

Prof. dr hab. Krystyna Fabianowska-Majewska
Uczelnia Łazarskiego, Wydział Medyczny
ul. Świeradowska 43, 02-662 Warszawa

Recenzja pracy doktorskiej
pt: „Badania *in silico* i *in vitro* nad nowymi nieglukozydowymi
inhibitorami heksokinazy typu II”

wykonanej przez mgr Krzysztofa Kochla

w Katedrze Biofizyki Medycznej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Krzysztofa Kochla dotyczy opracowania wirtualnej metody poszukiwania nowych związków chemicznych o potencjalnej biologicznej aktywności przeciwnowotworowej oraz sprawdzenie aktywności biologicznej wybranych związków w badaniach *in vitro* na dwóch liniach nowotworowych. Doktorant do badań wybrał *in vitro* białko heksokinazę typu II (HKII), białko które katalizuje fosforylację glukozy do glukozy-6-fosforanu, zapoczątkowując metabolizm glukozy w procesie glikolizy, procesu intensywnie przebiegającego w komórkach nowotworowych. Wyselekcjonowanie z biblioteki związków chemicznych, związków dopasowanych do centrum aktywnego badanego białka jest nowatorską metodą obecnie wprowadzaną do stosowania w biotechnologii i przemyśle farmaceutycznym.

Rozprawa doktorska obejmuje 127 stron i posiada typowy układ następujących rozdziałów: Wstęp, Uzasadnienie tematu z hipotezą badawczą i celem pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie i Bibliografia. We Wstępie Doktorant przybliżył wiedzę na temat biologicznej funkcji białka heksokinazy typu II w komórkach prawidłowych i nowotworowych odwołując się do teorii Wartburga na temat wzmożonego metabolizmu glukozy w komórkach nowotworowych. W tym rozdziale otrzymujemy także charakterystykę związków – inhibitorów HKII, których właściwości inhibitorowe zostały opisane w literaturze. Tymi związkami są m.in. 2-deoksy-D-glukoza, która w badaniach *in vitro* przeprowadzonych przez Doktoranta pełni rolę związku referencyjnego, oraz jasmonian metylu (hormon roślinny), klotrimazol (popularny lek przeciwgrzybiczny), metformina (doustny lek przeciwcukrzycowy) i kwas 3-bromopirogronowy (analog kwasu pirogronowego). Ponadto we wstępie Doktorant opisuje strategię wirtualnych badań, które wykorzystywał w metodzie *in silico* wraz z metodą „dokowania molekularnego”, badań mających na celu wyselekcjonowanie (z puli biblioteki związków chemicznych) związków nieglukozydowych dopasowanych do struktury centrum aktywnego badanego enzymu i jednocześnie związków wykazujących potencjalne właściwości inhibitorowe wobec heksokinazy typu II.

W kolejnym rozdziale Doktorant przedstawił cel badań wraz z hipotezą badawczą oraz uzasadnieniem tematu badań. Przesłanki te to ważne aspekty podjętej pracy ponieważ nawiązują do obserwowanej w ostatnich latach progresji chorób nowotworowych jak i poszukiwań nowych terapii przeciwnowotworowych ze zminimalizowanymi skutkami ubocznymi. Komputerowy dobór biologicznie aktywnych związków przeciwnowotworowych jest w biotechnologii podyktowany także aspektem ekonomicznym, mającym skrócić czas opracowania nowych leków i ich wdrożenia do badań klinicznych. Byłoby wskazane aby wzmianka o nasilającej się zachorowalności na nowotwory była zupeł-

niona krótką charakterystyką obecnie stosowanymi innymi terapiami, które obejmują nie tylko związki prowadzące do aktywacji procesu apoptozy poprzez szlak mitochondrialny ale także do zahamowania proliferacji komórek poprzez zahamowanie syntezy DNA np. przez antymetabolity (np. analogii nukleozydów purynowych i pirymidynowych), czy immunoterapię stymulującą system odpornościowy, z którą to strategią wiąże się wielkie nadzieje. Duże zainteresowanie immunoterapią wynika faktu, że jest to leczenie mniej inwazyjne i skierowane na ognisko nowotworowe, tym samym nie uszkadza sąsiednich zdrowych tkanek i narządów. Jednocześnie trzeba nadmienić, że do chwili obecnej, immunoterapia głównie pełni rolę uzupełniającą powszechnie stosowanego leczenia: chirurgicznego, chemioterapii czy radioterapii.

Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorant podjął się pracy nowatorskiej, która w chwili obecnej jest wprowadzana do badań mających na celu poszukiwanie nowych związków o biologicznej aktywności przeciwnowotworowej. Ten proces poszukiwań Doktorant przeprowadzał w następujących etapach logicznie zaplanowanych:

- (i) Wytypowanie reakcji ważnej dla metabolizmu glukozy, metabolizmu wzmożonego w procesie nowotworzenia - „efekt Wartburga”. W tym celu Doktorant wytypował białko, heksokinazę typu II, enzym rozpoczynający metabolizm glukozy w procesie glikolizy aerobowej,
- (ii) Wirtualny dobór związków chemicznych o przypuszczalnej aktywności inhibitorowej wobec heksokinazy II. W procesie doboru odpowiedniego związku z puli ponad 500 tysięcy związków chemicznych z biblioteki CoCoCo (Commercial Compound Collection), Doktorant zastosował metodę *in silico* wraz z dokowaniem molekularnym. Wyselekcjonowanie związków wbudowujących się do struktury przestrzennej (zamkniętej i otwartej) centrum aktywnego białka heksokinazy typu II (korzystnym także energetycznie) wymagało zastosowania wielu programów komputerowych (takich jak: AutoDock Vina, UCSF Chimera, Schrödinger, Bibliotekę związków chemicznych CoCoCo, ImageJ) i współpracy z kilkoma ośrodkami informatycznymi, w tym m.in. z Centrum Informatyki Uniwersytetu Łódzkiego, Centrum Komputerowym Politechniki Łódzkiej oraz Interdyscyplinarnym Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego Uniwersytetu Warszawskiego.

Do badań *in vitro* na dwóch nowotworowych liniach komórkowych (P19, które są komórkami raka zarodkowego - model macierzystych komórek nowotworowych i HepG2 – komórki ludzkiego raka wątroby) mgr Krzysztof Kochel wybrał:

- 13 związków chemicznych wyselekcjonowanych z zastosowaniem wysokoprzepustowych badań przesiewowych *in silico* i komputerowego dokowania molekularnego. W tym zbiorze znajdowały się:
- 11 związków pochodnych BTDA (bezwodnika 3,3',4,4' benzofenylotetrakarboksyłowego) i 2 benzamidy.
- oraz związki opisane w literaturze jako inhibitory heksokinazy typu II zastosowane w niniejszej pracy doktorskiej jako związki referencyjne (2-deoksy-D-glukoza, jasmonian metylu, klotrimazol, kwas 3-bromo-pirogronowy i metformina).

Mgr Krzysztof Kochel aktywność wytypowanych związków weryfikował w następujących badaniach *in vitro*:

- (i) Wpływ związków (wyselekcjonowanych na drodze komputerowych badań przesiewowych) na aktywność heksokinazy typu II,

- (ii) Badanie zmian potencjału błonowego mitochondriów jako parametr związany z aktywnością mitochondriów,
- (iii) Badanie zmian wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu (RFT), głównie anionorodnika ponadtlenkowego.

W celu realizacji wytypowanych badań *in vitro* Doktorant stosował głównie mikroplótkowe pomiary spektrofluorometryczne. Z zastosowanych analiz należy wymienić:

- (i) Badanie żywotności komórek metodą barwienia roztworem błękitu trypanu, metodę która pozwala ocenić liczbę komórek martwych,
- (ii) Badanie żywotności i zdolności komórek do proliferacji: testy mikroplótkowe z resazuryną (oznaczenie fluorescencji produktu redukcji resazuryny) i z sulforodaminą (pomiar kolometryczny),
- (iii) Badanie aktywności heksokinazy typu II – pomiar spektrofotometryczny przyrostu stężenia NADPH po konwersji NADP⁺ w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glukozy-6-fosforanu,
- (iv) Badanie zmian transbłonowego potencjału mitochondriów z zastosowaniem dwóch metod mikroplótkowych spektrofluorymetrycznych z zastosowaniem: sondy JC-1 (ocena stanu polaryzacji błon) i sondy TMRE (ocena ilościowa zmian transbłonowego potencjału mitochondriów),
- (v) Badanie poziomu anionorodnika ponadtlenkowego z zastosowaniem spektrofluorymetrycznej metody z dihydroetydyną (DHE), która interkaluje do DNA komórek i z sondą MitSOXRed (pochodna DHE) lokowaną w mitochondriach.

