



Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Aoife Corcoran

pt.: "Testing calcemic and non-calcemic activities of new vitamin D₂ analogues via *in-vitro* and *in-vivo* studies"

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Aoife Corcoran wykonana została w Zakładzie Biotechnologii Białek, na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Marcinkowskiej. Przedstawiona mi do recenzji dysertacja liczy 168 ponumerowanych stron, w tym wstęp oraz przegląd literaturowy zajmują 43 strony, omówienie badań własnych wraz z opisem użytych związków i aparatury 74 strony, dyskusja wyników i wnioski 18 stron. Ponadto zamieszczony jest spis odnośników literaturowych. Praca doktorska, posiadająca bardzo staranną szatę graficzną, dotyczy czynności biologicznej analogów witaminy D₂. Należy więc uznać, że opisane w recenzowanej pracy badania mgr Aoife Corcoran pozostają w ścisłym związku z tematyką badawczą, realizowaną od szeregu lat przez prof. Ewę Marcinkowską i jej współpracowników.

Przedstawię teraz moją opinię o kolejnych częściach recenzowanej pracy. Na samym początku tekstu znajduje się zestaw skrótów stosowanych w tekście dysertacji, a następnie krótkie streszczenie obejmujące podstawowe informacje o hormonie witaminowym 1 α ,25-(OH)₂D₃ i jego analogach, zwłaszcza pochodnych 1 α ,25-(OH)₂D₂, a także bardzo zwięzłe przedstawienie badań opisanych w pracy doktorskiej wraz z najważniejszymi wnioskami.

Następnie, Doktorantka rozpoczyna przegląd literaturowy zaczynając od omówienia hematopoezy. Tak więc, przedstawia różne modele hematopoezy, opisując przy tym właściwości elementów morfotycznych krwi oraz drogi przekształceń hematopoetycznych komórek macierzystych oraz ich rolę w krwiotworzeniu. Kolejny podrozdział poświęcony jest białaczce, a dokładniej ostrej białaczce mieloblastycznej (szpikowej), która jest jedną z częściej spotykanych form (80%) tej choroby u ludzi dorosłych. Doktorantka dokładnie omawia klasyfikację tej choroby zgodnie z systemem WHO, przedstawiając istotne dane na temat jej patogenezы, metod terapeutycznych oraz ich skuteczności. Przechodzi następnie do opisu modeli komórkowych używanych do badania ostrej białaczki szpikowej, obejmujących pięć

linii komórkowych, m. in. KG1 oraz HL-60. Informuje przy tej okazji o odkryciu, że $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ indukuje różnicowanie komórek linii HL-60 do monocytów. Te właśnie obserwacje spowodowały tak znaczne zainteresowanie licznych grup badawczych na całym świecie syntezą analogów hormonu witaminowego i badaniem ich zdolności różnicujących komórki nowotworowe w celu znalezienia potencjalnych leków w terapii białaczki. Ostatni podrozdział wstępu poświęcony jest witaminom grupy D. Doktorantka skupia się na witaminach D_2 i D_3 , omawiając ich aktywne metaboliczne formy powstające w wyniku enzymatycznego hydroksylowania, zwraca także uwagę na problemy związane z ich toksycznością. Po zwięzłym omówieniu receptora witamin D (VDR) przechodzi do aktywności biologicznej kompleksu hormon witaminowy-VDR oraz jego roli transkrypcyjnej. Wyniki badań, wskazujących na to, że $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ reguluje ekspresję ponad 200 genów, a dla VDR zidentyfikowano w genomie ponad 2700 miejsc wiążących, daje pojęcie o roli witamin D w funkcjonowaniu organizmów żywych. W końcowej części rozdziału Doktorantka krótko omawia modyfikacje strukturalne analogów $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, otrzymanych na drodze syntetycznej, oraz wskazuje jakie związki witaminowe znalazły już zastosowanie terapeutyczne. Szkoda jednak, że przy podawaniu tak istotnych danych nie zamieściła wzorów strukturalnych tych witamin – znacznie ułatwiałoby to zorientowanie się, jakie zmiany budowy tych B-sekosteroidów okazały się obiecujące.

