



Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Poznań, 18.02.2022

RECENZJA

**pracy doktorskiej mgr Marty Orlickiej-Płockiej pt.
„Mechanizm działania oraz właściwości proapoptotyczne rybozydu kinetyny i jego pochodnych w komórkach nowotworowych”**

Oceniana praca doktorska wykonana została pod kierunkiem prof. dr hab. Elizy Wyszko z Instytutu Chemii Bioorganicznej w Poznaniu, której zespół od kilku lat z powodzeniem zajmuje się charakterystyką właściwości komórkowych związków małowcząsteczkowych o charakterze przeciwnowotworowym i przeciwstarzeniowym. Promotorem pomocniczym recenzowanej pracy doktorskiej jest dr Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska.

Przedmiotem badań mgr Marty Orlickiej-Płockiej jest rybozyd kinetyny (RK), związek małowcząsteczkowy, który hamuje proliferację komórek nowotworowych oraz indukuje ich apoptozę poprzez aktywację szlaku wewnątrzpochodnego związanego z mitochondriami. Oceniana praca doktorska skupia się na wyjaśnieniu mechanizmu działania RK i jego pochodnych na (i) szlaki enzymatyczne biosyntezy puryn, (ii) funkcjonowanie mitochondriów i metabolizm tlenowy, oraz (iii) wewnątrzkomórkową produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) i status redoks w komórkach nowotworowych. Badania te są bardzo ważne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, gdyż związki małowcząsteczkowe mogą być w przyszłości wykorzystane w strategiach przeciwnowotworowych, których celem są mitochondria.

W pierwszej części (rozdział 4.1) badano udział RK w szlakach *de novo*, rezerwowym i katabolicznym biosyntezy nukleozydów purynowych i jego wpływ na dynamikę purynomu, proteomu i formowanie purynosomu. W drugiej części (rozdział 4.2) scharakteryzowano wpływ RK na funkcjonowanie i bioenergetykę mitochondriów, indukcję stresu oksydacyjnego oraz aktywację powiązanych z mitochondriami procesów komórkowych, takich jak apoptoza/nekroza, autofagia, mitofagia czy ferroptoza w komórkach nowotworu wątrobowo-komórkowego (linia HepG2) hodowanych w warunkach sprzyjających fosforylacji oksydacyjnej (w obecności galaktozy zamiast glukozy). W trzeciej części (rozdział 4.3) badano wpływ RK i jego pochodnych (8-azarybozydu kinetyny, 8-azaRK i 7-deazarybozydu kinetyny, 7-deazaRK) na poziom stresu oksydacyjnego i uszkodzeń oksydacyjnych, mechanizmy antyoksydacyjne komórek glejaka wielopostaciowego (linia T98G, hodowle 2D i 3D) oraz potencjalne wykorzystanie działania pro-oksydacyjnego tych związków w zwalczaniu nowotworu.

Formalny opis rozprawy

Praca przedstawiona do recenzji jest bardzo obszerna i obejmuje 252 strony. Zawiera 39 schematów ilustrujących rozdziały Wprowadzenie literaturowe oraz Materiały i metody, 27 rysunków i 3 tabele ilustrujące otrzymane wyniki oraz dodatkowo 8 rysunków uzupełniających i 3 tabele uzupełniające. Układ pracy jest typowy i obejmuje: spis treści, streszczenie (brakuje streszczenia w języku angielskim), wykaz skrótów, wprowadzenie literaturowe, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie, wykaz schematów, rysunków i tabel oraz liczącą 333 (!) publikacji bibliografię, w większości złożoną

z pozycji literaturowych opublikowanych w ostatnich 10 latach. W rozdziale Cel pracy zaznaczono, że część zagadnień omawianych w pracy doktorskiej została już opublikowana w 2 publikacjach w *Apoptosis* (2020, IF ~4,7) i *Antioxidants* (2021, IF ~6,3), w których Doktorantka jest pierwszym autorem.

Uwagi:

