

PAN - ... Immunologii
Wpl. dnia 08-02-2022
Licz. 44



**UNIwersYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi  
i Transplantacji Szpiku**

ul. Pasteura 4, 50-367 Wrocław

Tel.: 71.784.25.76

---

Wrocław, dnia 4.2.2022

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Janik  
„Regulacja ekspresji genu VDR w czasie hematopoezy u myszy”**

Niniejsza ocena została wykonana w wykonaniu uchwały Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu z dnia 11.3.2021.

Przedmiotem ocenianej pracy są zagadnienia regulacji ekspresji genu receptora witaminy D (VDR) w procesie hematopoezy u myszy. Witamina D3 (cholekalcyferol) jest obecnie przedmiotem dużego zainteresowania medycyny klinicznej z uwagi na często stwierdzane jej niedobory w populacji nie tylko dzieci ale i osób dorosłych, oraz jej wszechstronne działanie metaboliczne, wykraczające poza pierwotnie przypisywaną jej kluczową rolę w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej i jej postulowane działanie przeciwnowotworowe. Działanie to wywiera jej hormonalnie aktywna forma (1 $\alpha$ ,25-hydroksywitamina D3, kalcytriol). VDR, po związaniu z ligandem i receptorem X dla retinoidów (RXR) bierze udział jako czynnik transkrypcyjny w regulacji ekspresji wielu genów, w tym odpowiedzialnych za sprawność układu odpornościowego. Witamina D3 nie znalazła jeszcze zastosowania w leczeniu nowotworów układu krwiotwórczego w rutynowej praktyce klinicznej. Doświadczenia ze współdziałającą z nią aktywną formą witaminy A (ATRA), która przyniosła przełom w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej, uzasadniają jednak kontynuację prowadzonych już badań nad możliwością wprowadzenia witaminy D3 do arsenału leków w hematoonkologii. Dlatego też tematyka badań podjęta przez Doktorantkę

jest niezwykle ważna nie tylko z punktu widzenia nauk podstawowych, ale też jej wyniki mogą mieć też w przyszłości aplikacje kliniczne.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska jest zwartym opracowaniem w tradycyjnej formie, będącym oprawionym wydrukiem komputerowym i liczącym 150 kolejno ponumerowanych stron. Badania będące jej podstawą zostały wykonane w Laboratorium Immunologii Molekularnej i Komórkowej IIITD we Wrocławiu. Jej układ jest typowy dla tego rodzaju opracowań. Po stronie tytułowej i dedykacjach następuje spis publikacji i doniesień zjazdowych gdzie uzyskane wyniki zostały opublikowane, źródło finansowania badań, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, spis treści, rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografia oraz spis rycin i tabel.

Rozdział „Wstęp” zawiera szereg informacji istotnych dla podsumowania aktualnego stanu wiedzy na opracowywany temat. Doktorantka rozpoczyna go od przedstawienia metabolizmu i mechanizmu działania witaminy D oraz budowy i czynności jej receptora. W następnym podrozdziale przedstawia ona ogólne informacje dotyczące mechanizmu ekspresji genów organizmów eukariotycznych i czynników ją regulujących. Kolejny podrozdział zawiera krótką charakterystykę nowotworów hematologicznych ze szczególnym uwzględnieniem ostrej białaczki szpikowej oraz zaburzeń cytogenetyczno-molekularnych istotnych dla określenia grup ryzyka tej choroby. Pragnę tu zwrócić uwagę na nieścisłość w zdaniu I pierwszego i drugiego akapitu na stronie 33: „Najczęściej spotykane nowotwory hematologiczne przyjmują postać ostrej białaczki limfoblastycznej, ostrej białaczki szpikowej, zespołów mielodysplastycznych, chłoniaków nieziarnicznych oraz chłoniaków Hodgkina” oraz „Ostra białaczka szpikowa (...) to najczęściej występująca białaczka u osób dorosłych”. W rzeczywistości, najczęstszą białaczką u osób dorosłych w naszej strefie geograficznej jest przewlekła białaczka limfocytowa, o której Doktorantka nie wspomina. Nieścisłość ta jednak nie ma jednak znaczenia dla merytorycznej wartości rozdziału.

