Prof. dr hab. n. med. Marek Rusin
Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów,
Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie (PIB),
Oddział w Gliwicach
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-101 Gliwice

Gliwice, 21-12-2023

Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Synteza heterocyklicznych pochodnych monosacharydów i ich wpływ na żywotność komórek nowotworowych" pani mgr inż. Katarzyny Żurawskiej.

Choroby nowotworowe są ogromnym wyzwaniem dla służby zdrowia w krajach, w których średnia długość życia jest na tyle wysoka, że znacząca część populacji dożywa wieku, w którym nowotwory są zwykle diagnozowane. Śmiertelność spowodowaną niektórymi typami nowotworów udało się ograniczyć, dzięki zmianom warunków życia zmniejszającym częstość ich występowania (rak żołądka), z powodu szeroko zakrojonych badań przesiewowych (np. rak szyjki macicy w krajach skandynawskich), lub z powodu skutecznych metod terapii pozwalających wyleczyć duży odsetek pacjentów (rak piersi, niektóre białaczki). Jednak nadal istnieje pilna potrzeba opracowywania nowych metod terapeutycznych polegających na systemowym podawaniu cząsteczek nakierowanych na białka, których aktywność determinuje złośliwy charakter komórek nowotworowych. W ten nurt badań wpisuje się problematyka niniejszej rozprawy doktorskiej. Jest to więc tematyka ważna z naukowego punktu widzenia i mająca duży potencjał do zastosowań praktycznych.

Celem molekularnym jaki wybrała doktorantka jest enzym fukozylotransferaza 8 (skrót FUT8). Białko to katalizuje reakcję przeniesienia cząsteczki L-fukozy z cząsteczki donora (GDP-fukozy) na cząsteczkę akceptorową, którą może być sacharyd, lipid lub białko. Aktywność enzymu generalnie jest bardzo duża w komórkach nowotworowych, co sugeruje, że to białko w istotny sposób wpływa na ich biologiczne właściwości. Zahamowanie aktywności FUT8 poprzez działanie swoistego inhibitora może więc ograniczyć wzrost lub rozsiew komórek rakowych. W sierpniu bieżącego roku opublikowano pracę (Death Dis. 2023 Aug 3;14(8):495. doi: 10.1038/s41419-023-06027-0.), w której opisano działanie swoistego inhibitora FUT8, który powodował zmiany w fukozylacji białka CD276, będącego istotnym elementem regulacji oddziaływania pomiędzy komórkami rakowymi a układem odpornościowym. Zastosowanie inhibitora w mysim modelu *in vivo* spowodowało znamienne zahamowanie wzrostu guzów nowotworowych i przedłużenie życia zwierząt. Artykuł przeglądowy opublikowany w 2021 roku, i cytowany przez doktorantkę, podsumowuje wiedzę dotyczącą roli fukozylotransferazy 8 w rozwoju

choroby nowotworowej (Int J Mol Sci. 2021 Jan 5;22(1):455. doi: 10.3390/ijms22010455.). Wydaje się, że jednym z mechanizmów dzięki którym nadmierna fukozylacja białek sprzyja rozwojowi nowotworów jest promowanie unikania ataku ze strony układu odpornościowego. Jednak inne mechanizmy też mogą mieć znaczenie, o czym doktorantka wspomina w przeglądzie literatury. Tak więc wybór tego enzymu jako celu molekularnego w terapii przeciwnowotworowej jest dobrze uzasadniony.