Moim zdaniem praca mogłaby być napisana zwięźle, nawet biorąc pod uwagę dużą różnorodność stosowanych technik i olbrzymią ilość otrzymanych wyników. Autorka nie ustrzegła się powtórzeń, np. kilkakrotnego opisywania szlaków biosyntezy puryn, stresu oksydacyjnego czy produkcji RFT zarówno we wstępie, jak i opisując wyniki i je dyskutując. W tekście szereg skrótów wprowadzanych jest kilkakrotnie (np., RK, RFT, SO) a część z nich, z kolei, nie pojawia się na liście skrótów (np., T98G, HepG2, ADK, SO, $\text{mt}\Delta\Psi$, 8-azaRK, 7-deazaRK). W pracy występują pewne błędy redakcyjne (np., niejednolity zapis pozycji literaturowych - tytułów artykułów czy nazw czasopism) i stylistyczne. Pojawiło się kilka niefortunnych tłumaczeń z języka angielskiego (np., N⁶ podstawione pochodne adenozyne, areoszt cyklu komórkowego, kwasowość zamiast zakwaszenie, czynnik odspzęgający zamiast rozspzęgający) czy kilka nie stosowanych powszechnie określeń (np., respiracja mitochondriów, deplecja ATP, deprywacja glukozy). Muszę jednak podkreślić, że wszystkie te niedociągnięcia, o których wspominam z obowiązku recenzenta, nie są istotne, biorąc pod uwagę bardzo dużą wartość merytoryczną ocenianej pracy doktorskiej. Od strony redakcyjnej, pracę wyróżnia bardzo ładna oprawa graficzna, szczególnie schematy ilustrujące Wprowadzenie literaturowe.

Poprzedzające część doświadczalną, liczące 57 stron Wprowadzenie literaturowe stanowi bardzo obszerny, ciekawie napisany przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego zastosowania związków małowcząsteczkowych w terapiach przeciwnowotworowych, metabolizmu nukleozydów purynowych oraz metabolizmu i bioenergetyki komórek nowotworowych. Doktorantka opisała także dotychczasowe badania nad wpływem związków małowcząsteczkowych na metabolizm nukleozydów purynowych oraz na status oksydacyjny komórek glejaka wielopostaciowego. Pisząc wstęp Doktorantka sięgnęła do najważniejszego piśmiennictwa dotyczącego omawianych zagadnień.

Uwagi i pytania:

- Strona 52. Co Autorka miała na myśli pisząc o zwiększonej produkcji mleczanu do mitochondriów: „Komórki nowotworowe są również w stanie „przełączyć się” na wykorzystanie glukozy i w ten sposób promować zwiększoną produkcję mleczanu do mitochondriów, zamiast transportu pirogronianu, (Schemat 24)”. Schemat tego nie wyjaśnia. Czy mleczan może być substratem energetycznym dla mitochondriów?
- Strona 55. W jaki sposób mitochondria są odpowiedzialne za „status redoks wapnia”?
- Schemat 28. Kompleks II jest białkiem (kompleksem) transbłonowym a koenzym Q funkcjonuje w błonie.

Rozdział Materiały i metody (40 stron) zawiera charakterystykę użytych w pracy linii komórek nowotworowych, głównie komórek nowotworu wątrobowokomórkowego (HepG2) i glejaka wielopostaciowego (T98G). Znajdują się tu także obszerne opisy stosowanych metod badawczych. Uwagę zwraca bardzo duża różnorodność stosowanych technik, świadcząca o dużej wszechstronności Doktorantki w pracy doświadczalnej. Podczas badań prowadzono min.: hodowlę linii komórkowych, pomiar tempa proliferacji komórek, immunologiczną detekcję białek, pomiar stężenia i szybkości produkcji ATP, analizę proteomiczną, modelowanie i dokowanie ligandów, wizualizację sferoidów/frakcji komórkowych/cząsteczek przy użyciu mikroskopii konfokalnej oraz pomiar szybkości oddychania. Przy użyciu

cytometrii przepływowej oznaczano szereg parametrów, w tym apoptozę/nekrozę, cykl komórkowy, produkcję RFT, mitochondrialny potencjał błonowy, masę mitochondriów, formowanie purynosomu, autofagię/mitofagię czy wychwyty glukozy.

Uwagi i pytania do rozdziału Materiały i metody:

- Punkt 3.4.19 opisuje pomiar szybkości syntezy ATP a nie „zawartości ATP”
- Schemat 38. Rysunek błędnie sugeruje, że galaktoza indukuje glikolizę a nie fosforylację oksydacyjną.
- Metody opisane są w obrębie punktów odnoszących się do 3 rozdziałów Wyników. Niektóre metody (np. pomiar produkcji RFT za pomocą cytometrii przepływowej) opisywane są 2-3 razy. Może lepiej byłoby opisać metodę jeden raz a następnie uszczegółwić warunki odnosząc się do określonych rozdziałów Wyników.

W rozdziale Wyniki, który obejmuje 79 stron, Autorka przedstawia wyniki kolejno realizowanych 3 zadań badawczych określonych w Celu pracy, które zostały szczegółowo opisane w 3 rozdziałach. Na podkreślenie zasługuje sposób prowadzenia czytelnika przez poszczególne bardzo liczne i złożone etapy pracy eksperymentalnej i wyjaśnianie poszczególnych kroków. Każdy punkt otwiera wprowadzenie i kończy krótkie podsumowanie, porządkujące kolejne etapy badawcze. Wyniki prezentowane są w logicznej kolejności i tworzą spójną całość. Trzeba podkreślić, że Doktorantka umiejętnie, zachowując krytycyzm, analizowała wyniki.