Następnie Doktorantka przedstawia główne cele swych badań, obejmujące:

- a) znalezienie analogów $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$ o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym (antybiałaczkowym); przy tej okazji opracowanie metody ustalania ich wiązalności z VDR;
- b) zbadanie dlaczego niektóre komórki, stosowane dla badań ostrej białaczki szpikowej, nie reagują na $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, inne natomiast ulegają różnicowaniu.

W kolejnych rozdziałach pracy podane są struktury analogów $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$, których badania opisane są w pracy. Struktury te dokumentują bliską współpracę prof. Ewy Marcinkiewicz z prof. Andrzejem Kutnerem, w którego zespole, w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie, przeprowadzono syntezy tych związków. Po wymienieniu zastosowanych do badań odczynników, linii komórkowych oraz wykorzystanej aparatury, opisane są techniki pracy z białkami (m.in. zestaw służący do badań wiązalności VDR z analogami witaminowymi) oraz RNA i DNA. Osobny podrozdział związany jest z badaniami aktywności kalcemicznej witamin prowadzonymi *in vivo* na myszach.

Główna część pracy opisuje już rezultaty badań Doktorantki nad trzema seriami związków witaminowych. Zaczynają się one od ustalenia aktywności biologicznej czterech analogów $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$, różniących się budową łańcucha bocznego. Jest to pierwsza badana

seria związków (PRI-1906, PRI-1907, PRI 1916 oraz PRI-1917), charakteryzujących się przedłużonym i rozgałęzionym łańcuchem bocznym, posiadającym układ sprzężonego dienu o różnych konfiguracjach jednego z podwójnych wiązań. Doktorantka postanowiła ustalić, jak te elementy strukturalne - długość łańcucha bocznego i konfiguracja wiązań - wpływają na aktywność różnicującą komórek linii HL-60 czterech wyżej wymienionych związków i porównać uzyskane wyniki z aktywnością hormonu witaminowego lub $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$. Okazało się, że wszystkie testowane analogi charakteryzowały się większą aktywnością różnicującą od hormonu witaminowego. Ustalono ponadto, że w przypadku analogów o mniej rozgałęzionym końcu łańcucha bocznego (PRI-1906 i PRI-1916), nie obserwuje się znacznych różnic aktywności, podczas gdy dla analogów o bardziej rozgałęzionym łańcuchu bocznym, zmiana konfiguracji wiązania podwójnego pomiędzy węglami 24 a 25 odgrywa znaczącą rolę, faworyzując związek o (24*E*)-konfiguracji. Te obserwacje zachęciły Doktorantkę do ustalenia i porównania wiązalności badanych związków z VDR. Wszystkie analogi okazały się w tym teście mniej aktywne od $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, zaobserwować można jednak silną zależność wiązalności od struktury łańcucha bocznego: w przypadku analogów o mniej rozgałęzionym końcu łańcucha bocznego związek o (24*Z*)-konfiguracji (PRI-1916) był ponad ośmiokrotnie bardziej aktywny, podczas gdy dla izomerów geometrycznych o bardziej rozgałęzionym łańcuchu bocznym, zależność ta była przeciwna.