Dalsza część wstępu jest poświęcona przedstawieniu danych doświadczalnych, wskazujących na rolę witaminy D3 w procesie transformacji nowotworowej. Protekcyjne działanie tej witaminy w karcynogenezie przynajmniej niektórych nowotworów, jak również jej działanie antyproliferacyjne, może być uznane za udowodnione. Należy jednak pamiętać, że nasze poglądy na ten temat wywodzą się głównie z badań *in vitro* na komórkach pobranych od pacjentów i na liniach komórkowych, oraz na danych epidemiologicznych dotyczących związku niedoboru witaminy D3 z zapadalnością i śmiertelnością spowodowaną nowotworami. Wypowiadanie się na temat skuteczności klinicznej witaminy D3 podawanej

lecniczo jest jeszcze przedwczesne, choć istnieją dane sugerujące możliwą korzyść z jej stosowania w profilaktyce i leczeniu nowotworów. Dlatego przestrzegalbym Doktorantkę przed takimi sformułowaniami jak na str. 35: „Kalcetriol odpowiada również za hamowanie syntezy estrogenu w tkance tłuszczowej piersi (...). Jego zastosowanie przyczynia się do skuteczności terapii skierowanej przeciw nowotworowi piersi, który rozwinął się u pacjentek będących po menopauzie”. Doktorantka cytuje w tym miejscu publikację Simboli-Campbell i wsp. (poz. 60), wykonaną na linii komórkowej MCF-7 bez jakiegokolwiek odniesienia klinicznego.

W dalszym ciągu Wstępu Doktorantka omawia rolę witaminy A i jej pochodnych w procesie nowotworzeni i współdziałanie jej receptora z VDR. Zagadnienie to jest bardzo ważne jako uzasadnienie planowanych badań Kandydatki nad wpływem ATRA na ekspresję genu *VDR*. Omawiany rozdział kończy zwięzłe omówienie hematopoezy z jej regulacji na poziomie molekularnym.

Cały omawiany rozdział jest napisany w sposób jasny i zrozumiały. Doktorantka dokonała trafnej selekcji najważniejszych informacji związanych z przedstawianymi tematami, dowodząc dobrej orientacji w problematyce, będącej przedmiotem Jej badań, oraz umiejętności korzystania z piśmiennictwa naukowego. Pozwala on czytelnikowi upewnić się co do zasadności podjętych badań, ich nowatorstwa i znaczenia dla rozwoju wiedzy dotyczącej bardzo skomplikowanych procesów regulacji krwiotworzenia w organizmie ssaków.

Cel pracy przedstawiony jest w postaci opisowej jako zbadanie wybranych mechanizmów regulacji ekspresji genu *VDR* w przebiegu hematopoezy myszy. Doktorantka uwzględniła charakterystykę jego promotora (promotorów) i określenia jego(ich) aktywności, zbadanie stanu jego metylacji, określenie profilu wariantów transkrypcyjnych oraz poszukiwanie elementów regulatorowych wiążących VDR w obrębie jego *locus*. Doktorantka poświęciła szczególną uwagę roli kalcetriolu i ATRA w regulacji ekspresji genu *VDR* z uwagi na ich postulowaną rolę antyonkogenną. Zasadność tak określonych celów badawczych nie budzi wątpliwości, a ich realizacja powinna istotnie wzbogacić naszą wiedzę na temat regulacji ekspresji genu kodującego VDR w procesie hematopoezy.

Rozdział Materiały i metody zawiera bardzo szczegółowe omówienie technik laboratoryjnych zastosowanych do realizacji celów pracy. Badania zostały wykonane na myszach szczepu C57BL/6J oraz na liniach wywodzących się z mysich komórek mieloidalnych (32D) i fibroblastów embrionalnych (NIH3T3). Doktorantka wykorzystwała też szczepy bakterii *E. coli* do celów klonowania, powielania i izolacji plazmidów.

