



WOJSKOWY INSTYTUT HIGIENY I EPIDEMIOLOGII

im. gen. Karola Kaczkowskiego
01-163 Warszawa, ul. Kozielska 4
tel. 261 853 101, fax 261 853 133
e-mail: kancelaria.jawna@wihe.pl

#SZCZEPIMYSIE

Warszawa, 04 listopada 2021 r.

Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Rada Dyscypliny Nauki biologiczne
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Imię i nazwisko kandydata: **mgr inż. Justyna MARTYKA**

Tytuł rozprawy doktorskiej: **Charakterystyka molekularnego mechanizmu hamowania metabolizmu seryny jako potencjalnego celu terapeutycznego w zwalczaniu nowotworów**

Promotor: **dr hab. Agnieszka ŁOBODA, prof. UJ**

Promotor pomocniczy: **dr Adrian ZARĘBSKI**

Recenzent: **dr hab. n. med. inż. Beata PAJĄK, prof. WIHE**

Samodzielna Pracownia Genetyki i Biologii Molekularnej, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii im. gen. K. Kaczkowskiego w Warszawie

Wartość naukowa rozprawy

Oryginalność badań

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Martyki dotyczy weryfikacji możliwości zastosowania inhibitorów enzymów SHMT1/SHMT2, odpowiedzialnych za metabolizm seryny, jako narzędzi eliminacji komórek nowotworowych. Specyfika metabolizmu komórek nowotworowych oraz identyfikacja krytycznych dla aktywności metabolicznej białek/enzymów, jest elementem rozwijanej od lat strategii tzw. terapii celowanej. Pomimo ogromnego postępu w terapii nowotworów, wprowadzenia wielu innowacyjnych leków, inhibitorów kinaz, przeciwciał monoklonalnych, terapii immunologicznych, nadal istnieje potrzeba medyczna opracowywania nowych leków o wysokiej efektywności i wysokim profilu bezpieczeństwa dla pacjenta. Grupa kandydatów na leki z rodziny inhibitorów enzymów SHMT1/2 jest stosunkowo nowym kierunkiem badań, który jest intensywnie badany a prace z tego zakresu są publikowane aktualnie w najbardziej renomowanych czasopismach naukowych jak Science i Nature. Dostępne wyniki badań dotyczące celowanego hamowania aktywności SHMT1/2, w tym badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej, dowodzą, iż obrany kierunek badań jest obiecujący i wpisuje się w najnowsze trendy w badaniach przedklinicznych. Wartym podkreślenia jest także podjęta przez Doktorantkę próba stworzenia schematu screeningu nowych cząsteczek ukierunkowanych na szlak metabolizmu seryny, w zakresie mechanizmu działania i ich efektywności przeciwnowotworowej, który Doktorantka określa mianem „kaskady eksperymentalnej”. Narzędzie to może być zaadaptowane na potrzeby rozwoju dowolnych cząsteczek i stanowi unikalną platformę, która może być przydatna w standaryzacji prowadzonych badań, zwiększając także wiarygodność uzyskanych wyników.

Wartość naukowa rozdziałów

W rozprawie doktorskiej Doktorantka zawarła obszerny Wstęp, który wprowadza czytelnika w proces rozwoju leków od ich najwcześniejszych etapów do etapu badań klinicznych. Następnie Doktorantka opisuje zagadnienia specyfiki metabolizmu komórek nowotworowych i wykorzystania specyfiki procesów wewnątrzkomórkowych dla rozwoju nowych terapii. Jest to ciekawe opracowanie, które mogłoby stanowić samodzielną pracę przeglądową. W moim odczuciu korzystną nowością jest włączenie wątku dotyczącego rozwoju leku, który z perspektywy współpracy

