



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

dr hab. n. med. Anna A. Brożyna, prof. UMK
Katedra Biologii Człowieka
Instytut Biologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń
e-mail: anna.brozyna@umk.pl

Toruń, 18.09.2023r.

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Weroniki Berkowskiej zatytułowanej
„Badanie aktywności i mechanizmu działania semiselektywnych agonistów receptora
witaminy D w komórkach pochodzących z różnych tkanek”
wykonanej w Zakładzie Biotechnologii Białek Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu
Wrocławskiego
pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Ewy Marcinkowskiej**

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Przedmiotem recenzji jest dysertacja doktorska Pani **mgr Klaudii Weroniki Berkowskiej**, pt. **„Badanie aktywności i mechanizmu działania semiselektywnych agonistów receptora witaminy D w komórkach pochodzących z różnych tkanek”**. Promotorem rozprawy jest Pani prof. dr hab. Ewy Marcinkowskiej.

Podstawą formalną opracowania recenzji jest pismo z dnia 28 czerwca 2023r. (MNB.402.1.2018.2023.VT) Pana Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne, dr hab. inż. Marcina Kadeja, prof. UW, w sprawie powierzenia mi oceny rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Weroniki Berkowskiej, w oparciu o uchwałę Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Nr 138/2023 podjętej 22 czerwca 2023 roku.

Recenzja ma na celu ustalenie, czy rozprawa spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2021 poz. 478 ze zm.). Ocenę końcową oparto na następujących kryteriach: wybór problemu badawczego i tematu rozprawy, cele i hipotezy badawcze, metodyka badań, układ treści, oraz zawartość formalna i merytoryczna pracy.

2. Formalna ocena pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma konwencjonalny oraz logiczny układ i spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim o charakterze eksperymentalnym. Została napisana klarownym i poprawnym językiem. W większości rozdziałów wydzielono liczne, trafne z merytorycznego punktu widzenia, podrozdziały. Rozprawa liczy 249 stron i

obejmuje: Streszczenie w języku polskim i angielskim (2 strony), Wstęp (77 stron), Cele pracy doktorskiej (1 strona), Wykorzystane materiały i zastosowane metody badawcze (18 stron), Wyniki (78 stron), Dyskusję (16 stron), Wnioski (1 strona), Suplement (25 stron), Bibliografię (301 pozycji). Zamieszczono również wykaz używanych skrótów (3 strony) oraz, w Suplemencie, spis rysunków i tabel, co ułatwia lekturę pracy oraz wzbogaca ją o graficzne przedstawienie dodatkowych wyników. Ponadto, Doktorantka zamieściła informację o wynikach opublikowanych w latach 2017-2023 przez Doktorantkę w anglojęzycznych artykułach (n=10), z czego w jednym jest pierwszym autorem. Ponadto Doktoranta jest także, wraz z Panią Promor oraz naukowcami zagranicznymi, współautorką patentu: Compuestos de interés farmacéutico (Compounds of pharmaceutical interest); Hiszpania, Patent ES2769905A1 (B2). 29 czerwca 2020.

3. Ocena wartości merytorycznej

Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest niezmiernie ważna z punktu widzenia potencjału terapeutycznego analogów witaminy D. Aktywna forma witaminy D, 1,25(OH)₂D₃, poza regulacją homeostazy wapniowo-fosforanowej organizmu, wykazuje różnorodne działanie plejotropowe, w tym proróżnicujące, antyproliferacyjne, radioprotekcyjne i przeciwnowotworowe. Jednak ze względu na działanie toksyczne (w tym hiperkalcemiczne) obserwowane przy wysokich dawkach witaminy D, zastosowanie 1,25(OH)₂D₃ w dawkach farmakologicznych jako terapeutyku jest istotnie ograniczone. Dlatego poszukuje się nowych pochodnych witaminy D, które będą zachowywały właściwości terapeutyczne, również przeciwnowotworowe, przy jednocześnie zmniejszonej aktywności kalcemicznej w porównaniu do 1,25(OH)₂D₃. Dlatego uważam, że badania, których realizacji podjęła się Doktorantka poszerzają wiedzę w zakresie mechanizmów działania, regulacji aktywności szeregu analogów witaminy D. Warty podkreślenia jest także interdyscyplinarny charakter pracy.