Głównym celem pracy było otrzymanie nowych związków organicznych, które mogły by być efektywnymi inhibitorami FUT8. Wyznaczony cel jest istotny i zasadny ponieważ wcześniej nie otrzymano inhibitora, który zmniejsza w sposób selektywny i efektywny aktywności tego enzymu. Drugim celem pracy, równie istotnym co pierwszy, było przetestowanie biologicznych i biochemicznych właściwości wybranych związków otrzymanych w pierwszej części projektu. Autorka zamierzała sprawdzić wpływ testowanych związków na przeżywalność komórek, przebieg ich cyklu podziałowego, indukcję apoptozy oraz oddziaływanie testowanego białka z wybranymi, nowo uzyskanymi związkami. Zaplanowano otrzymanie związków, których struktura przypomina stan przejściowy reakcji enzymatycznej, a więc pochodne cukrów o konformacji półkrzesełkowej, którą posiadają nienasycone (między pozycjami 2 i 3) pochodne L-fukozy i L-ramnozy. Aby dodatkowo uzyskać pożądany efekt strukturalny analogów stanu przejściowego doktorantka zdecydowała się wprowadzić atom fluoru w pozycji C-2 pierścienia cukrowego. Dlatego otrzymano również pochodne 2-deoksy-2-fluoro L-fukozy. Ponadto autorka postanowiła przebadać inne związki, które są połączeniem cukrów i fragmentów tzw. barwników triazaynowych. Kolejna grupa testowanych związków mogących działać jako inhibitory fukozulotransferaz to cukrowe pochodne azoli. Tak więc w pierwszej części badań doktorantka dokonała syntezy zaplanowanych związków organicznych, natomiast w drugiej części badała ich właściwości biologiczne i biochemiczne takie jak wpływ na żywotność modelowych komórek wywodzących się z raka piersi (MCF7) lub jelita grubego (HCT116), wpływ na cykl komórkowy oraz indukcję programowanej śmierci komórkowej (apoptozy). Wiązanie pomiędzy oczyszczoną fukozylotransferazą a wybranymi związkami doktorantka analizowała poprzez określenie temperatury denaturacji kompleksu enzym-badany związek oraz poprzez badanie tzw. termoferezy mikroskalowej.

Cytotoksyczność w stosunku do komórek HCT116 i MSF7 zbadano dla 13 związków pochodnych furan-2(5H)-onu i 2H-pirol-2-onu. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono wartości IC50. Jest to stężenie związku zmniejszające żywotność komórek o 50%. Jeden związek nie wykazał efektu cytotoksycznego w żadnym typie komórek (Ram 36). Inne z kolei działały toksycznie tylko na jeden z typów komórek, co jest dość interesujące ponieważ związki nie działające na jedne komórki wykazywały stosunkowo niską wartość IC50 (były silnie toksyczne) w drugim typie komórek. Przykładowo, Ram32 nie działał toksycznie na komórki MCF7 natomiast jego IC50 w stosunku do komórek HCT116 wynosiło 14,6 μM i było jednym z najniższych jakie zaobserwowano. Spośród

badanych związków niską wartość IC50 w obu typach komórek wykazał związek Ram38 (IC50 w HCT116 wynosiło 9,2 μM a w komórkach MCF7 17 μM).

W następnej kolejności badane związki zostały poddane testowi na zdolność modulacji cyklu komórkowego oraz indukcji apoptozy mierzonej spadkiem ilości DNA w komórce (tzw. frakcja subG1). W tym doświadczeniu testowane związki były stosowane w stężeniu IC50 wyznaczonym na wcześniejszym etapie. Można oczekiwać, że jeśli związek okaże wysoką cytotoksyczność (niskie IC50) to będzie również wywierał istotny wpływ na przechodzenie przez cykl komórkowy i/lub będzie zwiększał frakcję komórek ze zmniejszoną ilością DNA. W tym doświadczeniu doktorantka uzyskała niespodziewane wyniki, których jednak szeroko nie komentuje. Przykładowo, w komórkach HCT116 związek Ram31 w teście MTT nie wykazywał toksycznego efektu, natomiast analiza cyklu komórkowego ujawniła bardzo duży i znamienny statystycznie wzrost odsetka komórek z apoptotyczną zawartością DNA (frakcja subG1). Inne związki, które spowodowały gwałtowny wzrost komórek w fazie subG1 to Ram38 i Fuk20. Dla tych związków wyniki testów MTT i analizy cyklu komórkowego były zgodne. Jeśli chodzi o wyniki dla komórek MCF-7, to pewna niezgodność dotyczy związków Ram32 i Glu12, które nie wykazują toksyczności w teście MTT, natomiast w analizie cyklu komórkowego obserwuje się duży wzrost ilości komórek we frakcji subG1. Natomiast dla związku Ram38 wyniki obu testów są kompatybilne. Tak więc dla cząsteczki Ram38 wyniki testów biologicznych oraz wyniki uzyskane na obu liniach komórkowych dają spójny obraz substancji zmniejszającej żywotność komórek.