Interesującą modyfikacją strukturalną analogów witamin D jest odwrócenie konfiguracji wiązania podwójnego pomiędzy węglami 5 i 6, czyli utworzenie (5*E*,7*E*)-izomerów. Słusznie więc, Doktorantka postanowiła przebadac kolejną serię związków, posiadających odwróconą konfigurację wiązania podwójnego połączonego z pierścieniem A. Były to analogi PRI-1730 (ten związek z „normalną” konfiguracją na C-5, dla porównania) oraz witaminy oznaczone symbolami od PRI-1731 do PRI-1734, różniące się budową łańcucha bocznego. W pierwszej serii testów Doktorantka ustaliła, jakie zdolności różnicujące mają badane analogi, prowadząc badania na komórkach linii HL-60. Wszystkie testowane związki okazały się wyraźnie mniej aktywne od wzorcowych: $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$ i $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, osiągając poziom ok. 50% zróżnicowanych komórek przy stężeniach wyższych przynajmniej o rząd wielkości. Najaktywniejsze okazały się związki dość drastycznie różniące się budową: PRI-1730, PRI-1731 i PRI-1733; pierwszy z nich ma (5*Z*)-konfigurację i podstawnik 22-hydroksylowy, drugi jest (5*E*)-izomerem $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$, a trzeci (5*E*)-izomerem 24-epi- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$. Zmiana konfiguracji 5*Z* → 5*E* w związku PRI-1730 spowodowała drastyczny spadek aktywności (analogi PRI-1732 i PRI-1734). Kontynuując swe badania, Doktorantka zbadała także poziom białka receptorowego – VDR w jądrach komórek HL-60 po potraktowaniu ich $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$ i

$1\alpha,25-(OH)_2D_3$, oraz analogami o symbolach od PRI-1730 do PRI-1734. Okazało się, że wszystkie testowane analogi słabiej podnoszą poziom nuklearnego VDR w porównaniu z wzorcowymi witaminami, przy czym najaktywniejsze były analogi PRI-1731 i PRI-1733, czyli $(5E)-1\alpha,25-(OH)_2D_2$ oraz jego 24-epimer. Także w przypadku tej drugiej serii testowanych związków Doktorantka postanowiła zbadać ich powinowactwo do VDR. Podsumowując wyniki przeprowadzonych testów Doktorantka zauważa, że tylko jeden ze związków, a mianowicie PRI-1731, zachował kilkukrotnie zmniejszoną (w porównaniu z naturalnym hormonem) zdolność wiązania się z receptorem, natomiast pozostałe analogi słabo wiązały się z VDR. Z danych przedstawionych w Tabeli 7.2. wynika jednak, że PRI-1730 miał bardzo zbliżoną wartość IC_{50} – wygląda na to, że jego wartość RBA została źle wyliczona (powinna wynosić 22.4). Biorąc pod uwagę to, że analog PRI-1734 nie miał praktycznie żadnych zdolności różnicujących, ani nie był w stanie podnieść poziomu VDR w jądrach komórkowych, Doktorantka postanowiła sprawdzić, czy związek ten nie wykazuje właściwości antagonistycznych. Przeprowadzone testy na komórkach HL-60 traktowanych łącznie tym związkiem i hormonem witaminowym wykluczyły jednak taką możliwość.

Kolejną, badaną przez Doktorantkę, serią związków były tzw. 19-norwitaminy, czyli związki pozbawione ugrupowania egzometylenowego przy C-10. Związkami wzorcowymi były: analog PRI-1907, a także PRI-5100 (paricalcitol) i jego 24-epimer PRI-5101. Badaniami aktywności w testach *in vitro* oraz *in vivo* objęto analogi PRI-5104 z 23-hydroksylem oraz związki PRI-5201 i PRI-5202. Najpierw, tak jak w przypadku poprzednich serii badań, Doktorantka określiła aktywność różnicującą testowanych analogów. Okazało się, że oba związki PRI-5201 i PRI-5202, posiadające łańcuchy boczne analogiczne jak w poprzednio badanych analogach PRI-1906 i PRI-1907, są znacznie bardziej aktywne niż związki wzorcowe; analog PRI-5104 z dodatkową grupą 23-hydroksylową charakteryzował się najmniejszą aktywnością. Stwierdzona w tych testach wysoka aktywność PRI-5201 i PRI-5202 skłoniła Doktorantkę do przeprowadzenia dokładniejszych badań, porównujących aktywność różnicującą wszystkich testowanych witamin w większym zakresie stężeń niż stosowane poprzednio. Uzyskane wyniki potwierdziły poprzednie obserwacje – związek PRI-1907, jego 19-nor analog PRI-5202 oraz 19-norwitamina PRI-5201 z mniej rozgałęzionym łańcuchem bocznym - były znacznie bardziej aktywne od $1\alpha,25-(OH)_2D_3$: pierwszy z nich ok. dziesięciokrotnie, a pozostałe trzydziesto- i szesnastokrotnie. Dalsze badania nad 19-norwitaminami i związkami wzorcowymi polegały na ustaleniu ich wpływu na poziom jądrowego VDR w komórkach linii HL-60. Doktorantka ustaliła, że i tym razem związkami o najwyższej aktywności były 19-norwitaminy PRI-5201 i PRI-5202. W kolejnym teście Doktorantka określała zdolność wiązania się badanych