Doktorantki z firmą Ryvu Therapeutics S.A., jest zrozumiała i pozwala na umiejscowienie roli badań podstawowych w procesach rozwoju nowych terapii. Doktorantka zwraca także uwagę na złożoność procesu rozwoju leku i jego wysokie koszty, już na etapie faz początkowych poszukiwania nowych kandydatów na lek. Część ta bezpośrednio uzasadnia podjęte przez Doktorantkę próby stworzenia kaskady eksperymentalnej testów, wykonywanych w skali średnio-przepustowej, która pozwoliłaby na szybsze i bardziej ekonomiczne identyfikowanie atrakcyjnych kandydatów na leki. Następnie, wykorzystując szeroki wachlarz zaawansowanych technik badawczych, w tym analizy z wykorzystaniem białek rekombinowanych, analizy na modelach *in vitro* oraz *in vivo* w zakresie farmakokinetyki cząsteczek, aż wreszcie analizy efektywności przeciwnowotworowej w modelach zwierzęcych, Doktorantka wykazała, iż jeden z testowanych inhibitorów SHMT1/2 – BASF6, wykazuje pozytywne efekty przeciwnowotworowe i może być rozpatrywany jako kandydat do dalszego rozwoju leku. Uzyskane wyniki mają wysoką wartość poznawczą a kompleksowość wykonanych badań z pewnością zasługują na publikację oryginalną wyników w czasopiśmie o wysokim IF.

Wartość merytoryczna rozprawy

Odmienność metabolizmu komórek nowotworowych jest strategią terapeutyczną, która jest intensywnie rozwijana w badaniach terapii przeciwnowotworowych. Doktorantka w pracy przedstawia we Wstępie wybrane zmiany metaboliczne komórek nowotworowych, uzasadniając obrany kierunek badań hamowania aktywności enzymów przemiany seryny jako czynnika kierującego komórki nowotworowe na drogę eliminacji. Doktorantka zauważa we wstępie, iż „Badania ostatnich lat wskazują, iż do tej listy (czytaj: listy cech fenotypu nowotworowego) należy dołączyć zdolność komórek nowotworowych do ucieczki spod nadzoru immunologicznego oraz ich zmieniony metabolizm” (s. 27). Należy tutaj sprostować, iż odmienność metabolizmu komórek nowotworowych jest jednak jedną z pierwszych cech komórek nowotworowych, która została opisana już w latach 20 XX w. przez m.in. Otto Warburga a pierwsze prace dotyczące hamowania metabolizmu glukozy przez inhibitory glikolizy, głównie 2-deosy-D-glukozę, są datowane na lata 50 XX w. Strategia ta nie jest zatem nową, lecz jedną z najstarszych w badaniach a brak jej klinicznej finalizacji wskazuje na trudność opracowania skutecznych i specyficznych leków, które mogłyby zostać wdrożone do terapii, co czyni zarazem badania Doktorantki ważniejszymi w perspektywie ich przyszłego wykorzystania. Doktorantka opisując specyfikę metabolizmu glukozy w komórkach nowotworowych, przytacza na stronie 31 dwie publikacje, które mają wskazywać na „istotną rolę oddychania komórkowego i metabolizmu mitochondrialnego we wzroście komórek nowotworowych”, negując zależność komórek nowotworowych od glikolizy. Chciałabym zauważyć, iż przytoczona praca pozycja 41 dotyczy raczej metabolizmu glutaminy i jego znaczenia dla aktywacji kinazy pERK a praca oznaczona pozycją 42 dotyczy roli mitochondrialnego DNA i jego zaburzeń dla procesów rozwoju guza. Nie odnoszą się one jednak do znaczenia procesu glikolizy, którego nadmierna aktywacja jest powszechnie uznanym zjawiskiem charakterystycznym dla komórek nowotworowych. O ile komórki nowotworowe różnych typów wykazują zróżnicowany udział glikolizy/oksydacyjnej fosforylacji w syntezie ATP, to rola glikolizy jako głównego szlaku utylizacji glukozy jest bezsporna.