Charakterystyka materiału biologicznego powinna być bardziej szczegółowa: pochodzenie klonów bakteryjnych i linii komórkowych oraz zwierząt laboratoryjnych (będące w posiadaniu Instytutu lub laboratorium, otrzymane od badaczy zewnętrznych czy zakupione, jeśli tak to gdzie?). Powinny też podane dane dotyczące hodowli zwierząt oraz ich ilość użyta do doświadczeń. Opis zastosowanych odczynników, starterów, plazmidów i aparatury jest natomiast wystarczająco szczegółowy i nie budzi zastrzeżeń. Również opis metodyki badań jest dokładny, wyczerpujący i jasno przedstawiony w sposób umożliwiający powtórzenie doświadczeń przez inne zainteresowane tym zespoły. Jak wspomniałem, badania zostały wykonane na dwóch liniach komórkowych i uzyskanych *ex vivo* komórkach myszy pochodzących z homogenatów grasicy, śledziony, szpiku kostnego i nerki jako narządu kontrolnego. Komórki grasicy, śledziony i szpiku kostnego były poddawane sortowaniu przy użyciu cytometrii przepływowej i odpowiednich przeciwciał. Z grasicy izolowano tymocyty podwójnie pozytywne CD4+CD8+, ze śledziony limfocyty T CD3+ i B CD19+, a ze szpiku kostnego separowano granulocyty i krwiotwórcze komórki macierzyste i progenitorowe, które następnie sortowano na subpopulacje odpowiadające różnym szczeblom hematopoezy (HSCS, CLP, CMP, GMP i MEP). Metodyka uzyskiwania tych subpopulacji komórkowych i dobór przeciwciał do ich identyfikacji są zgodne z ogólnie przyjętą praktyką w hematologii doświadczalnej i nie budzi wątpliwości. Nie mam też zastrzeżeń do zastosowanych metod biologii molekularnej. Szerszego uzasadnienia, moim zdaniem, wymaga tylko badanie aktywności transkrypcyjnej RAR za pomocą ekspresji jej genu docelowego *CYP26A1*, oraz VDR za pomocą ekspresji *CYP24A1*. Doktorantka powinna wyjaśnić z powołaniem się na odpowiednie piśmiennictwo, dlaczego uważa się, że istnieje wystarczająco ścisła zależność pomiędzy aktywnością transkrypcyjną RAR i VDR i ekspresją odpowiednio *CYP26A1* i *CYP24A1*, czyli że ilości transkryptu tych genów w warunkach omawianego eksperymentu nie są zależne w istotnym stopniu też od innych czynników transkrypcyjnych.

Doktorantka rozpoczyna omawianie wyniki badań (rozdział 4 rozprawy) od identyfikacji promotorów genu *VDR* w komórkach macierzystych i prekursorowych hematopoezy, ustalenia wariantów końca 5' i wyznaczenia punktu startu transkrypcji tego genu. Stwierdziła istnienie kilku punktów startu zlokalizowanych w jednym niewielkim regionie promotorowym obejmującym 45 nukleotydów, wspólnych dla komórek krwiotwórczych, nerek i jelita cienkiego, użycie których prowadzi do jednego wariantu transkrypcyjnego *VDR*. Następnym etapem było określenie za pomocą reakcji RT-PCR ilości tego transkryptu – najniższa ekspresja *VDR* była stwierdzona w dojrzałych limfocytach T i B śledziony, wyższy – w niesortowanej populacji komórek grasicy, śledziony i szpiku, znacznie

