

Wrocław, 2021-01-25

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Nowak pt. „Współdziałanie receptora witaminy D (VDR) z receptorami kwasu retinowego (RAR) w procesie hematopoezy” zrealizowanej w Zakładzie Biotechnologii Białek UWr pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Ewy Marcinkowskiej.

1. Ocena formalna:

Podstawą wykonania niniejszej recenzji jest uchwała nr 69/2020 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu z dnia 22 października 2020 roku. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska składa się z 159 stron maszynopisu w formie wydruku komputerowego w oprawie miękkiej podzielonego na następujące części: spis treści (s.1-5), wykaz stosowanych skrótów (s.6-13), streszczenie w języku polskim i angielskim (s.14-15), wstęp (s.16-54), hipotezy badawcze (s.38), materiały (s.56-64), metody (s. 65-78), wyniki (s.80-105), posumowanie wyników badań (s.127-129), dyskusję (s.108-114), wnioski (s.116), suplement (s. 117-120), spis tabel (s. 126-127), spis rycin (s.128-131), lista publikacji (s. 131), bibliografia (s.132-159). Dodatkowo na drugiej z nienumerowanych stron przed spisem treści zamieszczono informację, że praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego OPUS o nr 2015/17/B/NZ4/02632 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki. Układ rozprawy, proporcje pomiędzy rozdziałami oraz ich kolejność są typowe i nie budzą zastrzeżeń. Praca napisana jest dobrą polszczyzną, Autorka swobodnie posługuje się specjalistycznym słownictwem naukowym. W tekście rozprawy występują tylko nieliczne dostrzeżone przeze mnie literówki (np. s.56/linijka 22, s. 102/linijka 3, s.114/linijka 28). W 27 tabelach zestawiono informacje istotne dla lepszego zrozumienia przedmiotu rozprawy, zastosowanych materiałów i metod oraz wyników doświadczeń. Praca jest starannie edytowana i ilustrowana 44 kolorowymi rycinami. Wyniki badań przedstawiono na 17 z nich. Układ graficzny tych rycin jest spójny pomiędzy eksperymentami co ułatwia ich analizę. Opisy rycin są jasne i zawierają każdorazowo informacje o liczbie powtórzeń biologicznych oraz istotności statystycznej. Bibliografia jest wyjątkowo obszerna, zawiera 367 pozycji literaturowych, w tym aż 9 prac eksperymentalnych opublikowanych w latach 2019-2020. Dobór cytowanej literatury nie budzi zastrzeżeń, świadczy o dobrej orientacji Autorki w aktualnym piśmiennictwie. Pomocne w ocenie merytorycznej pracy są także syntetyczne wnioski zebrane w 5 punktach. Podsumowując, strona formalna ocenianej pracy świadczy o dobrym opanowaniu

przez Autorkę sztuki pisania tekstów naukowych w języku polskim oraz znajomości aktualnej literatury przedmiotu i spełnia wszystkie kryteria zwyczajowo przyjęte dla rozprawy doktorskiej.

