na aktywność heksokinazy II zawartej w lizatach komórek HekG2 lub w formie białka rekombinowanego. Stosując jako kontrolę pozytywną 2-deoksyglukozę (2DG) w wysokim stężeniu (50 mM) wykazał, że jedynie związek **27** oraz znany **3BP** obniżały aktywność enzymu. W doświadczeniu przeprowadzonym z

dotąd glutationu przekonywująco udowodnił, że obserwowane w przypadku użycia 3-bromopirogronianu całkowite zahamowanie aktywności HKII było spowodowane raczej zalkilowaniem grup tiolowych reszt cysteiny i być może metioniny prowadzącym do chemicznego uszkodzenia białka, a nie zablokowaniem centrum aktywnego tego enzymu. Ciekawy jest też wynik otrzymany dla metforminy, wskazujący na wzrost aktywności enzymu. Czy można racjonalnie wytłumaczyć ten wynik? Proszę o komentarz w czasie publicznej obrony Rozprawy.

W kolejnych badaniach Doktorant skupił się na ocenie wpływu wyselekcjonowanych związków na stan transbłonowego potencjału mitochondriów. W badaniach tych spodziewano się, że zahamowanie aktywności heksokinazy II spowoduje wzrost wartości $\Delta\psi_m$. Wyniki badania aktywnego związku **27** i związków porównawczych **29** i **30**, różniących się położeniem grupy hydroksylowej w pierścieniu fenylovym, w systemie zróżnicowanych i niezróżnicowanych komórek mysich, były dosyć rozbieżne i dodatkowo różne przy uwzględnieniu liczby żywych komórek w badanej próbie. Wyniki te pokazane na Rysunku 5.26 są dyskusyjne, a sam opis, moim zdaniem, jest nieprecyzyjny (pomyłony opis wyników standaryzowanych i niestandaryzowanych). Jaśniej przeprowadzono analizę zmian sieci mitochondrialnej w komórkach P19 pod wpływem związku **27** (Rysunek 5.31 i 5.32), aczkolwiek tutaj zabrakło opisu zdjęć mikroskopowych na fotografiach E,F,G,H.

Ostatnim parametrem oznaczanym w komórkach HepG2 i P19 poddanych działaniu wybranych związków (**27,29,30** oraz **64,65,136,137** i **MBL001**) był poziom reaktywnych form tlenu (RFT). Tutaj również zaobserwowano znaczne rozbieżności w oznaczonym poziomie RFT, zależne od tego czy wyniki były standaryzowane czy nie, z uwzględnieniem liczby żywych komórek w próbie (oznaczenia metodą SRB). Wykazano, że np. związek **27**, użyty w stężeniu 100 μM powoduje „spadek poziomu anionorodnika ponadtlonowego” w komórkach P19 niezróżnicowanych, oraz około 50% wzrost poziomu $\text{O}_2^{\bullet-}$, w komórkach zróżnicowanych. W Dyskusji wyników nie znalazłam próby wyjaśnienia obserwowanych efektów. Mam też pytanie co właściwie oznacza sformułowanie „spadek poziomu RFT” i jakie komórki były kontrolą dla doświadczeń, których wyniki zaprezentowano na Rysunkach 5.33-5.37? Ponadto, w Dyskusji zabrakło mi pogłębionej analizy SAR nad wpływem poszczególnych elementów strukturalnych pochodnych benzofenonu i benzamidu na obserwowane właściwości biologiczne poszczególnych związków. We Wnioskach Doktorant skonkludował, że jedynie związek **27** mógłby pełnić rolę potencjalnego inhibitora mitochondrialnej heksokinazy II w komórkach nowotworowych.

Wyniki badań zostały już opublikowane w pracy, w której Doktorant jest pierwszym autorem (*Bioorg Med Chem Lett.* 2017, 27(3):427-431). Doktorant wykazał się wiedzą w uprawianej dziedzinie nauki. Wykazał się też umiejętnością prowadzenia badań eksperymentalnych. Stosował odpowiednie kontrole, przeprowadzał poprawnie analizę statystyczną wyników, poprawnie je interpretował. Posiadał umiejętność posługiwania się metodami fluorescencyjnymi i kolorymetrycznymi oznaczania cytotoksyczności związków, tempa proliferacji komórek, detekcji RFT, czy w końcu oceny potencjału i integralności błony mitochondrialnej, aczkolwiek w moim przekonaniu, zakres stosowanych metod, które poznał Doktorant jest w sumie dosyć wąski. Pragnę również podkreślić, że Doktorant dwukrotnie przebywał na krótkich stażach naukowych w laboratorium dr Paulo Oliveiry w Portugalii, podczas których prowadził badania stanowiące część niniejszej Rozprawy, co świadczy o jego umiejętności współpracy naukowej nie tylko w Kraju, ale i za granicą.

Rozprawa napisana została poprawnym językiem polskim, jest klarowna w swojej strukturze; porządnie opracowana graficznie, poprawnie pokazano wyniki statystycznie znamienne.

Podsumowując, Rozprawa jest oryginalną pracą w zakresie selekcji *in silico* i charakterystyki biologicznej nowych związków z grupy pochodnych benzofenonu i benzamidów i porównania tych danych z właściwościami związków referencyjnych. Zawiera krótki Wstęp (14 stron), opis Materiałów i Metod (22 strony), opis uzyskanych Wyników (44 strony) i Dyskusję (10 stron), a także streszczenie w języku polskim i angielskim, Załączniki oraz Bibliografię. Odnotowałam, że w spisie literatury (113 pozycji) brakuje kilku odnośników wymienionych na stronie 15 Rozprawy.

Mam też kilka uwag nie wymagających komentarza:

1. Brak rysunku 5.13
2. Zdanie bez orzeczenia Str. 66 „Badania cytotoksyczności na komórkach HepG2 w tych samych warunkach jak w przypadku pozostałych związków.”
3. Niepoprawne zwroty: Intermediaty, mikrotubuliny, wiele błędów w nazewnictwie związków wymienionych w Tabelach 3 i 4. Grupa „trifenylfosfinowa” a nie „trifenylowa” (str. 45), niepoprawne sformułowanie: „komórkom podano stężenia związku” zamiast „podano związek o stężeniu xxx mM”, „atom tlenu” zamiast „tlen”, przeżyto monowarstwę komórek H₂O₂ (str. 38).
4. Sugeruję też, żeby zamiast „Rysunki” używać określenia „Ryciny”, co bardziej odpowiada prezentacji np. fotografii z mikroskopii fluorescencyjnej.

Uwagi te nie umniejszają wartości merytorycznej samej Rozprawy.

Reasumując, na podstawie przedstawionych powyżej osiągnięć stwierdzam, że Doktorant wykazał się ogólną wiedzą w uprawianej dziedzinie nauki, umiejętnością prowadzenia badań naukowych i rozwiązaniem oryginalnego problemu naukowego.

Z całym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w Ustawie i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Krzysztofa Zbigniewa Kochła do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Barbara Nawrot

Łódź, 10 maja 2018 r.