W dalszej części pracy Doktorantka charakteryzuje odmienność metabolizmu seryny oraz znaczenia enzymów zaangażowanych w ich metabolizm. Płynnie przechodzi do roli enzymów SHMT1/2 w procesach nowotworowych. Doktorantka wskazuje, iż w rozwoju różnych typów nowotworów opisuje się nadekspresję mitochondrialnej formy SHMT, czyli SHMT2, podczas gdy nadekspresja SHMT1 jest opisywana tylko w komórkach raka płuc (s. 31). Analizując jednak dane dostępne w bazie ProteinAtlas.org można zauważyć, iż nadekspresja SHMT1 jest identyfikowana także w przypadku raka wątroby i nerki a według Gupta et al. (Oncogene, 2017, 36:4014-24) ma także znaczenie w patogenezie raka jajnika. W tym miejscu chciałabym także poprosić Doktorantkę o komentarz i opinię własną na temat możliwych przyczyn tak dużych różnic w aktywności SHMT2 i SHMT1 w nowotworach, gdyż tego wątku zabrakło moim zdaniem we wstępie pracy. Przedstawione założenia pracy i znaczenie enzymów SHMT1/2 uzasadniają postawione cele i analizę efektywności nowych inhibitorów tych enzymów. Badanie inhibitorów (niefortunnie określone chyba jako związki narzędziowe) były syntetyzowane przez firmę Ryvu Therapeutics na podstawie dostępnych patentów. Dodatkowo w badaniach dołączono ich nowe enencjomery. Doktorantka testowała łącznie 7 nowych cząsteczek. W zaprojektowanych badaniach wykorzystowała szereg najnowocześniejszych testów biochemicznych, cytotoksycznych, enzymatycznych zarówno w układzie pozakomórkowym z wykorzystaniem białek rekombinowanych, jak i na modelach linii komórkowych oraz prowadziła także badania na modelach zwierzęcych. Warto podkreślić, iż w badanych modelach *in vitro* znalazły się 3 rodzaje nowotworu a badania *in vivo* dotyczyły raka piersi oraz chłoniaka. Dodatkowo, w badaniach komórkowych *in vitro* zastosowano warianty linii komórkowych z wyciszonymi genami SHMT1/2 a także wykorzystywano stabilną linię komórkową, w której z zastosowaniem techniki CRISPR/Cas9 wyłączono gen SHMT1/2. Z całym przekonaniem mogę stwierdzić, iż tak rozległy

warsztat badawczy jest rzadkością w rozprawach doktorskich i zasługuje na uznanie, gdyż wymagał ogromnej pracy i biegłości w bardzo wielu procedurach badawczych. Jest to niewątpliwie duży atut merytoryczny uzyskanych wyników, które szczegółowo prowadziły Doktorantkę do kolejnych etapów potwierdzając mechanizm działania, specyficzność, efektywność badanych inhibitorów w warunkach licznych układów kontrolnych, zróżnicowanych pożywek wzrostowych czy obecności czynników przywracających hamowany metabolizm. Zaprezentowane wyniki nie budzą wątpliwości a zawarte w pracy wnioski mają swoje uzasadnienie w zaprezentowanych wynikach. W prezentacji wyników moje uwagi krytyczne dotyczą braku analizy densytometrycznej przy wynikach Western blot, jak na str. 88, gdyż co prawda Doktorantka wspomina o odnoszeniu się do poziomu białka referencyjnego GAPDH, jednak jego poziom na blacie nie jest równy, co wskazuje na różne stężenie białka nałożonego na dołek żelu. Wsparcie wyników wykresem densytometrycznym byłoby pomocne. Z kolei w Rozdziale 4.2.2. Doktorantka opisuje wyniki otrzymane z testu MTS, badającego żywotność komórek traktowanych badanymi inhibitorami SHMT1/2 ale w podsumowaniu wyników odwołuje się do zmian w proliferacji komórek. Żywotność i proliferacja nie są tutaj tożsame.