Wszystkie otrzymane wyniki badań *in vitro* były opracowane statystycznie i przedstawione jako średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe, test t-studenta lub test U Manna-Whitneya. Doktorant oznaczał także istotność statystyczną przy użyciu analizy ANOVA i testu Tukeya.

Wyniki badań poprzedzone zostały 3 tabelami z wzorami strukturalnymi badanych związków wyselekcjonowanych na drodze badań przesiewowych i dokowania molekularnego oraz 2 rysunkami ilustrującymi umiejscowienie 27 pochodnej BTDA w centrum aktywnym HKII. Wyniki wszystkich badań *in vitro*, wyszczególnione powyżej, mających na celu ocenę wpływu badanych związków na nowotworowe komórki linii p19 (niezróżnicowane i zróżnicowane) oraz linii HepG2 hodowanych z badanymi analogami BTDA i związkami- inhibitorami HKII przedstawione zostały na 32 rysunkach.

Recenzowana praca doktorska zawiera obszerną bibliografię (113 odnośników literaturowych), w której około 50 % stanowią doniesienia literaturowe z ostatnich 10. lat.

W Dyskusji wyników Doktorant analizuje otrzymane wyniki dla wyselekcjonowanych związków metodą *in silico*, konfrontuje wyniki z danymi literaturowymi i wielokrotnie odnotowuje rozbieżności z hipotezą badawczą niniejszej pracy jak i odnotowuje zróżnicowane wyniki zależne od typu komórek nowotworowych, czasu inkubacji, niezgodności cytotoksyczności z oddziaływaniem na mitochondria, zmianą transbłonowego potencjału mitochondriów, aktywnością heksokinazy typu II czy poziomem reaktywnych form tlenu. Badania *in vitro* pozytywnie zweryfikowały tylko jeden związek, pochodną nr 27 BTDA wyselekcjonowaną metodą dokowania molekularnego. Badania udowodniły, że:

- Pochodna 27 BTDA może być brana pod uwagę jako potencjalny inhibitor aktywności enzymu HKII. Związek ten w około 50 % hamuje aktywność heksokinazy typu II w komórkach rakowych wątroby HepG2 oraz ludzkiej rekombinowanej HKII. Ta inhibitorowa aktywność związku 27 wobec HKII wyróżnia ten związek spośród innych pochodnych BTDA, co może być wynikiem utworzenia czterech wiązań wodorowych z grupami hydroksylowymi rodników fenolowych związku 27 z aminokwasami zlokalizowanymi w centrum aktywnym HKII.
- Związek 27 hamuje proliferację komórek P19 raka zarodkowego myszy przy 500-krotnie niższym stężeniu niż związek referencyjny 2-deoksy-D-glukoza.
- hodowla nowotworowych komórek macierzystych linii P19 z pochodną 27 prowadziła do obniżenia potencjału transbłonowego mitochondriów i obniżenie RFT.
- inne pochodne BTDA, o numerze 29 i 30 prowadziły do zróżnicowanych poziomów RFT i transbłonowego potencjału mitochondriów i te wyniki były zależne od rodzaju komórek i czasu inkubacji. W badaniach nie odnotowano ścisłych zależności pomiędzy cytotoxycznością a oddziaływaniem na mitochondria jak i na poziom wolnych rodników i aktywnością HKII. Jest prawdopodobne, że zilustrowanie położenia i oddziaływania innych pochodnych BTDA z centrum aktywnym białka HKII, pozwoliłoby wyjaśnić ich odmienną aktywność biologiczną od pochodnej 27.

