



nencki institute
of experimental biology

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

EU Centre of Excellence in Neurobiology, *BRAINS*

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland

Phone: (48-22) 58 92 000; Fax: (48-22) 822 53 42

E-mail: sekretariat@nencki.gov.pl; <http://www.nencki.gov.pl>

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Hanny Burskiej

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

Rozprawa doktorska pani mgr Hanny Burskiej przedstawia wyniki badań przeprowadzonych przez doktorantkę w Zakładzie Biotechnologii Białek Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem pani prof. dr hab. Ewy Marcinkowskiej. Praca dotyczy niezwykle istotnego zagadnienia, jakim jest zastosowanie różnicowania jako strategii terapeutycznej w leczeniu ostrych białaczek szpikowych oraz zbadanie zdolności 1,25-dihydroksywitaminy D₃ (1,25D) oraz semi-selektywnych analogów do indukcji różnicowania komórek białaczkowych. Ostre białaczki szpikowe (AML) to bardzo heterogenna grupa białaczek, co znacząco utrudnia ich leczenie ze względu na brak specyficznych terapii. Występują przede wszystkim u dorosłych, związane są z zaburzeniami różnicowania prowadzącymi do nagromadzenia w szpiku niedojrzałych komórek krwiotwórczych typu mieloidalnego. Do niedawna, na podstawie morfologii i immunofenotypowania, AML klasyfikowano na dziewięć podtypów. Obecnie WHO wprowadziło bardziej szczegółową klasyfikację na podstawie zmian na poziomie molekularnym oraz ilościowych i strukturalnych aberracji chromosomowych. Ze względu na dużą różnorodność podklas AML, stosowane strategie terapeutyczne muszą być bardzo specyficzne, do czego niezbędne jest poznanie molekularnych podstaw tego schorzenia. Zastosowanie związków indukujących różnicowanie w leczeniu ostrych białaczek jest postulowane już od jakiegoś czasu i badania w tej dziedzinie prowadzone są intensywnie. Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki, podjęty temat jest aktualny i bardzo ważny z punktu widzenia poznania biologii nowotworów oraz potencjalnych nowych strategii terapeutycznych.

Cel pracy określony został jasno, podobnie jak poszczególne zadania prowadzące do jego realizacji. Doktorantka podjęła się żmudnego i trudnego zadania określenia korelacji pomiędzy różnymi podtypami AML a podatnością na różnicowanie 1,25-dihydroksywitaminą D₃ (1,25D) oraz jej syntetycznymi analogami a także wyselekcjonowania analogów o najsilniejszym działaniu indukującym różnicowanie. Kolejnym celem była próba określenia mechanizmu leżącego u podstaw zróżnicowanej wrażliwości na różnicowanie. Biorąc pod uwagę złożony charakter AML, jak i podział na wiele podtypów, podjętą próbę sklasyfikowania ich podatności na różnicowanie pod wpływem 1,25D i jej ośmiu analogów uznaję za zadanie ambitne i wartościowe zarówno z czysto naukowego jak i potencjalnego terapeutycznego punktu widzenia. Podstawową funkcją biologiczną 1,25 dihydroksywitaminy D₃ jest regulacja homeostazy wapniowo-fosforanowej, jednak związek ten wykazuje także

szereg innych „nieklasycznych” funkcji związanych z regulacją między innymi proliferacji i różnicowania. Zastosowane w pracy syntetyczne analogi wykazywały zmniejszoną aktywność wapniową, co czyni je lepszymi kandydatami do zastosowań klinicznych ze względu na obniżone efekty uboczne związane z mobilizacją jonów wapnia do surowicy i bardzo niebezpiecznym odwapnieniem kości i powstawaniem złogów wapnia w tkankach. Doktorantka zidentyfikowała zależności między strukturą analogów a ich zdolnością do indukcji różnicowania. Na uznanie zasługuje przeanalizowanie bardzo bogatego materiału, zarówno klinicznego, jak i włączenie do badań wielu linii komórkowych odpowiadających różnym podtypom AML.

W liczącym 36 stron *Wstępie* przedstawiono informacje wprowadzające czytelnika w badane zagadnienia, potrzebne do zrozumienia założeń pracy oraz przeprowadzonych doświadczeń. W trzech osobnych częściach opisano syntezę, katabolizm, biologiczne działanie witaminy D ze szczególnym uwzględnieniem różnicowania, semi-selektywne syntetyczne analogi 1,25D, prawidłową hematopoezę oraz białaczki – ich ogólną charakterystykę, diagnostykę i klasyfikację ostrych białaczek szpikowych oraz aktualne strategie terapeutyczne. Wymagało to od doktorantki kompleksowego spojrzenia na aktualny stan wiedzy dotyczący tematyki, którą się zajmuje. Co ważne, *Wstęp*, mimo że jest dość obszerny, nie jest pracą przeglądową na temat nowotworzenia, ale stanowi wyselekcjonowany zbiór potrzebnych informacji.