analogów z VDR i okazało się, że ich powinowactwo do receptora nie koreluje ze zdolnością do różnicowania komórek HL-60. Niestety, śledzenie tych zależności jest utrudnione, ponieważ podane w Tabeli 7.5. wartości IC_{50} związków oraz ich wartości RBA nie zgadzają się dla wszystkich badanych analogów oprócz PRI-5104. Przykładowo - dlaczego PRI-5201 miałyby wykazywać większe powinowactwo do VDR od $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ skoro ma większą wartość IC_{50} ? Wątpliwości mogłyby być rozwiązane przez analizę wykresów obrazujących zależności dawka-efekt testowanych witamin (Figure 10.5.), jednak z przedstawionych na str. 140 krzywych nie można dokładnie wyliczyć wartości IC_{50} .

Sporo uwagi poświęciła następnie Doktorantka badaniom aktywności transkrypcyjnej analogów witamin D, porównując ją z działaniem $1\alpha,25-(OH)_2D_3$. I tak, okazało się, że analogi PRI-1907, PRI-5201 i PRI-5202 znacznie silniej od hormonu witaminowego indukują ekspresję białka CD 14 (zwłaszcza w zastosowanym stężeniu 1 nM). Podobne zależności znalazła Doktorantka badając transkrypcję enzymu *CYP24A1*, odpowiedzialnego za 24-hydroksylowanie $1\alpha,25-(OH)_2D_3$, prowadzące do jej degradacji.

Po zbadaniu aktywności *in vitro* analogów, Doktorantka przystąpiła do bardzo ważnego fragmentu swych badań, jakim było ustalenie kalcemiczności testowanych związków. Ten test *in vivo* polegał na pomiarach poziomu wapnia w osoczu krwi myszy po podaniu im odpowiednich dawek witamin. Po przeprowadzeniu badań okazało się, że najniższa aktywność charakteryzuje analogi PRI-1907 i PRI-5202, jednak pozostałe testowane witaminy (PRI-5100, PRI-5101, PRI-5104 i PRI-5201) - choć bardziej od nich kalcemiczne - wykazują znacznie mniejszą aktywność od $1\alpha,25-(OH)_2D_3$.

W końcowej części badań własnych Doktorantka przeprowadziła szereg interesujących eksperymentów starając się ustalić, jakie czynniki mogą wspomóc działanie $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ różnicujące komórki nowotworowe linii HL-60 oraz KG1.

W kolejnej części pracy, obejmującej dyskusję nad otrzymanymi wynikami, Doktorantka słusznie podkreśliła, że pomimo dość szeroko zakrojonych badań nad potencjalnym zastosowaniem witamin grupy D do leczenia ostrej białaczki szpikowej, prowadzonych do tej pory przez liczne grupy badawcze, zagadnienie struktura – aktywność tych związków wymaga dalszych pogłębionych studiów. Trzy interesujące serie analogów $1\alpha,25-(OH)_2D_2$, otrzymane w Instytucie Farmaceutycznym przez członków zespołu prof. Andrzeja Kutnera, znakomicie nadawały się do badań, realizowanych przez Doktorantkę. W rozdziale tym przedstawia ona podsumowanie swych eksperymentów, skupiając się na analizowaniu obserwowanych różnic aktywności związków i łącząc je z określonymi modyfikacjami strukturalnymi obecnymi w ich cząsteczkach. Dyskusję tę czyta się z zainteresowaniem, chociaż