2. Ocena merytoryczna:

Przedmiotem rozprawy jest zbadanie zależności pomiędzy ekspresją i aktywnością transkrypcyjną receptorów jądrowych dla retinoidów (RAR) oraz dla witaminy D (VDR) w procesie prawidłowej oraz, co nie wynika bezpośrednio z tytułu rozprawy, zaburzonej hematopoezy. Wydaje się zresztą, że zrozumienie roli RAR i VDR przede wszystkim jako celów terapii białaczek będących emanacją zaburzeń prawidłowej hematopoezy jest siłą napędową prezentowanych w dysertacji badań. Cytowany na stronie 31 przykład skutecznego zastosowania kwasu całkowicie-trans retinowego (atRA) w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej z translokacją chromosomową t(15:17) stanowi precedens obrazujący możliwości terapeutyczne płynące ze stymulacji RAR. Podobne nadzieje wiąże się z potencjałem sekosteroidów, pochodnych witaminy D, do terapeutycznej stymulacji receptorów VDR w komórkach nowotworowych. Badania wiodących laboratoriów zajmujących się rolą witaminy D w hematopoezie, do których zalicza się zespół Pani prof. Marcinkowskiej, wskazują że stymulacja prawidłowych komórek szpiku kostnego oraz niektórych typów komórek białaczkowych za pomocą kalcytriolu (1,25D3) *in vitro* skutkuje zahamowaniem podziałów, indukcją programowanej śmierci i/lub różnicowania komórek prekursorowych w kierunku monocytów. Niestety, ryzyko wywołania zagrażającej życiu hiperkalcemii wynikające z terapeutycznego zastosowania dużych dawek 1,25D3 *in vivo* ogranicza możliwości prostej translacji klinicznej tych obserwacji. Nadzieje budzi jednak możliwość zwiększenia wrażliwości blastów białaczkowych na sekosteroidy poprzez znalezienie mechanizmów wpływających na podwyższenie transkrypcji i translacji genu receptora VDR, którego zwiększona ekspresja bezpośrednio wiąże się z podwyższeniem wrażliwości komórek na efekty witaminy D. Dodatkowo, inną możliwą choć niewystarczająco poznaną drogą modulacji ekspresji receptorów jądrowych mogłoby być wykorzystanie fizycznych oddziaływań pomiędzy receptorami retinoidowymi a receptorami VDR. Wykazano bowiem, że oddziaływania te mogą uwrażliwiać komórki na działanie 1,25D3 i trójiodotyroniny (Kliwer, S. et al. *Nature*. 1992 January 30; 355(6359): 446–449.). Stąd wypływa intrygująca możliwość zwiększenia wrażliwości komórek nowotworowych na efekty cytostatyczne i różnicujące pochodnych witaminy D poprzez pobudzenie ekspresji receptorów retinoidowych, na przykład w efekcie traktowania takich komórek kombinacją atRA i 1,25D3. Wobec powyższych wyzwania, ustalenie mechanizmów genetycznych i epigenetycznych regulujących poziom ekspresji VDR podczas prawidłowej i zaburzonej hematopoezy oraz wzajemnych powiązań ekspresji RAR i VDR jest w mojej ocenie niezbędnym i niezwykle istotnym warunkiem wstępnym na drodze do osiągnięcia postępu w próbach różnicującej terapii białaczek. Dlatego uważam, że wybór tematyki rozprawy jest w pełni uzasadniony i wpisuje się w aktualny nurt badawczy biologii eksperymentalnej i onkologii.

W sześciu podrozdziałach wstępu przedstawiono wyczerpujący przegląd literatury dotyczący historycznych modeli hematopoezy, budowy nisz krwiotwórczych szpiku kostnego i czynników transkrypcyjnych sterujących prawidłową hematopoezą. Sporo miejsca poświęcono, patofizjologii, klasyfikacji, diagnostyce oraz podstawowym, celowanym i różnicującym terapiom białaczek. W kolejnych podrozdziałach zawarto dane dotyczące budowy i metabolizmu witaminy D, a także roli receptora VDR jako głównego pośrednika jej aktywności biologicznej. Na str. 35, w linijce 1, opisując budowę receptora VDR użyto sformułowania „zawiera dziewięć reszt cysteinowych”. Oczywiście Autorce chodziło o reszty „cysteilowe”. Na tej samej stronie w linijce 21, w opisie budowy domeny LBD receptora VDR Autorka posługuje się wyrażeniem „nici β ”, chociaż zapewne chodzi o β harmonijki lub β kartki. Z kolei w opisie ryciny 3.8 dotyczącej organizacji locus genu *VDR*, Autorka pisze o szarych i niebieskich kwadratach, mimo że ewidentnie rysuje prostokąty. Opisując niegenomowe działanie 1,25 D3 na stronie 44, w linijce 4, Autorka pisze „kinaza białkowa A2 (PLA2)”. Moim zdaniem chodzi o fosfolipazę A2 (EC 3.1.1.4, PLA2). Podobny błąd występuje także w opisie stosowanych skrótów na stronie 12. W kolejnych podrozdziałach opisano, w sposób analogiczny do witaminy D, budowę, metabolizm i aktywność biologiczną witaminy A. Na stronach 46 i 47 mylnie użyto skrótu RE dla estrów retinyli, chociaż w wykazie skrótów RE oznacza element odpowiedzi (ang. response element). Na stronie 47, znajduje się ciekawa informacja, że „Ligandami dla receptorów RAR są: atRA oraz 9cRA, natomiast dla receptorów RXR tylko 9cRA”. Warto byłoby rozwinąć tę informację w kontekście współdziałania 1,25D3 i atRA w podwyższeniu bądź zmniejszeniu poziomu transkrypcji genu *VDR* w komórkach białaczek. Czy można znaleźć w literaturze przykłady zastosowania 9cRA wraz z 1,25D3 do prób terapii różnicującej linii komórek białaczek?

Hipotezy badawcze są w mojej ocenie sformułowane jasno. Wyszczególniono dwa obszary tematyczne tłumaczące powody podjęcia większości, lecz nie wszystkich prezentowanych badań. W treści rozdziału 7.2.2 pojawia się trzecia hipoteza, której jednak nie ujęto w głównym spisie. Brzmi ona następująco: „inhibitory metylotransferaz mogą zwiększać ekspresję *VDR*, a w konsekwencji aktywność transkrypcyjną receptorów VDR oraz właściwości proróżnicujące.”