Materiały i Metody opisane zostały w przeważającej większości dokładnie, z dbałością o detale. Autorka przedstawia metody izolacji i hodowli komórek pierwotnych oraz hodowle linii komórkowych, charakterystykę materiału od pacjentów na podstawie przynależności do różnych grup, opisuje użyte analogi 1,25D, metody oznaczania stopnia zróżnicowania komórek oraz metody biologii molekularnej i komórkowej wykorzystane w trakcie realizacji projektu. W opisie przeciwciał wykorzystanych do badań z wykorzystaniem techniki Western Blot brakuje jednak szczegółowych informacji na temat przeciwciał. Podanie numeru katalogowego, izotypu, nazwa klonu itp. umożliwiłyby przyszłym czytelnikom wykorzystanie sprawdzonych przez autorkę przeciwciał. Brakuje niektórych informacji dotyczących analiz cytometrycznych, o czym napisałam w uwagach szczegółowych.

Wyniki opisane są na 25 stronach i przedstawione na 29 wykresach, 11 rysunkach i 14 tabelach. Założone przez autorkę cele zostały zrealizowane. Doktorantka zbadała podatność na różnicowanie komórek różnych typów AML oraz wyselekcjonowała najaktywniejsze analogi wskazując zależności strukturalne. Zdefiniowanie grup pacjentów, dla których zaproponowana terapia byłaby skuteczna, było trudnym zadaniem. Wraz z zastosowaniem różnych kryteriów podziału pacjentów AML, odpowiedź komórek izolowanych od pacjentów z poszczególnych grup różniła się. Ponadto, część pacjentów należała też do kilku grup jednocześnie, co utrudniało analizę. Autorce udało się jednak zdefiniować grupy pacjentów z mutacjami w genach Flt3 oraz NPM1, których komórki reagowały odpowiednio słabiej lub silniej na 1,25D. Także, wg innego podziału, komórki od pacjentów podtypu AML-M5a i AML-M5b oraz z prawidłowym kariotypem były wrażliwsze na różnicowanie niż komórki izolowane od pozostałych pacjentów. To bardzo ważne osiągnięcia z punktu widzenia potencjalnych przyszłych zastosowań klinicznych. Pewnym nadużyciem są jednak stwierdzenia pojawiające się w konkluzjach, że pacjenci odpowiednich grup wykazują

większą lub niższą wrażliwość na różnicowanie (np. strona 78). Mimo, że wyniki uzyskane na wyizolowanych komórkach były przekonujące i nie budziły wątpliwości, nie jest to jednoznaczne z założeniem, że tak samo na badane związki będą reagować pacjenci. Uzyskane wyniki są bardzo obiecujące i są doskonałym punktem wyjścia do dalszych badań, ale nie uprawniają do tak daleko idących wniosków. Doktorantka podsumowuje, że badania na liniach komórkowych wskazały, że to nie mutacja w genie Flt3 jest odpowiedzialna za słabszą wrażliwość. Według mnie wniosek ten może jednak być zbyt pochopny. Komórki linii hodowanych w laboratoriach mają wiele nowych zmian genetycznych, różnią się znacznie od swojego pierwowzoru i być może wytworzyły mechanizm kompensujący mutację Flt3. Wydaje mi się, że wyniki uzyskane na komórkach od pacjentów są bardziej wiarygodne, chociaż obserwacja ta wymaga dalszego zweryfikowania. Wykluczono także, że zmieniony katabolizm jest odpowiedzialny za wysoką aktywność jednego z analogów. Doktorantka stwierdziła też, że istnieje korelacja pomiędzy indukcją ekspresji jądrowego receptora VDR oraz C/EBPbeta w jądrze komórkowym a zdolnością analogów do różnicowania komórek. Te wyniki uzyskane za pomocą analizy frakcji białkowych są jednak dla mnie dyskusyjne, o czym szczegółowo napisałam w dalszej części recenzji. Oznaczony polimorfizm FokI VDR nie wyjaśnił różnic w podatności komórek AML na indukcję różnicowania. Mimo, że nie udało się jednoznacznie scharakteryzować mechanizmu stojącego u podstaw różnej wrażliwości podtypów komórek AML na różnicowanie, autorka wskazuje jednak na pewne przesłanki, które mogą być podstawą dalszych badań. Nie ujmuje to w żaden sposób wartości pracy. Poszukiwanie odpowiedzi na trudne pytania naukowe wiąże się z koniecznością zmierzenia się ze złożonymi zagadnieniami i niełatwą drogą, jaką musi przejść młody naukowiec.