z korzyścią dla jej klarowności byłoby pewne skrócenie tekstu i skoncentrowanie się na najważniejszych rezultatach. Zgodzić się wypada z Doktorantką, że z trzech serii badanych związków, tylko dwa z nich, a mianowicie analogi PRI-5201 i PRI-5202, mają szansę na terapeutyczne zastosowanie. Tak więc, bardzo obiecujące modyfikacje strukturalne cząsteczki witaminy D polegają na: (a) obecności w niej wydłużonego, usztywnionego wiązaniem podwójnymi łańcucha bocznego z terminalną grupą hydroksylową, oraz (b) usunięciu ugrupowania egzometylenowego przy C-10.

Z przeprowadzonych przez Doktorantkę badań nad ustaleniem, czy $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ może, współdziałając z innymi modulatorami epigenetycznymi, stymulować różnicowanie komórek nowotworowych, które nie zachodzi pod działaniem samego hormonu witaminowego, wynika że jest to możliwe. Dane te sugerują, że VDR jest częściowo regulowany mechanizmami epigenetycznymi.

W końcowych konkluzjach Doktorantka na jednej stronie podsumowuje swe najważniejsze ustalenia, podając je w dziewięciu punktach – taki lapidarny sposób ich prezentacji uznać należy za bardzo udany.

Praca napisana jest poprawnym językiem, trafiają się w niej wprawdzie błędy literowe i stylistyczne, jednak jest ich na tyle mało, że nie jest celowe ich wymienianie. Nieliczne usterki omawianego przeze mnie tekstu podałem już w poprzednich fragmentach mojej recenzji. Chciałbym w tym miejscu podzielić się pewną wątpliwością dotyczącą klasyfikowania niektórych badanych witamin do grup z pojedynczą lub podwójną modyfikacją strukturalną (single-point, double-point modification). Moje zastrzeżenia przedstawię na przykładzie związku PRI-1504, zakwalifikowanego (Figure 5.3., str. 51) do grupy z pojedynczą modyfikacją. Analizując budowę tego analogu dostrzegam nie jedną, a trzy modyfikacje: (a) w łańcuchu bocznym – grupa 23-OH, (b) we fragmencie hydrindanowym pierścieni B/C – odwrócenie konfiguracji na C-14, (c) w pierścieniu A - usunięcie ugrupowania egzometylenowego przy C-10.

Recenzowana dysertacja doktorska zawiera bogaty i interesujący materiał eksperymentalny. O biegłości eksperymentalnej Autorki świadczą starannie wykonywane, niełatwe eksperymenty, opisane w badaniach własnych i prawidłowo zinterpretowane. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania wskazują, moim zdaniem, na Jej pełną dojrzałość naukową. Jestem przekonany, że zbadane przez Nią witaminy grupy D i obserwacje poczynione podczas ich biologicznej ewaluacji wzbogacają naszą wiedzę nad niedostatecznie jeszcze poznanym zagadnieniem ich aktywności.

Biorąc pod uwagę szeroko zakrojone studia Doktorantki nad aktywnością biologiczną licznych witamin D o zróżnicowanej strukturze, nie może dziwić Jej znaczny dorobek publikacyjny – badania związane z przedstawioną dysertacją opublikowane zostały w czterech artykułach, w recenzowanych czasopismach naukowych o znacznym współczynniku oddziaływania (IF), a także w artykule przeglądowym.

W konkluzji stwierdzam z całym przekonaniem, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 14 marca 2003 roku oraz wnoszę o dopuszczenie mgr Aoife Corcoran do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 25.02.2017 r.



Prof. dr hab. Rafał R. Siciński

tel. 22 55 26 252
e-mail: rasici@chem.uw.edu.pl