W pierwszej części Wyników (rozdział 4.1) Doktorantka wykazała, że RK bierze udział w wewnątrzkomórkowym, metabolicznym przepływie puryn i w ten sposób zakłóca funkcje enzymów katalizujących ich biosyntezę. Doktorantka prześledziła drogę metabolitów pośrednich, powstałych w wyniku enzymatycznej transformacji izotopem $[^{13}C]$ RK w komórkach HepG2 i wykazała obecność licznych modyfikacji w DNA i RNA. Uzyskane wyniki wskazują, że w metabolizm pochodnych purynowych oraz regulację ich biosyntezy i transformację w komórkach nowotworowych, zaangażowane są wzajemnie się uzupełniające wszystkie trzy szlaki (*de novo*, rezerwowy i kataboliczny). Otrzymane wyniki potwierdzają, że w komórkach nowotworowych RK wykazuje złożony mechanizm działania, wywołując zaburzenia na poziomie cyklu komórkowego i proliferacji komórek, metabolizmu energetycznego, statusu redoks i statusu oksydacyjnego oraz asocjacji purynosomów, ostatecznie indukując śmierć komórki.

Uwagi:

- Opisując wyniki przedstawione na Rysunku 2F Autorka pisze o „ilościowym oznaczaniu ATP” i „pomiarze zawartości ATP”, choć mierzyła szybkość syntezy ATP.
- Na Rysunku 3B nie pokazano działania $40 \mu M$ RK i $40 \mu M$ 5'-monofosforanu RK (KMP), choć sugeruje to opis wyników.
- Analizując formowanie purynosomów w komórkach HepG2 po podaniu RK i w obecności inhibitora kinazy adenozyliny (ADKi) (Rysunek 8) zastosowano znacznie większe stężenia RK (250 i $500 \mu M$) niż we wcześniejszych analizach. Dlaczego?

W drugiej części Wyników (rozdział 4.2) Doktorantka wykazała, że RK wpływając na szlaki kluczowe dla wzrostu i apoptozy komórek, poprzez zakłócanie funkcji mitochondriów, może być potencjalnym środkiem mitotoksycznym. Doktorantka zastosowała ciekawe podejście eksperymentalne, w którym zastąpienie w pożywce hodowlanej glukozy galaktozą zwiększyło metabolizm tlenowy i uwrażliwiło komórki nowotworowe na zaburzenie funkcjonowania mitochondriów wywołane przez RK. W obecności galaktozy jako jedynej paliwa węglowodanowego, RK silniej indukuje apoptozę i produkcję RFT, silniej obniża potencjał błonowy i zużycie tlenu w mitochondriach, zmniejsza poziom glutationu i ATP, co prowadzi do utraty żywotności komórek.

Uwagi:

- Strona 148. Autorka pisze: „Wraz ze wzrostem przepływu metabolitów, wymuszonym przez glikolizę, proliferacja komórek nowotworowych jest wzmacniana w celu dostarczenia większej ilości energii.” Czy proliferacja komórek wzmacnia dostarczanie energii, czy jest na odwrót?

- Rysunek 10H, I. Brakuje oryginalnych wykresów zmian szybkości zużycia tlenu (OCR) i szybkości zakwaszania zewnątrzkomórkowego (ECAR) z aparatu Seahorse, które pozwoliły by ocenić udział fosforylacji oksydacyjnej i glikolizy tlenowej w metabolizmie badanych komórek nowotworowych. Ponadto, trudno zrozumieć wykresy pokazujące procentowe zmniejszenie podstawowej ECAR (Rysunek 10H) i zwiększenie maksymalnej ECAR (Rysunek 10I) dla komórek hodowanych z galaktozą w stosunku do komórek hodowanych z glukozą.

- Rysunek 15D. Status redoks w komórce lepiej obrazuje stosunek $NAD^+/NADH$ a nie samo stężenie formy utlenionej nukleotydu.

- Strona 164. Co Autorka rozumie przez „działanie uwalniające”, „uwolnienie” łańcucha oddechowego w obecności RK?