Doktorant w Dyskusji podkreślił, że „najbardziej pożądanym efektem chemioterapii jest aktywacja mitochondrialnego lub zewnątrzkomórkowego szlaku apoptozy w komórkach nowotworowych”. To zdanie wymaga małego uzupełnienia. Wielu badaczy zwraca uwagę na dużą skuteczność cytostatyków w terapii przeciwnowotworowej, czyli związków, które mają wpływ na zahamowanie mitozy, replikacji DNA i w końcowym efekcie zahamowanie proliferacji komórek charakteryzujących się szybkimi podziałami. Do takich cytostatyków należą m.in. analogi nukleozydów będące analogami naturalnych prekursorów nukleotydów wykorzystywanych w procesie replikacji DNA, co prowadzi do zahamowania elongacji syntetyzowanych łańcuchów, tym samym są skutecznymi cytostatykami hamującymi proliferację komórek nowotworowych. Konkludując, trudna jest ocena czy lepiej stosować leki prowadzące do nasilenia programowanej śmierci komórki nowotworowej, już istniejącej, czy zapobiegać proliferacji komórek. Potwierdzam opinię Doktoranta, że potrzebne są nowe leki do terapii przeciwnowotworowej zmniejszające niepożądane efekty uboczne, które występują w terapii wieloma cytostatykami np. analogami naturalnych nukleozydów. Tym samym potwierdzam trafność kierunku badań Doktoranta, aby na drodze wysokoprzepustowych badań przesiewowych *in silico* i prób komputerowego dopasowania struktur ligandów (np. związków będących inhibitorami heksokinazy typu II) do konformacji centrum aktywnego białka enzymatycznego, w pierwszej kolejności dokonywać wirtualnego doboru związku chemicznego ukierunkowanego na wybrany proces metaboliczny lub białko pełniące ważną funkcję w procesie nowotworzenia komórek czy tkanek. Należy podkreślić, że taka droga poszukiwań jest nie tylko nowatorska lecz prawdopodobnie będzie drogą przyszłościową w biotechnologii nowych skutecznych leków przeciwnowotworowych uzupełniających także m.in. immunoterapię.

Przeprowadzone badania wskazują, że droga doboru związków chemicznych wybranych z obszernej puli związków pomimo zastosowania bardzo udoskonalonych metod i programów komputerowych mających na celu dopasowanie budowy i właściwości konformacyjnych związków do centrum aktywnego białka enzymatycznego heksokinazy typu II, nie gwarantuje przeciwnowotworowej skuteczności. Wyniki potwierdzają dotychczasowe wyniki wielu badań *ex vivo*, że specyficzność komórkowa, tkankowa i osobnicza jest tak różnorodna, że trudne są do ustalenia normy działania związków uważanych za potencjalne związki o aktywności przeciwnowotworowej. To sprawia, że

biochemiczne prace badawcze związane z poszukiwaniem skutecznej terapii przeciwnowotworowej są tak pasjonujące. Uwagi zamieszczone w niniejszej recenzji podkreślają jedynie złożoność procesów mających na celu poszukiwanie skutecznej terapii przeciwnowotworowej co jest związane z wieloletnimi zainteresowaniami recenzenta, który testował wiele związków-antymetabolitów, pochodnych naturalnych purynowych i pirymidynowych nukleozydów.

We Wnioskach Doktorant stwierdził, że hipoteza badawcza nie została potwierdzona w pełni. Wynik odmienny (negatywny) od założeń jest też wynikiem i powinien być uwzględniany w dalszych pracach z kolejnymi związkami chemicznymi wirtualnie dobranymi jako potencjalne związki przeciwnowotworowe. Należy jednak podkreślić, że badania Doktoranta wzbogacone zostały najnowszymi trendami badawczymi z wykorzystaniem wirtualnych badań komputerowych (*in silico* i dokowania molekularnego), które powinny skrócić czas poszukiwań nie tylko skutecznych leków lecz także leków o obniżonych efektach ubocznych.

Podsumowując stwierdzam, że nowatorskie badania przedstawione w pracy zostały rzetelnie przeprowadzone, są godne odnotowania i mogą stanowić dobry punkt do dalszych badań aplikacyjnych. Wartość merytoryczną oceniam wysoko, przede wszystkim dzięki wyjątkowej zdolności kooperacji z ośrodkami uniwersyteckimi w kraju i zagranicą, kooperacji w zakresie wirtualnego projektowania nowych związków o biologicznej aktywności przeciwnowotworowej. Także wielość przeprowadzonych pracochłonnych badań *in vitro* z dwiema liniami komórek nowotworowych zasługuje na wysoką ocenę.

Na tej podstawie pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Kochła i dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto z uwagi, że wyniki prac doświadczalnych a przede wszystkim wyniki projektowania komputerowego dokonywane we współpracy z wieloma ośrodkami uniwersyteckimi w kraju i zagranicą są bardzo nowatorskie, wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Łódź, 23 kwietnia 2018 r.

R. Fabianowska-Majewska
Krystyna Fabianowska-Majewska