Wstęp jest przeglądem literatury związanej z zagadnieniami poruszonymi w pracy. Rozdział ten jest bardzo obszerny, bardzo dobrze napisany od strony merytorycznej, jak i stylistycznej i pokazuje znajomość literatury przedmiotu Doktorantki. Szczegółowo zostały przedstawione zagadnienia związane z syntezą i degradacją 1,25-dihydroksywitaminy D₃, receptorem witaminy D, mechanizmem przekazywania sygnału przez 1,25-dihydroksywitaminę D₃ z udziałem receptora VDR oraz receptorów błonowych. Przedstawiono również biologiczną rolę witaminy D w organizmie. W mojej ocenie ten podrozdział jest zbyt obszerny, zawiera informacje, które można byłoby albo pominąć, albo przedstawić w sposób bardziej syntetyczny. Natomiast zabrakło choćby krótkiej informacji na temat aktywnych biologicznie metabolitów witaminy D, które zostały zidentyfikowane in vivo oraz wykazują także działanie przeciwnowotworowe a także informacji na temat jądrowych receptorów alternatywnych dla witaminy D i jej pochodnych (np.: RORs, retinoic acid receptors). We Wstępie przedstawiono także charakterystykę analogów witaminy D, w tym omówiono strukturę chemiczną związków, które Doktorantka badała.

Pomimo powyższych uwag, uważam, że dane zawarte w tym rozdziale są przedstawione w sposób zrozumiały i stanowią dobrze przygotowane teoretyczne wprowadzenie do podjętej w badaniach naukowych tematyki. Na uwagę także zasługuje zamieszczenie szeregu schematów, które Doktorantka przygotowała samodzielnie.

Jako osobny rozdział wyodrębniono **Cele pracy doktorskiej**, które obejmowały identyfikację etapów szlaków metabolicznych, które w zróżnicowany sposób są aktywowane przez badane analogi, sprawdzenie czy różnice w działaniu i aktywności analogów występują na poziomie wiązania do receptora i na poziomie komórki, określenie zależności pomiędzy działaniem badanych analogów oraz analizę, czy semiselektywne działanie analogów jest związane z ich transportem do wnętrza komórki. Jednak nie przedstawiono założeń pracy ani hipotez badawczych. Nie zmienia to jednak faktu, że podejmowana tematyka badawcza i postawione cele badawcze reprezentują ważne badania biomedyczne, które pozwalają na lepsze zrozumienie mechanizmu działania analogów witaminy D oraz pozwalają na wskazywanie kandydatów do dalszych badań przedklinicznych i klinicznych. Szerokie spektrum działania witaminy D i jej pochodnych wskazuje na potencjalnie szerokie terapeutyczne zastosowanie tych związków.

Rozdział **Materiały** został podzielony na 2 podrozdziały i zawiera opis linii komórkowych użytych do badania efektów działania analogów witaminy D, listę użytych odczynników, przeciwciał, aparatury naukowo-badawczej i oprogramowania. Doktorantka zamieściła także informację o pracach wykonanych w ramach prac zleconych (synteza starterów oraz sekwencjonowanie DNA metodą Sangera). W podrozdziale Metody przedstawiono m. in. opisy hodowli komórkowych, ekspozycji na badanych agonistów receptora witaminy D, test konkurencyjnego receptora VDR i metody analizy działania testowanych związków. Na uwagę zasługuje szeroki wachlarz użytych metod eksperymentalnych, w tym technik opartych na ustalonych liniach komórkowych, technik biologii molekularnej, w tym RT-PCR, sekwencjonowania DNA, czy analizy ekspresji białek metodą WB i cytometrii przepływowej. Pomimo dużej liczby stosowanych metod badawczych, kilku analizowanych linii komórkowych i testowanych związków prezentacja metodologii jest przejrzysta, gdyż Doktorantka zdecydowała o przedstawieniu tych informacji w formie tabel. Wszystkie metody zostały zastosowane prawidłowo. Pomimo dosyć szczegółowych opisów tego rozdziału pojawiło się kilka pytań czy też wątpliwości:

- dlaczego nie wszystkie testy wykonano dla każdej linii komórkowej, np.: określenie lokalizacji receptora opisano dla linii HL-60, określenie aktywacji kinazy MAPK p44/42 dla linii HT-29, a immunocytochemię tylko dla komórek HEK293-FRT i dla megaliny;
- dlaczego badanie efektu nokautu genu kodującego megalinę (LRP2) przeprowadzono tylko w odniesieniu do analogów serii PRI i związku SUNIL-1;
- nie doprecyzowano czy stosowano płodową surowicę bydlęcą oczyszczaną czy nieoczyszczaną węglem aktywnym; filtrowanie surowicy węglem aktywnym powoduje

zmniejszeniem stężenia związków steroidowych, w tym witaminy D3 i jej pochodnych, stwarzając bardziej kontrolowane warunki doświadczeń w eksperymentach in vitro.

W rozdziale **Wyniki**, podzielonym na tematyczne podrozdziały, Doktorantka dokonała omówienia rezultatów wyników przeprowadzonych badań dotyczących oceny siły wiązania analogów do receptora witaminy D na podstawie wartości IC50, zdolności analogów do indukcji różnicowania komórek ostrej białaczki szpikowej, właściwości biologicznych analogów w komórkach ostrej białaczki szpikowej, nowotworów jelita i kości oraz w komórkach nerek, w tym ocenę akumulacji białka receptora VDR w jądrze oraz wpływ na ekspresję wybranych genów zaangażowanych w metabolizm witaminy, a także kinaz ERK1/2 MAPK. Doktorantka przeprowadziła także badania wpływu nokautu genu kodującego megalinę (LRP2) na aktywność biologiczną analogów serii PRI i związku SUNIL-1. Najważniejszymi i najciekawszymi wynikami są wyniki pokazujące:

- stosunkowo wysokie, wyższe niż 1,25(OH)2D3, powinowactwo do VDR analogów serii PRI, posiadającej modyfikację 19-nor oraz umiarkowanie rozbudowany łańcuch boczny, poza 5105,
- wysoką aktywność analogu PRI-5106 indukującą różnicowanie komórek linii białaczkowej
- porównywalne z 1,25(OH)2D3 powinowactwo do VDR pochodnej LCA-SUNIL-1
- wysoki potencjał indukujący różnicowanie związku SUNIL-1 do indukowania
- zróżnicowany efekt analogów serii PRI i SUNIL zarówno w obrębie grupy oraz w badanych modelach komórkowych
- tkankowo-specyficzny efekt działania analogów serii PRI zależny od stężenia (różnice o kilka rzędów wielkości).

Po rozdziale prezentującym uzyskane wyniki Doktorantka zamieściła **Dyskusję**, w której skonfrontowała uzyskane wyniki z danymi literaturowymi z zakresu tematycznego poruszanego w ocenianej pracy, m.in. w kontekście wpływu analogów każdej z serii na ekspresję CYP24, markery różnicowania, TRPV5, TRPV6, kinaz ERK1/2. Doktorantka miała trudne zadanie, z uwagi na próbę scharakteryzowania stosunkowo nowych związków. Jednak Doktorantka poradziła sobie doskonale i wyniki przedyskutowała z opublikowanymi danymi z zakresu mechanizmów działania różnych analogów witaminy D. Doktorantka również graficznie starała się wyjaśnić obserwowane zróżnicowane efekty działania badanych analogów (Rysunek 7.1.).

W pracy zabrakło wniosków płynących z przeprowadzonych badań. Wprawdzie Doktorantka po rozdziale Dyskusja zamieściła rozdział **Wnioski**, ale w obecnej formie jest on skróconym podsumowaniem wyników. Zabrakło także informacji o perspektywie dalszych badań. W rozdziale Dyskusja Doktorantka zamieściła podrozdział „Kierunki przyszłych badań”, jednak zawiera on informacje oparte na analizie danych opublikowanych, a nie na podstawie wniosków płynących z przeprowadzonych prac.