W przypadku pochodnych tiadiazoli wykonano test MTT na dwu liniach komórkowych jednak nie zauważono silnego efektu toksycznego, dlatego badanie cyklu komórkowego przeprowadzono dla wszystkich badanych związków w stężeniu 100 μM, co jest wysoką wartością. W przypadku linii MCF7 nie zaobserwowaną wyraźnego wpływu na przebieg cyklu komórkowego. Zaobserwowano wpływ niektórych związków na przebieg cyklu komórek HCT116. Wpływ polegał na spadku odsetka komórek w fazie replikacji DNA i na wzroście odsetka komórek w fazie G2, co może sugerować, że badane związki blokują cykl komórkowy przed podziałem mitotycznym. Najsilniejszy efekt wywoływały związki Ram27 i Glu9. Dodatkowo, dla tej grupy związków przeprowadzono bardziej swoisty test na apoptozę wykorzystujący pomiar zmiany struktury lipidowej błon komórkowych komórek apoptotycznych (tzw. test aneksynowy). Ponadto bardziej swoiści badano nekrozę komórek (wnikanie jodku propidyny). Ten test wykazał niewielki wzrost apoptozy w komórkach HCT116 po zastosowaniu niektórych związków, np. Glu8. Trochę szkoda, że tego dokładnego testu na apoptozę nie zastosowano wobec analizowanej wcześniej grupy związków, które powodowały silny wzrost odsetka komórek we frakcji subG1.

Biochemiczne badania oddziaływania pomiędzy badanymi związkami a oczyszczoną fukozylotransferazą przeprowadzono z wykorzystaniem testu zwanego thermal shift assay (TSA). Do tego doświadczenia, jako białka modelowego, użyto fukozylotransferazy pochodzenia bakteryjnego – białka NodZ. Test zakłada, że oddziaływanie z badanym związkiem wpłynie na termiczną stabilność enzymu. Test wykonano dla 26 związków. Niektóre z nich wyraźnie wykazywały oddziaływanie z NodZ.

Ostatni test – termoferezę mikroskalową z powodów technicznych przeprowadzono jedynie dla trzech związków Ram32, Ram38 i Ram27. Analiza wyników wykazała wiązanie się z białkiem NodZ związku Ram38, *nota bene* tego samego, który dawał najbardziej zgodne wyniki w testach biologicznych. Porównano wiązanie Ram38 z NodZ oraz wiązanie enzymu z naturalnym substratem jakim jest GDP-β-L-fukoza. Stała K_d dla GDP-fukozy wynosiła 43 μM, a dla Ram38 - 998 μM, jest więc znacznie wyższa niż dla naturalnego substratu.