W rozdziale „materiały” oraz „metody” opisano w sposób szczegółowy odczynniki i aparaturę wykorzystywaną w badaniach oraz procedury i metody statystyczne pomocne w interpretacji istotności uzyskanych wyników. Jedyną metodą, której szczegółowego opisu nie znalazłem w tym rozdziale była analiza ilościowa DNA, która posłużyła do uzyskania wyników zamieszczonych w rozdziale 7.3. Autorka wzmiankuje tylko, że do tej analizy wykorzystano „krzywą standardową zaprojektowaną na podstawie stworzonych przez zewnętrzną firmę amplikonów”. Należałoby dostarczyć więcej szczegółów tej analizy. Niemniej jednak na podkreślenie zasługuje bogaty wachlarz technik laboratoryjnych użytych w pracy, począwszy od pozyskiwania jednojądrzastych komórek krwi, poprzez metody separacji i immunofenotypowania prekursorów hematopoezy, hodowli komórek in vitro, określania ich żywotności, izolacji kwasów nukleinowych mRNA i genomowego DNA, uzyskiwania

matryc cDNA, amplifikacji DNA w czasie rzeczywistym, badania metylacji w genomowym DNA techniką pirosekwencjonowania. W podsumowaniu oceny tej części rozprawy chciałbym podkreślić, że zaplanowane eksperymenty oraz przeprowadzone procedury badawcze spełniają kryteria dobrej praktyki laboratoryjnej i mimo niewielkich braków w opisach, pozwalają na wyciąganie istotnych wniosków.

Rozdział „wyniki” został podzielony na trzy logicznie wyróżnione części. W pierwszej z nich, w rozdziale 7.1, ocenie poddano nie tylko wpływ atRA na ekspresję *VDR* w ludzkich komórkach krwi o różnym statusie dojrzałości i zróżnicowania, lecz równolegle zbadano także wpływ 1,25D3, który wbrew tytułowi nie należy do retinoidów. Metodyka zastosowana do stworzenia wykresów 7.1-7.7 nie jest dla mnie zupełnie jasna i wymaga komentarza. Czy biorąc pod uwagę podobny poziom ekspresji genu referencyjnego *GAPDH* we wszystkich trzech badanych populacjach komórek (Ryc. 10.1), pozycja linii przerywanej oznaczającej kontrolę rozpuszczalnika może być taka sama dla każdej grupy komórek, niezależnie od wyjściowych różnic w poziomie ekspresji *VDR*, o którym informuje rycina 7.15? Czy linia przerywana jest po prostu względnym poziomem wyjściowej ekspresji równej 1, niezależnie od bezwzględnego poziomu ekspresji *VDR*? W takim przypadku na osi rzędnych powinno się zaznaczyć, że wartości nie są stosunkiem *VDR* vs *GAPDH*, lecz krotnością indukcji po traktowaniu daną substancją. Podobnie należałoby zmodyfikować opisy osi w wykresach odnoszących się do genów *CYP24A1* i *CYP26A1*. Na rycinach 10.2 i 10.3 przedstawiono analizę czystości populacji komórek macierzystych i progenitorowych izolowanych magnetycznie z krwi pępowinowej. Podobnej analizy nie zaprezentowano dla oczyszczonych populacji progenitorów linii mieloidalnej (CMP) i limfoidalnej (CLP) oraz komórek macierzystych hematopoezy (HSC) analizowanych na rycinach 7.5-7.7. Do najważniejszych wyników tej części badań należą: 1) potwierdzenie ekspresji i indukcji ekspresji wariantów transkrypcyjnych *VDR* przez atRA w prawidłowych komórkach krwi zidentyfikowanych uprzednio w liniach białaczkowych oraz ustalenie, że całościowa indukcja *VDR* przez atRA słabnie wraz z dojrzewaniem komórek krwi 2) ustalenie aktywności transkrypcyjnej *VDR* i *RAR* w populacjach komórek krwi traktowanych 1,25D3 i atRA oraz wykazanie braku efektu synergii po zastosowaniu kombinacji obydwu związków 3) wykazanie ponad 2-krotnego wzrostu ekspresji genu *VDR* po traktowaniu atRA oraz czterokrotne podwyższenie jego aktywności w komórkach HSC i CLP po traktowaniu 1,25D3. Wykazano także około 12-krotne podwyższenie aktywności receptorów *RAR* w odpowiedzi na atRA w komórkach HSC i pięciokrotny jej wzrost w komórkach CLP.