wyższy w komórkach macierzystych, a najwyższy – w nerce. Te obserwacje są bardzo interesujące. Wysoka ekspresja genu *VDR* w nerce jest oczywista z uwagi na kluczową rolę tego narządu w regulacji ustrojowej homeostazy wapniowo-fosforanowej. Śladowa ekspresja tego genu w dojrzałych limfocytach CD3+ i CD19+ i jej znacznie wyższa wartość w komórkach prekursorowych hematopoezy jest pośrednim, ale bardzo przekonującym dowodem na to, że receptor witaminy D i jej ligand, czyli kalcytriol, odgrywają istotną rolę w różnicowaniu i dojrzewaniu komórek krwiotwórczych. Analizując mechanizm regulacji tego genu metodą sekwencjonowania DNA po jego konwersji pirosiarczanem sodu Doktorantka stwierdziła, że metylacja wysp CpG w obrębie jego promotora jest niewielka, w związku z czym nie odgrywa roli w regulacji jego aktywności. Co ciekawe, ekspresja *VDR* w badanych narządach nie zwiększała się istotnie pod wpływem ATRA, natomiast kalcytriol znacznie ją zwiększał w niesortowanych komórkach szpiku i jeszcze bardziej w komórkach prekursorowych, nie wpływał natomiast istotnie ani na komórki nerki, ani na dojrzałe granulocyty. Wobec stwierdzenia aktywności transkrypcyjnej RAR we wszystkich badanych komórkach należy wnosić, że RAR nie wpływa na ekspresję genu *VDR*. W tym kontekście nieoczekiwaną obserwacją było wykazanie, że ATRA zwiększa aktywność transkrypcyjną *VDR* w nerce, a jeszcze bardziej w komórkach prekursorowych hematopoezy, pomimo że nie wpływa na ekspresję jego genu. Receptor(y) witaminy A więc najprawdopodobniej współdziała(ją) z *VDR* w innym mechanizmie niż stymulacja jego ekspresji, ale w odniesieniu do hematopoezy to współdziałanie jest ograniczone do jej wczesnych etapów. Nie było ono bowiem stwierdzane ani w niesortowanych komórkach szpiku, gdzie przewagę stanowią komórki zaawansowane w procesie różnicowania/dojrzewania, ani w dojrzałych granulocytach.

Następnym krokiem była ocena ekspresji *VDR* w subpopulacjach komórek szpiku: hematopoetycznych komórkach macierzystych (HSC), komórkach prekursorowych linii limfoidalnej (CLP) i mieloidalnej (CMP) oraz komórkach prekursorowych granulocytów i makrofagów (GMP) i megakariocytów i erytrocytów (MEP). Podobnie jak w poprzednich eksperymentach, ATRA nie wywierała wpływu na ilość transkryptu *VDR* w żadnym z tych układów komórkowych, natomiast ekspresja omawianego genu zwiększała się istotnie pod działaniem witaminy D<sub>3</sub> we wszystkich populacjach z wyjątkiem CLP. Uważam tę obserwację za bardzo interesującą, gdyż świadczy ona o istotnych odrębnościach w regulacji ekspresji *VDR* pomiędzy linią mieloidalną a limfoidalną. Zgodnie z oczekiwaniem, witamina D zwiększała aktywność transkrypcyjną jej receptora we wszystkich badanych populacjach, natomiast wpływ ATRA w tym zakresie został zauważony, podobnie jak w poprzednich