Przeprowadzone analizy pozwoliły na wytypowanie związku BASF-6 jako najbardziej obiecującego pod względem efektywności i parametrów farmakokinetycznych, który został finalnie przebadany w modelu raka piersi i chłoniaka u myszy. Analizy wykazały, iż BASF-6 miał skuteczne działanie w modelu chłoniaka ale nie wpływał istotnie na rozwój raka piersi. Doktorantka nie podjęła niestety próby dyskusji tej obserwacji, dlatego chciałabym by przedstawiła swoją interpretację tych wyników. Czy problemem może być penetracja cząsteczki do komórek docelowych w obrębie guza litego w raku piersi co z pewnością nie jest problematyczne w przypadku chłoniaków, gdy komórki krążą w organizmie? Może jest inna przyczyna? Chciałabym także by Doktorantka skomentowała wyniki farmakokinetyczne BASF-6, które wskazały bardzo krótki okres półtrwania i retencji cząsteczki w osoczu po podaniu doustnym. Parametry te były istotnie lepsze w przypadku podawania przez pompę osmotyczną ale patrząc w kierunku rozwoju leku i jego przyszłych zastosowań klinicznych, długotrwałe podawanie przez pompę może być trudne do wdrożenia. Warto zauważyć, iż ważnym etapem rozwoju leku jest jego odpowiednia formułacja, która może istotnie polepszyć jego parametry farmakokinetyczne. Czy są jakieś pomysły w tym zakresie ze strony firmy Ryvu Therapeutics?

Ciekawym wątkiem pracy jest także ocena współdziałania badanych inhibitorów z metotreksatem i identyfikacja rodzaju interakcji pomiędzy cząsteczkami. Należy bowiem pamiętać, iż standardem terapii przeciwnowotworowych jest jednak terapia skojarzona, stąd zaakcentowanie w badaniach Doktorantki również tego kierunku jest pozytywnym elementem. Co ważne, analiza wykazała, iż wybrane inhibitory BASF oraz metotreksat synergistycznie eliminują komórki nowotworowe co stanowi możliwy kierunek rozwoju terapii.

Dyskusja wyników pracy jest dojrzała i odwołuje się do najnowszych doniesień w obszarze opisywanych badań. Doktorantka biegle porusza się w licznych publikacjach, umiejętnie zestawiając uzyskane obserwacje z wynikami innych autorów. Identyfikuje zarazem słabe punkty oraz obszary, które wymagają dalszego pogłębienia, wskazując na dalsze kierunki badań. To mocna strona dysertacji.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska ma formę monografii w języku polskim, obejmującą 149 stron maszynopisu. Rozprawa ma klasyczny układ rozdziałów pracy, na który składają się jednobrzmiące Streszczenia w języku polskim i angielskim, obszerny liczący 29 stron Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Podsumowanie, które raczej winno być określone mianem Wniosków oraz wykaz cytowanego piśmiennictwa, które stanowią 127 pozycje, z czego ponad 100 jest z ostatnich 10 lat. Praca zawiera także Spis treści, Wykaz skrótów oraz informację o wykorzystanych w pracy Programach komputerowych i źródłach internetowych. Do pracy nie dołączono płyty CD zawierającej elektroniczną wersję pracy. Ponadto, wygodnym dodatkiem byłoby umieszczenie na końcu pracy Wykazu Rycin i Tabel zawartych w pracy doktorskiej.

Pod względem edycyjnym praca doktorska jest przygotowana bardzo schludnie, z troską o spójność oznaczeń, podpisów oraz form przedstawienia danych tak aby były one jasne w odbiorze. Co ważne, Ryciny zawierają wyczerpujące podpisy, które pozwalają na uzyskanie informacji o przedstawianym wyniku bez konieczności poszukiwania odnośników w tekście pracy. Jakość umieszczonych rycin, zdjęć i schematów jest wysoka i nie wzbudza zastrzeżeń. Jedyna uwaga krytyczna w tym zakresie dotyczy Rysunków 1-6 oraz 1-8, które, o ile opisane jako zmodyfikowane ryciny z zacytowanej publikacji, są w istocie ich wiernymi kopiami, zawierającymi jedynie polskie oznaczenia. Biorąc pod uwagę obowiązek powszechnego udostępniania rozprawy doktorskiej, moim zdaniem należy unikać dosłownego kopiowania szaty graficznej rycin, które mogłyby być dyskusyjne w zakresie powielenia.