Ryciny i tabele są adekwatne do treści rozdziałów, na ogół dobrej jakości, przejrzyste i zawierają wiele cennych informacji.

Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o niewłaściwym stosowaniu uproszczeń, które czytelnika wprowadzają w błąd. Doktorantka często używa sformułowań wskazujących na analizę zjawisk w komórkach jelita i kości, jednak w badaniach zostały użyte linie nowotworów jelita grubego i kości. Dane dla tych analiz są zestawiane z analizami dla linii HEK-293 wyprowadzonej z ludzkich embrionalnych komórek nerki i poddanych transfekcji plazmidem pFRT/lacZeo. Inne uproszczenia znalazły się także we Wnioskach, gdzie Doktorantka hasłowo podaje pewne informacje, na przykład, „Analogi te, jako grupa, wykazywały największą aktywność biologiczną we wszystkich liniach komórkowych (indukcją ekspresji genów w stężeniu 10 nM)”, nie wskazując genów o zmienionej ekspresji.

4. Ocena końcowa

Przedstawione wyniki pracy doktorskiej Pani Klaudii Weroniki Berkowskiej stanowią istotny wkład w scharakteryzowanie aktywności agonistów receptora witaminy D: analogów 1,25D2 z modyfikacjami łańcucha bocznego i pierścienia A (19-nor), analogów 1,25D3 z modyfikacjami pierścienia A (19-nor), posiadających podstawnik w pozycji C-2, analogów 1,25D3 z modyfikacjami łańcucha bocznego i pierścienia A (19-nor), posiadających podstawnik egzometylenowy w pozycji C-2, analogów 1,25D3 zawierające ugrupowanie dienynowe skoniugowane z aromatycznym pierścieniem D oraz pochodnych kwasu litocholowego w linii komórek HEK-293 uzyskanych z ludzkich embrionalnych komórek nerki i poddanych transfekcji plazmidem pFRT/lacZeo oraz w liniach komórkach nowotworowych: ostrej białaczki promielocytowej HL-60, gruczolakoraka jelita grubego HT-29 oraz kostniakomięsaka U-2-OS. Sposób przeprowadzenia badań, przygotowania pracy oraz jej prezentacja, a także interpretacja uzyskanych wyników dowodzą, że Doktorantka ma nie tylko rozległą wiedzę dotyczącą przedmiotu badań, ale także umiejętność analizy uzyskanych wyników. Szeroki zakres zastosowanych metod badawczych oraz sposób analizy uzyskanych wyników świadczą o dojrzałości naukowej Autorki i dużym stopniu samodzielności w pracy naukowej. Na uwagę zasługuje interdyscyplinarność projektu, w którym konieczne było rozwinięcie współpracy z Badaczami z trzech ośrodków, którzy zsyntetyzowali badane pochodne. Moje uwagi i pytania przedstawione powyżej, jak również drobne usterki redakcyjne, błędy stylistyczne, czy literowe, których nie zamieszczałam w niniejszej recenzji, nie podważają wysokiej wartości pracy. Uważam, że Doktorantka w pełni rozwiązała oryginalny problem badawczy, jaki przed sobą postawiła.

5. Wniosek końcowy

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Klaudii Weroniki Berkowskiej pt. „Badanie aktywności i mechanizmu działania semiselektywnych agonistów

receptora witaminy D w komórkach pochodzących z różnych tkanek” spełnia wszelkie wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 poz. 478 ze zm.). W związku z powyższym przedkładam Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Klaudii Weroniki Berkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, w uznaniu szerokiego zakresu badań, wartościowych i oryginalnych wyników oraz wysoką aktywność publikacyjną rekomenduję wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Kierownik
Katedra Biologii Człowieka
Brożyna
dr hab. Anna Brożyna, prof. UMK
tel. 56 611 45 99