Zgodnie z przepisami rozprawa rozpoczyna się od streszczenia zredagowanego zarówno w języku polskim jak i angielskim. Układ dysertacji odbiega w swej strukturze od układu typowego dla publikacji naukowych i rozpraw doktorskich z innych jednostek badawczych. We wspomnianych publikacjach występują rozdziały w następującej kolejności: Wstęp teoretyczny, Cel, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja wyników, Wnioski i Piśmiennictwo. Domyślam się, że zastosowany przez doktorantkę układ: Przegląd literaturowy, Cel i założenia pracy, Omówienie wyników, Część eksperymentalna, Dorobek naukowy i Literatura jest stosowany w jednostce badawczej, w której przygotowano rozprawę. Niniejsza uwaga nie ma charakteru krytycznego, po prostu odnotowuję jaki układ tekstu zastosowała doktorantka. Na początku, w Przeglądzie literaturowym, autorka w skrótowy i przystępny sposób podaje informacje na temat metabolizmu komórki nowotworowej, przebiegu i regulacji cyklu komórkowego oraz apoptozy oraz nieco szerzej omawia budowę, klasyfikację oraz mechanizm działania fukozylotransferaz oraz przedstawia główne klasy ich inhibitorów. Następnie autorka omawia fukozylotransferazę 8 jako cel molekularny projektowanych leków oraz bardziej szczegółowo przedstawia stan wiedzy na temat inhibitorów tego konkretnego enzymu. Mnie osobiście w dysertacji trochę zabrakło lepszego metodycznego opisu części biologicznej i części biochemicznej, w której autorka zastosowała metody *thermal shift assay* oraz termoferezę mikroskalową. Z drugiej strony, zastosowane metody, zwłaszcza test MTT, analiza cyklu komórkowego oraz określanie apoptozy i nekrozy metodą cytometrii przepływowej są na tyle szeroko stosowane, że mogłem bez problemu zinterpretować wyniki. Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na zauważone przeze mnie błędy edytorskie. W numeracji spisu treści wypadł numer 4 (po rozdziale o numerze 3 wystąpił rozdział o numerze 5), ale jest to drobne uchybienie. Nieco poważniejszym niedociągnięciem jest brak Tabeli nr 10, o której wspomniano w tekście (str. 165). Rozprawa wraz z opisem dorobku naukowego liczy 185 stron. Obszerną część pracy – 74 strony stanowi opis warunków syntezy oraz weryfikacji struktury

ponad 100 związków organicznych wykorzystanych w pracy, zarówno półproduktów jak i związków, których otrzymanie było końcowym celem i które były charakteryzowane w testach biologicznych i biochemicznych. Nie będąc chemikiem mogę się tylko domyślać, że synteza i oczyszczenie zaplanowanych związków oraz weryfikacja ich struktury wiązało się z bardzo dużym nakładem pracy. Zbiór piśmiennictwa zawiera 129 pozycji literaturowych prawidłowo dobranych i poprawnie zacytowanych. Rozprawa doktorska niewątpliwie prezentuje obszerną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej.

Warto również podkreślić, że projekt, który był podstawą przygotowania rozprawy doktorskiej jest bardzo dobrym przykładem coraz częściej występującego multidyscyplinarnego podejścia w prowadzeniu badań naukowych. Ponadto, co również jest istotne, wspomniany projekt ma duży potencjał do praktycznego zastosowania, ponieważ każdy związek chemiczny, który swoiście hamuje białko nadmiernie aktywne w komórkach nowotworowych ma potencjał stania się elementem chemioterapii nowotworów.

Doktorantka ma już na swoim koncie dorobek naukowy w postaci 5 publikacji, z których w dwóch jest pierwszym autorem. Jest też współautorką zgłoszenia patentowego oraz kilkunastu doniesień zjazdowych. Brała również udział w realizacji projektu badawczego w kategorii OPUS finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Żurawskiej przygotowana pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. inż. Krzysztofa Walczaka oraz promotora pomocniczego dr inż. Anny Kasprzyckiej jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane ustawą dla dysertacji doktorskich. Biorąc pod uwagę cel badań, obecny stan wiedzy, zastosowane metody i uzyskane wyniki stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska zatytułowana „Synteza heterocyklicznych pochodnych monosacharydów i ich wpływ na żywotność komórek nowotworowych", stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wymogi przedstawione w artykule 187 Ustawy z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668), a stopień doktora może być nadany w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy. W związku z powyższym, przedstawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Żurawskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jeśli stosowne przepisy zostały przez doktorantkę spełnione, wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy.

Podpisano odręcznie przez autora

/ Prof. dr hab. Marek Rusin