Dyskusja liczy 20 stron. Odnosi się w wyważony sposób i z wymaganą ostrożnością do uzyskanych wyników. Wydaje mi się, że w zbyt dużej mierze autorka powtarza omawianie przeprowadzonych doświadczeń i uzyskanych wyników. Większe skoncentrowanie uwagi na podsumowaniu uzyskanych wyników i omówienie ich znaczenia w kontekście badań innych autorów ułatwiłoby czytelnikowi ocenę wagi przedstawionych danych. Niezależnie od powyższej uwagi, dyskusja stanowi wartościowe podsumowanie pracy. Brakuje mi jednak w *Dyskusji* dojrzałego, syntetycznego spojrzenia na wszystkie uzyskane wyniki i próby oceny ich znaczenia w świetle aktualnej wiedzy, zwłaszcza że zagadnienia, którymi się zajmowała są bardzo aktualne i intensywnie badane. Ma to też odzwierciedlenie w przedstawionych w osobnym rozdziale *Wnioskach*. Wyszczególnione 22 Wnioski, to raczej spis i podsumowanie wyników, niż wynikające z tych wyników wnioski. Te powinny zostać ujęte w kilku związanych i syntetycznych punktach.

Praca przygotowana jest starannie pod względem edytorskim. Dopatrzyłam się jedynie drobnych nieścisłości i nieprawidłowych sformułowań, np. PBS to buforowany roztwór soli (fizjologicznej) a nie bufor, białka lub kwasy nukleinowe rozdziela się nie „w elektroforezie” (str. 65), a stosując elektroforezę lub elektroforetycznie, bo elektroforeza to nazwa techniki i zjawiska poruszania się naładowanych cząstek w polu elektrycznym. Polską nazwą angielskiego terminu „blast cells” powinny być chyba albo „blasty” albo „komórki blastyczne” a nie „komórki blastów”.

Po zapoznaniu się z przedstawioną rozprawą, chciałabym przedyskutować następujące zagadnienia:

1. Moje zastrzeżenia budzą doświadczenia, w których metodą Western Blot oznaczano poziom białek we frakcjach komórkowych. Dotyczy to oznaczenia poziomu białka VDR (Rys. 17 i 18, str. 97-98) i badania lokalizacji wewnątrzkomórkowej czynnika C/EBPbeta (Rys. 19 i 20 na str. 102 i 103) we frakcjach jądrowej oraz cytozolowo-błonowej, oraz badania poziomu białka CYP24A1 we frakcji mitochondrialnej (Rys. 22, 23 na str. 110 i 111 oraz Rys. 24 na str. 125). Podstawowym wymogiem tego typu doświadczeń jest przedstawienie kontroli poziomu białek i czystości poszczególnych frakcji, czyli brak kontaminacji białkami z innych frakcji. Służą do tego odpowiednie markery białkowe – np. GAPDH dla frakcji cytozolowej, PARP dla frakcji jądrowej, Hsp60 lub białka kompleksów oddechowych dla frakcji mitochondrialnej, lub inne. Tego typu analiza nie została przedstawiona. W przypadku analizy VDR i CYP24A1 autorka pokazała poziom aktywny jako kontrolę poziomu białek, co jest błędnym podejściem. Wiadomo, że aktywna, jako białko cytoszkieletu może być wyizolowana w różnej ilości we wszystkich frakcjach, nie jest jednak dobrą kontrolą pozwalającą na określenie poziomu białek w poszczególnych frakcjach oraz ocenę zanieczyszczenia innymi frakcjami. Potwierdzają to przedstawione wyniki, aktywna obecna była w różnej ilości, we wszystkich badanych frakcjach. Z kolei białko Hsp90, które było kontrolą w doświadczeniach, w których badano poziom C/EBPbeta, także było obecne we wszystkich badanych frakcjach. W żadnym z powyższych doświadczeń nie przedstawiono kontroli kontaminacji poszczególnych frakcji białkowych. Ze względu na powyższe uwagi, uzyskane wyniki są trudne do oceny i interpretacji. Doświadczenia tej części pracy miały na celu wskazanie potencjalnego mechanizmu molekularnego będącego u podstaw różnej podatności komórek AML na różnicowanie, jednak istotne błędy metodyczne nie pozwalają na wysnuenie ostatecznych wniosków.

2. Czy autorka oznaczała procent apoptozy w komórkach pod wpływem poszczególnych związków? Nie do końca przekonuje mnie strategia połączenia, poprzez użycie barwników emitujących fluorescencję mierzoną w kanale FL2 i wspólne bramkowanie, indukcji apoptozy i ekspresji markerów powierzchniowych. Chciałabym prosić o wyjaśnienie takiego podejścia metodycznego. Wydaje mi się, że informacja o wpływie zastosowanych analogów na indukcję apoptozy zamiast różnicowania, może być istotną informacją o dużym znaczeniu dla przyszłych badań.