W rozdziale 7.2 przedstawiono wysokorozdzielcze badania statusu metylacji dwóch wysp CpG sąsiadujących z egzonami 1a i 1c promotora genu *VDR* w prawidłowych komórkach krwi o różnej dojrzałości i zróżnicowaniu, a także w komórkach ludzkich linii białaczkowych Jurkat, KG1 i HL60 oraz w komórkach ex vivo od pacjentów cierpiących na ostre białaczki szpikowe (AML). Zbadano także wpływ związków hypometylujących na ekspresję *VDR* i status zróżnicowania komórek HL60. Wyniki jednoznacznie wskazują na brak metylacji wyspy 1a w każdej z badanych prób oraz na zmienne wzorce

metylacji regionu 1c, które nie korelowały bezpośrednio z podtypem AML ani cechami cytogenetycznymi blastów. Bardzo intrygujące są badania związków demetylujących DNA w kombinacji z 1,25D3 i atRA w linii HL60, dzięki którym pomimo braku zmiany wzorców metylacji w regionie 1c, ani podwyższenia ekspresji *VDR*, ale za to wyższej jego aktywności transkrypcyjnej, zaobserwowano znaczące podwyższenie ekspresji cząsteczki CD11b służącej jako marker różnicowania. Ta obserwacja sugeruje możliwość selektywnego zwiększenia aktywności transkrypcyjnej *VDR* w linii HL60 przez traktowanie kombinacją decytabiny i 1,25D3.

W rozdziale 7.3 przedstawiono analizę ilościową DNA. Frustrację recenzenta wywołuje brak korekty edytorskiej tego rozdziału. Sformułowanie na stronie 102 linijka 3 brzmiące: „postanowiono zbadać analizę ilościową genów w wybranych populacjach komórek” jest w mojej opinii bełkotliwe i nic nie mówiące. Mimo, że dalsza część tego rozdziału jest już lepiej edytowana, to jednak tytuł podrozdziału 7.3.1. sugeruje zupełnie inny typ analizy niż ten, który został wykonany. Analizę zmienności liczby kopii genu wykonuje się aby oszacować odchylenia na przykład od diploidalnej liczby alleli analizowanego genu, która mogłaby wystąpić na skutek rearanżacji chromosomowych prowadzących do ubytku bądź zwiększenia liczby kopii allelu na komórkę. Podobną analizę można zastosować do genów wielokopijnych, których wyjściowa liczba alleli na komórkę diploidalną byłaby większa niż 2. Wydaje się, że Autorka pomyliła liczbę kopii genu z całkowitą liczbą transkryptów genu określoną na podstawie porównania wartości Ct w reakcji amplifikacji cDNA genu *VDR* w czasie rzeczywistym do odpowiednio skonstruowanego kalibratora o znanej liczbie kopii? Jeżeli rzeczywiście wykonano taką analizę to uzyskano ciekawe dane na temat bezwzględnego poziomu ekspresji *VDR* w analizowanych grupach komórek, które pokrywają się z relatywną ekspresją *VDR* prezentowaną w poprzednich rozdziałach. Podsumowując, powyższe niedoskonałości techniczne w opisie prezentowanych wyników w żadnej mierze nie wpływają na moją ogólną pozytywną ocenę wartości merytorycznej badań.

W dyskusji Autorka konfrontuje uzyskane wyniki z literaturą przedmiotu. Szczególnie interesująco przedyskutowała różnice międzygatunkowe pomiędzy metabolizmem witaminy D i funkcjonowaniem receptora *VDR* u człowieka i myszy. Bardzo sugestywnie, popierając dwiema rycinami zawierającymi wyniki badań własnych, Autorka przedstawiła mechanizm auto regulacji ekspresji *VDR* u myszy, który nie jest zakonserwowany ewolucyjnie u człowieka. Z powodzeniem ryciny 8.1-8.2 mogłyby zostać przeniesione do sekcji „wyniki”, a w dyskusji można byłoby pozostawić rycinę 8.3, jednak rozumiem, że badania na modelu mysim nie były w głównym nurcie zainteresowań Autorki, stąd umieszczenie tych wyników do dyskusji.

3. Podsumowanie:

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę Doktorantki oraz umiejętność

samodzielnego prowadzenia przez Nią badań naukowych. Wartość naukowa prezentowanych badań jest znacząca biorąc pod uwagę, że zostały one opublikowane w dwóch czasopismach specjalistycznych o zasięgu międzynarodowym, w których Pani mgr Urszula Nowak jest wiodącą współautorką. Wyniki tych badań przyczyniają się do postępu w dyscyplinie naukowej reprezentowanej przez Doktorantkę.

4. Wniosek końcowy:

W mojej ocenie przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Dlatego przedkładam wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani mgr Urszuli Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Arkadiusz Miązek