

Dr hab. Janusz Matuszyk



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirszfelda
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości: IMMUNE

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 fax: (+48-71) 337 21 71
<http://www.iitd.pan.wroc.pl>

Wrocław, 16 czerwca 2014

Ocena rozprawy doktorskiej

Pani mgr Hanny Burskiej

**p.t. „Badanie zależności funkcji indukcji różnicowania komórek ostrych białaczek szpikowych
od struktury analogów witamin D₂ oraz D₃”**

wykonanej w Zakładzie Biotechnologii Białek Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego
pod kierunkiem Pani Profesor dr hab. Ewy Marcinkowskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy badań zmierzających do wybrania analogów witaminy D w celu wykorzystania w terapii przeciwbiałaczkowej. Działanie genomowe aktywnych form witaminy D wymaga wnikięcia do wnętrza komórki i połączenia liganda z receptorem jądrowym witaminy D (VDR). Białka VDR należą do nadrodziny receptorów jądrowych, czyli czynników transkrypcyjnych regulowanych przez ligand. Heterodimery białek VDR z białkami RXR, także receptorami jądrowymi, mogą oddziaływać z odpowiednimi elementami odpowiedzi (VDRE) w regionach promotorowych regulowanych genów. Wejście aktywnej formy witaminy D do kieszeni wiążącej ligand powoduje takie zmiany konformacyjne w białku VDR, które prowadzą do dysocjacji korepresorów transkrypcji, rekrutacji koaktywatorów transkrypcji i we współdziałaniu z innymi czynnikami transkrypcyjnymi prowadzi do aktywacji regulowanych genów. Produkty genów aktywowanych przez receptor jądrowy VDR biorą udział w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej i metabolizmu tkanki kostnej. Nadmiar witaminy D, a ściślej kalcitriolu, czyli biologicznie aktywnej 1,25-dihydroksywitaminy D₃ (w skrócie 1,25D) może jednak prowadzić do niekorzystnej hiperkalcemii. Receptor jądrowy VDR także aktywuje geny kodujące białka zaangażowane w procesy proliferacji, apoptozy i różnicowania komórek. Wcześniejsze badania różnych autorów wskazywały na przeciwnowotworowe działanie kalcitriolu w doświadczalnej terapii raka gruczołu krokowego, raka gruczołu sutkowego, białaczek szpikowych. W szczególności transkrypcja genu CDKN1A, kodującego białko p21/WAF1, chociaż jest regulowana głównie przez białko p53, także może być indukowana

przez receptor jądrowy VDR. Transkrypcja genu CDKN1B, kodującego białko p27/Kip1, także jest pośrednio indukowana przez kalcytriol. Białka p21/WAF1 i p27/Kip1 są inhibitorami kinaz zależnych od cyklin i hamują progresję cyklu komórkowego z fazy G1 do fazy S. Wykazano we wcześniejszych badaniach (Cancer Res. 1996, 56: 264; Genes Dev. 1996, 10: 142), że kalcytriol może hamować proliferację komórek linii ludzkiej białaczki promielocytarnej HL60 i ludzkiej białaczki monocytarnej U937 i pobudzać różnicowanie komórek białaczkowych w kierunku makrofagów (CD14⁺). Stąd też ważne jest poszukiwanie nowych analogów witaminy D odznaczających się obniżoną aktywnością wapniową w stosunku do kalcytriolu i większą zdolnością hamowania proliferacji i pobudzania różnicowania komórek ostrych białaczek szpikowych (AML). Wybór badanych przez Doktorantkę analogów witaminy D i zastosowanych w badaniach modeli komórkowych *in vitro* jest konsekwencją wieloletnich badań prowadzonych pod kierunkiem Pani Promotor. Doktorantka sformułowała kilka celów szczegółowych rozprawy, które zmierzały do wybrania najlepszych analogów witaminy D pod względem zdolności pobudzania *in vitro* różnicowania komórek jednojądrzastych krwi obwodowej pacjentów z AML oraz linii ludzkich białaczek mielocytarnych, a także prowadziły do pytań o związek między strukturą chemiczną analogów witaminy D i ich zdolnością do pobudzania różnicowania komórek białaczkowych w kierunku monocytarno-makrofagowym. Doktorantka także zamierzała badać wpływ wybranych analogów witaminy D na aktywność genu kodującego białko CYP24A1, hydroksylazę katalizującą przemianę kataboliczną kalcytriolu.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest bardzo obszerna i obejmuje 203 strony, w tym: wstęp (37 stron), cel pracy, materiały i metody (16 stron), wyniki przedstawione w 5 częściach (59 stron), dyskusja (21 stron), wnioski, aneks, spis rycin i tabel, piśmiennictwo (225 pozycji, w tym ¼ z XXI wieku) i wykaz publikacji własnych (6 pozycji, sumaryczny wskaźnik wpływu około 14). Na początku pracy umieszczono informację o źródłach finansowania badań, spis treści, wykaz skrótów, streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim. Język pracy jest poprawny, chociaż wadą jest:

- nadużywanie słowa ekspresja, gdyż ekspresji ulegają geny, a nie białka;
- używanie pojęcia „ w rejonie promotora genu” (str.20) lub „w sekwencjach promotorowych” (str.24) na oznaczenie sekwencji nie należących do ścisłego promotora, lecz do regionu promotorowego;
- opisanie genu p53 jako protoonkogenu (str.45);
- informacja, że CD14 zabarwiono FITC (str.72), podczas gdy używano koniugatu PE i przeciwciała przeciw CD14 (wg informacji w części Materiały, str.58);
- wyrażenie „selekcja negatywna” (str.72) na oznaczenie bramki elektonicznej w analizie FACS.

Wstęp pracy zawiera niezbędne informacje dotyczące metabolizmu witaminy D ze szczególnym zwróceniem uwagi na znaczenie 24-hydroksylazy (CYP24A1) w przemianie katabolicznej kalcytriolu. Następnie opisano budowę i mechanizm aktywacji receptora jądrowego VDR, analogi witaminy D i ich zastosowanie w leczeniu łuszczycy. Przedstawiono także proces hematopoezy i klasyfikację ostrych białaczek szpikowych. Informacje zawarte we wstępie są wystarczające do zrozumienia pozostałych części pracy. Wadą jest informacja o elementach odpowiedzi na witaminę D (VDRE) na str.20, podczas gdy dopiero na str. 29 opisano VDRE jako sekwencje typu DR3 lub ER6.

Wstęp prowadzi do sformułowania celu pracy w siedmiu punktach. Na początku dyskusji ponownie sformułowano cel przeprowadzonych badań, jednak już tylko w 4 punktach. Nie jest jednak dla oceniającego jasne dlaczego w celu „zbadania mechanizmów zróżnicowanej aktywności badanych związków w zależności od ich struktury” skupiono się na wyjaśnieniu wpływu kalcytriolu i analogów witaminy D na ekspresję genu kodującego CYP24A1, a całkowicie pominięto problematykę związaną z potencjalnie różną zdolnością analogów witaminy D do indukcji takich zmian konformacji receptora, które mogą skutkować zróżnicowaną rekrutacją koaktywatorów transkrypcji do białka VDR.

Metody badawcze i wyniki pracy zostały rzetelnie opisane i poddane analizie statystycznej. Indukcję różnicowania komórek białczkowych traktowanych analogami witaminy D w kierunku komórek CD14⁺ oceniano w oparciu o wyniki analiz przeprowadzonych przy użyciu cytometru przepływowego. Jest to uzasadnione, gdyż antygen CD14 jest wczesnym i głównym markerem różnicowania linii monocytarno-makrofagowej.