3. W badaniach dotyczących zweryfikowania hipotezy udziału przyspieszonego katabolizmu w zwiększonej aktywności analogów, zbadano poziom mRNA i białka CYP24A1, podstawowego enzymu zaangażowanego w katabolizm. Następnie badano wpływ inhibitorów CYP24A1 na różnicowanie komórek. Uzyskane wyniki wskazały, że przyspieszony katabolizm nie jest odpowiedzialny za zwiększoną aktywność analogów. Zastanawiam się, czy nie lepszym podejściem byłoby rozpoczęcie badań od oznaczenia poziomu związków i określenia okresu ich półtrwania? Dopiero w przypadku zaobserwowania różnic w degradacji kontynuować już bardziej szczegółowe doświadczenia?

4. Bardzo ważną częścią pracy, na której opierały się inne doświadczenia, była analiza stopnia różnicowania komórek z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Mam pewne uwagi dotyczące tej części pracy. W rozdziale *Materiały i Metody* zabrakło istotnych informacji. Nie podano danych na temat kompensacji, kontroli FMO (Fluorescence minus 1) przy pomiarach wielokolorowych, ewentualnego bramkowania w celu eliminacji dubletów (lub jego braku). Nie podano też informacji, czy przeprowadzono analizę rozcieńczeń przeciwciał, tzw. „antibody titration” w celu dobrania właściwego stężenia przeciwciał wykorzystanych do znakowania, co jest sugerowaną procedurą zwłaszcza w przypadku pomiarów ilościowych. Nie pokazano doświadczeń kontrolnych, czyli histogramów/dot plotów przedstawiających wyniki uzyskane po barwieniu kontrolami izotopowymi w celu wyznaczenia tła fluorescencji. W *Materiałach i Metodach* oraz opisie wyników zawarto informacje, że takie barwienia wykonano. W tabeli 11 na str. 73, przedstawiającej procedurę analizy cytometrycznej, nie przedstawiono wyników dotyczących komórek nie indukowanych do różnicowania, na podstawie których ustalono granice populacji negatywnej i pozytywnej na CD14. Nie podano też, z jakiej subpopulacji wyznaczano parametr Geomean brany potem do analiz statystycznych.

Podobna strategia, wzbogacona dodatkowo o informacje dotyczące odpowiednich kontroli, powinna zostać przedstawiona w części II, gdzie komórki różnych linii komórkowych barwiono pod względem CD14 i CD11b. Nie jest jasne, czy także w tym przypadku stosowano jodek propidyny jako marker komórek martwych.

Na dot plotach z poszczególnych doświadczeń, umieszczonych w Aneksie, też nie pokazano jak ustawiono tzw. krzyż, na podstawie którego wyznaczano granicę populacji pozytywnej i negatywnej względem ekspresji markerów różnicowania. Powinno to być zaznaczone przynajmniej na jednym wykresie.

Wniosek końcowy

Przedstawione powyżej uwagi i komentarze nie wpływają na końcową pozytywną ocenę niniejszej rozprawy. Przedstawiona rozprawa mgr Hanny Baurskiej jest pracą wartościową, poszerzającą znacznie wiedzę na temat podatności komórek AML na różnicowanie pod wpływem 1,25D i jej pochodnych. W pracy postawiono istotny i ambitny cel, którego realizacja doprowadziła do cennych obserwacji. Istotnym efektem było zidentyfikowanie pochodnych silnie indukujących różnicowanie w komórkach AML oraz wskazanie zależności między strukturą a aktywnością. Za szczególnie ważne uważam wskazanie grup pacjentów, których komórki charakteryzowały się niską i wysoką podatnością na indukcję różnicowania. W świetle podejmowanych prób zastosowania indukcji różnicowania jako strategii terapeutycznej, wyniki te mogą mieć duże znaczenie. Wskazują także na konieczność przeprowadzenia wstępnych badań poprzedzających wprowadzenie terapii bazującej na indukcji różnicowania, ze względu na heterogenność tego schorzenia i różną podatność na różnicowanie. Ponadto, wyniki autorki potwierdzone niedawno przez inną grupę wskazały, że poziom ekspresji CD14 może być stosowany jako biomarker odpowiedzi

na witaminę D. Ponadto, pewne przesłanki dotyczące mechanizmu różnej podatności komórek na różnicowanie, stanowią istotny punkt wyjścia do dalszych badań.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim, jak i warunki określone w Ustawie z dnia 18 marca 2011 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych, a dorobek naukowy kandydatki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia i wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Hanny Burskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 17 czerwca 2014



Dr hab. Katarzyna Piwocka, prof. nadzw.