W trzeciej części Wyników (rozdział 4.3) Doktorantka porównała wpływ RK i jego nowo zaprojektowanych pochodnych (8-azaRK, 7-deazaRK) na status redoks komórek glejaka wielopostaciowego w hodowlach 2D i, co trzeba podkreślić, 3D. Zastosowanie sferoidów komórek T98G pozwoliło na wyselekcjonowanie jednej pochodnej - 7-deazaRK - o porównywalnej z RK aktywności przeciwnowotworowej. Oba związki indukowały powstawanie RFT i w konsekwencji stresu oksydacyjnego, powodując peroksydację lipidów i prowadząc do apoptozy. Doktorantka wykazała, że małowcząsteczkowe związki mogą być brane pod uwagę przy opracowywaniu nowych strategii leczenia nowotworów z uwzględnieniem zaburzeń funkcji mitochondriów oraz związanym z tym przekroczeniem progu stresu oksydacyjnego wywołującego śmierć komórek nowotworowych (terapię oksydacyjną).

- Rysunek 18B pokazuje obliczone wartości zapasowej pojemności oddechowej (SRC) i oddychania związanego z syntezą ATP (pojęcie stan 3 zarezerwowane jest dla oddychania izolowanych mitochondriów) komórek HepG2 i T98G. Brakuje zestawienia mierzonych wartości oddychania podstawowego, w obecności oligomycyny i rozpręgacza co pozwoliłoby na szerszą interpretację funkcjonowania mitochondriów w tych komórkach.

Obszerny, liczący 36 stron i podzielony na 3 części (odpowiadające 3 rozdziałom Wyników), rozdział Dyskusja w zasadzie wyczerpuje aspekty wynikające z wyników własnych na tle w pełni wykorzystanych wyników innych badaczy. Doktorantka solidnie i krytycznie przedyskutowała otrzymane wyniki, choć ich interpretacja nie zawsze była jednoznaczna. Lektura tego rozdziału, podobnie jak Wprowadzenia literaturowego, świadczy o dużej wiedzy Autorki i swobodnym poruszaniu się w literaturze naukowej związanej z metabolizmem puryn, działaniem związków małowcząsteczkowych, funkcjonowaniem komórek nowotworowych oraz istniejącymi i przyszłymi strategiami przeciwnowotworowymi. W czasie lektury tej części pracy nasunęło mi się pytanie. Czy na podstawie otrzymanych w pracy wyników można stwierdzić czy RK wywołuje zmiany w liczebności/biogenezie mitochondriów w komórkach nowotworowych?

Podsumowanie

Wspomniane wcześniej uwagi oraz błędy językowo-redakcyjne nie mają wpływu na moją wysoką ocenę przedstawionej pracy, jej wartości merytorycznej oraz znaczenia przeprowadzonych badań. Wyniki eksperymentów przedstawione w rozprawie są istotne dla



zrozumienia molekularnego mechanizmu działania rybozydu kinetyny i jego pochodnych w komórkach nowotworowych, a także w przyszłości do ich wykorzystania w leczeniu nowotworów. W szerszym aspekcie, badania opisane w ocenianej pracy doktorskiej są także ważne dla zrozumienia znaczenia zmian metabolizmu puryn oraz metabolizmu energetycznego w funkcjonowaniu i rozwoju patologii komórek/organizmów. Biorąc pod uwagę merytoryczną i innowacyjną wartość pracy, znaczenie przeprowadzonych badań, dużą pracowitość i różnorodność doświadczeń i analiz, a także umiejętność prezentowania i dyskusowania wyników, uważam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Wnioskuje zatem o dopuszczenie mgr Marty Orlickiej-Płockiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą

Wyróżnienie pracy doktorskiej, obok punktów już wymienionych, uzasadnia to że:

- Znaczna częśći wyników opisanych w pracy doktorskiej została opublikowana w 2 publikacjach w bardzo dobrych czasopismach o łącznym *IF* ~11 (*Apoptosis* 2020, *Antioxidants* 2021), w których doktorantka jest pierwszym autorem.
- Praca doktorska mgr Marty Orlickiej-Płockiej stanowi nowe, kompleksowe spojrzenie na mechanizm działania rybozydu kinetyny, obejmujące zarówno efekt proapoptotyczny związany z aktywnością mitochondriów a także udział we wszystkich trzech szlakach biosyntezy puryn (biosyntezie *de novo*, szlaku rezerwowym i katabolicznym).
- Doktorantka zastosowała oryginalne, ciekawe podejście eksperymentalne do badania działania rybozydu kinetyny na komórki nowotworowe. Wymuszone zamianą paliwa energetycznego (glukozy na galaktozę) przełączenie metaboliczne komórek nowotworowych stworzyło dogodny model badawczy, umożliwiający opisanie działania rybozydu kinetyny na funkcjonowanie mitochondriów i metabolizm tlenowy w komórkach nowotworowych.

Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz

W. Jarmuszkiewicz