W moim przekonaniu nie do końca precyzyjna jest forma przedstawienia Celów pracy Doktorantki, które są przedstawione w postaci opisowej, zatem trudno wyodrębnić precyzyjnie określone cele. Ponadto Doktorantka używa sformułowania „założeń” a nie celu pracy, co w tym przypadku nie jest tożsame. Założenia pracy zostały bowiem opisane we Wstępie pracy a Cele pracy winny przedstawiać konkretne, precyzyjne, jasno sformułowane zadania, które będą weryfikowane w badaniach. Celom pracy powinny odpowiadać korespondujące, precyzyjnie sformułowane Wnioski, co pozwala jasno ocenić, które cele udało się zrealizować i jakie są ich efekty. Zawarte w Podsumowaniu np. wnioskowanie o kombinacji z metotretksatem nie było bowiem zawarte w Celach pracy. Mam nadzieję, że Doktorantka uwzględni tę uwagę podczas przygotowywania prezentacji rozprawy Doktorskiej, co z pewnością ułatwi odbiór przekazywanych wyników.

Język rozprawy doktorskiej jest poprawny a Doktorantka w zręczny sposób formułuje treści. Pomimo złożoności opisywanych zjawisk, tekst jest zrozumiały i stanowi ciekawe opracowanie, które w moim przekonaniu mogłoby być źródłem wiedzy dla osób niezwiązanych na co dzień z treściami naukowymi. To z pewnością ważny atut pracy doktorskiej, świadczący o dużej wiedzy Doktorantki w opisywanym obszarze, swobodzie opisywania zjawisk i ich dojrzałej interpretacji. Z racji obowiązku Recenzenta winna jestem jednak zauważyć, iż w niektórych miejscach Doktorantka używa sformułowań potocznych lub skrótów myślowych, jak np.: „nieco lepszy efekt” (str. 81) (co rodzi pytanie jaki efekt?), „najgorszy % efektu” (str. 91) (raczej najniższy efekt hamujący aktywność enzymu), „czysta hodowla” (str. 45) (raczej sterylna hodowla), „zrobienie zdjęć komórkom” (str. 54) (raczej wykonanie zdjęć morfologii komórek), „identyczny sposób” (raczej analogiczna metoda) (str. 52), „opublikowane inhibitory” (raczej Wykaz inhibitorów o potwierdzonych właściwościach” (str. 42), „podniesiony poziom” (raczej istotnie wyższy poziom) (str. 39), które należałoby w przyszłości skorygować. Warto także w pracach naukowych używać precyzyjnych odniesień, nawet jeżeli chwilami wymaga to powtórzeń nazw własnych białek lub szlaków. Zaimki typu „ten, tego, tamten” w tak złożonych opisach zjawisk bywają mylące i zmuszają do powrotu do treści wcześniejszych w celu doprecyzowania myśli Autorki. Chciałabym podkreślić, iż zasygnalizowane błędy mają marginalne znaczenie dla ogólnego odbioru poprawności redakcyjnej rozprawy, którą oceniam bardzo pozytywnie.

Uwagi krytyczne

Uwagi krytyczne zostały zamieszczone przy każdym z omawianych aspektów rozprawy doktorskiej.

Ocena końcowa

Podsumowując, wysoko oceniam rozprawę doktorską Pani mgr. Justyny Martyki. Tematyka pracy jest aktualna, zawiera elementy nowości a zastosowany warsztat badawczy jest rozległy i zawiera najnowsze techniki biologii molekularnej. Otrzymane wyniki mają wysoką wartość poznawczą oraz stanowią kompleksowe opracowanie, które z pewnością spotka się z akceptacją czasopism. Wnioski są obiecujące i potwierdzają zasadność rozwoju obranej strategii terapeutycznej w poszukiwaniu nowych kandydatów na lek w terapii nowotworów wśród inhibitorów szlaku przemian seryny. Dostrzeżone uchybienia, braki czy drobne błędy nie umniejszają ogólnej wartości pracy, która jest bardzo pozytywna.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Justyny Martyki spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr inż. Justyny Martyki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną przedstawionej rozprawy, zastosowanie w badaniach nowych cząsteczek, niedostępnych w danych literaturowych w kontekście ich działania, złożoność zastosowanych modeli badawczych i ich wariantów, oraz ogromną ilość włożonej pracy w realizację celów pracy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

04.11.2021
data sporządzenia recenzji

KIEROWNIK
SAMODZIELNEJ PRACOWNI GENETYKI
I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii
dr hab. inż. Beata PAJĄK
podpis recenzenta