Na podstawie wyników przeprowadzonych doświadczeń, zarówno przy użyciu komórek białczkowych pacjentów, jak i ustalonych linii komórkowych, Doktorantka słusznie stwierdza w części Dyskusja, że „aktywność analogów PRI-1906, PRI-1907, PRI-2191 i PRI-2201 jest zbliżona lub wyższa niż 1,25D” (str.138). Sugeruję jednak ostrożniejsze wyciąganie niektórych wniosków, gdyż ze względu na zbyt małą liczbę próbek nie wydaje się uprawnione stwierdzenie na str.77, że pacjenci z podtypem białaczki AML-M5a reagują na różnicowanie lepiej od pozostałych: według tabeli 3 (str.56) analizowano AML-M5a tylko od 2 pacjentów! Natomiast na uwagę zasługuje poparty wynikami doświadczeń wniosek Doktorantki, że „brak zdolności PRI-1909 do indukcji jądrowej translokacji C/EBPβ a także VDR może wyjaśniać jego słabe zdolności pro-różnicujące w kierunku monocytarno-makrofagowym.” (w części Wyniki, str.101).

Interesującą częścią pracy Doktorantki jest weryfikacja hipotezy, że wzrost ilości białka VDR w jądrze komórkowym jest spowodowany stabilizacją receptora przez ligand – kalcytriol. Co ciekawe,

aktywniejszy od kalcitriolu analog PRI-1907, w następstwie traktowania komórek HL60 przez 24 godziny, powodował występowanie wyższego poziomu białka VDR w jądrach komórkowych w porównaniu z komórkami traktowanymi kalcitriolem, co dokumentuje wynik na rycinie 17, str.97. Można żałować, że w pracy nie posłużono się metodami analizy reporterowej do oceny badanych analogów pod względem ich zdolności do aktywacji receptora jądrowego VDR. Chciałbym prosić Doktorantkę o ustosunkowanie się do tej kwestii.

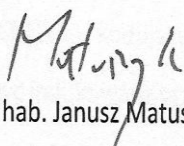
Rozprawę kończy sformułowanie 20 szczegółowych wniosków, które są poparte wynikami przeprowadzonych doświadczeń. Wniosek 4 wskazuje na wyselekcjonowane analogi witaminy D: PRI-1907, PRI-1906 oraz PRI-2191, które okazały się „najsukuteczniejszymi analogami indukującymi różnicowanie w kierunku monocytarno-makrofagowym”. Wniosek 5 dodatkowo podkreśla, że „analog PRI-1907 wykazuje bardzo wysoką aktywność w niskich stężeniach, co zaobserwowano zarówno w liniach komórkowych, jak i w komórkach pacjentów z AML.”

Na uwagę zasługuje dobrze udokumentowany wniosek 2 zwracający uwagę, że „komórki pacjentów z mutacją w genie Flt3 reagują na związki pro-różnicujące słabiej (...) niż komórki pacjentów nie posiadających” tej mutacji.

Na pytanie o zależność struktura-funkcja odpowiada wniosek 6, który stwierdza, że „wydłużenie łańcucha bocznego na węglu C25 do grupy etylowej (PRI-1907) podczas syntezy analogów, znacznie podnosi ich aktywność, natomiast dalsze wydłużanie łańcucha wywołuje efekt przeciwny.” Interesujący jest komentarz Doktorantki, że „zbyt długi łańcuch boczny w strukturze badanych związków może powodować blokadę przestrzenną i hydrofobową pomiędzy ligandem a resztami aminokwasowymi w domenie wiążącej ligand receptora VDR” (str.140). Natomiast pewien niedosyt recenzenta budzi brak bardziej ogólnego wniosku dotyczącego zależności „funkcji indukcji różnicowania komórek ostrych białaczek szpikowych od struktury analogów” witaminy D.

Podsumowując należy stwierdzić, że Doktorantka zrealizowała postawione cele. Otrzymane wyniki zostały już częściowo opublikowane w pismach o zasięgu międzynarodowym: w pięciu pracach oryginalnych i w jednej pracy przeglądowej. Doktorantka jest współautorem tych prac; w tym jest pierwszym autorem trzech artykułów. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, przygotowana pod opieką Promotora, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, zatem spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim pod względem formalnym i merytorycznym, określone w Dzienniku Ustaw nr 65, poz. 595 z dnia 14 marca 2003 r. oraz nr 84, poz. 455 z dnia 18 marca 2011 r. Dorobek naukowy Doktorantki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Hanny Baurkiej do dalszych etapów

przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę publikacje oryginalne Doktorantki wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



Dr hab. Janusz Matuszyk