doświadczeniach, w HSC i MEP. Z tego bloku doświadczeń Doktorantka wnioskuje o istnieniu w mysich komórkach hematopoetycznych zjawiska autoregulacji pozytywnej genu *VDR*, wykazanej poprzez stymulację jego ekspresji przez kalcytriol, będący ligandem produktu białkowego tego genu. Również istotną, moim zdaniem, obserwacją, której należałoby poświęcić więcej uwagi, jest nieobecność tej autoregulacji w linii limfoidalnej, gdyż świadczy to o odmiennościach regulacji hematopoezy w zakresie linii mieloidalnej i limfoidalnej, a także ograniczony do komórek HSC i progenitorów megakariocytowo-erytrocytowych wpływ ATRA na aktywność promotorową *VDR*. Ostatnim etapem badań, mającym na celu wyjaśnienie wykazanego zjawiska autoregulacji genu *VDR*, była próba identyfikacji elementów regulatorowych w obrębie jego promotora. Badania zostały wykonane na linii mieloidalnej 32D, w komórkach której Doktorantka również stwierdziła zjawisko autoregulacji ekspresji genu *VDR*. Doktorantka stwierdziła metodą immunoprecypitacji chromatyny, że miejscem wiązania *VDR* do promotora jego genu jest najprawdopodobniej enhancer S1 i sekwencja obejmująca VDRE2 i VDRE3. Doktorantce nie udało się jednak ocenić tych wyników ilościowo, ani uzyskać ich poszerzenia za pomocą testów reporterowych.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka omawia w dojrzały sposób uzyskane przez siebie wyniki. Szczególną uwagę zwróciła na najważniejszy, Jej zdaniem, element nowatorstwa pracy, jakim jest zjawisko autoregulacji receptora witaminy D w mysich komórkach krwiotwórczych. Doktorantka sytuje poczynione obserwacje w kontekście piśmiennictwa dotyczącego tych zagadnień, właściwie dobrane i cytowanego. Dużo uwagi Doktorantka również poświęca omówieniu różnic pomiędzy modelem mysim a hematopoezą u człowieka, które to różnice muszą być brane pod uwagę przy planowaniu dalszych badań i ocenie możliwości zastosowania uzyskanych wyników do oceny fizjologicznego i nowotworowego krwiotworzenia u człowieka. Doktorantka zwraca słusznie uwagę, że komórki mysie mogą nie być optymalnym modelem badawczym dla oceny wpływu witaminy D i jej pochodnych na hematopoezę ludzką. W tej części dyskusji Doktorantka posiłkuje się obserwacjami dokonanymi przez zespół badawczy, w pracach którego uczestniczyła. Bardzo cennym elementem dyskusji jest omówienie możliwych przyczyn niepowodzenia niektórych zaplanowanych badań, w szczególności poszukiwania elementów regulatorowych w obrębie promotora *VDR* odpowiedzialnych za autoregulację tego genu przy pomocy testów wektorowych. Ogólnie, omawiany rozdział dowodzi dojrzałości Doktorantki jako badacza, Jej umiejętności korzystania z piśmiennictwa naukowego oraz interpretacji uzyskanych przez siebie wyników z uwzględnieniem ograniczeń warsztatu badawczego. Czuję się w obowiązku

zwrócić jednak uwagę na zasygnalizowaną już przeze mnie tendencję Doktorantki do zbyt daleko idących stwierdzeń co skuteczności terapeutycznej witaminy D i jej analogów, np. „dlatego stosowanie analogów witaminy D stanowi atrakcyjną alternatywę dla leków cytostatyczny w kontekście leczenia ostrej białaczki szpikowej” (str. 120-121) lub „W literaturze przedmiotu można odnaleźć wyniki prac odnoszących się do jednoczesnego zastosowania środków hipometylujących w połączeniu z analogami witaminy D w kontekście terapii ostrej białaczki szpikowej. Wykazano, iż użycie takiej kombinacji farmaceutyków wykazuje addytywne i synergistyczne działanie w kierunku różnicowania oraz zatrzymania wzrostu białaczkowych komórek macierzystych”. Badania, do których odwołuje się umieszczony po tym zdaniu odnośnik 122 zostały wykonanych na myszach. Ponadto, czy chodzi tu o działanie addytywne czy synergistyczne? Addycja i synergizm są to bowiem dwa różne typy interakcji leków. Ponadto, termin „wzrost” nie jest właściwy w odniesieniu do komórki, należało użyć sformułowania „zatrzymanie proliferacji białaczkowych komórek macierzystych”. Powtórzę, co już napisałem wyżej, że większość informacji które posiadamy na temat potencjalnie przeciwnowotworowego działania analogów witaminy D pochodzi z badań *in vitro* lub na modelach zwierzęcych, a od skuteczności na liniach komórkowych do skuteczności u pacjentów droga jest jeszcze bardzo daleka i nieraz okazuje się ślepa. Były co prawda podejmowane badania kliniczne wczesnych faz nad skutecznością analogów witaminy D w chorobach onkohematologicznych, ale ich wyniki nie pozwoliły na wdrożenie ich do rutynowej praktyki klinicznej, m.in. z uwagi na ich toksyczność (hiperkalcemia). Jak zasygnalizowałem wyżej, oczekiwałbym ponadto nieco szerszego omówienia ujawnionej odrębności w regulacji ekspresji *VDR* w szeregu mielo- i limfoidalnym (nieobecność autoregulacji w szeregu limfoidalnym), gdyż ta obserwacja wnosi potencjalny wkład do zrozumienia istotnych odrębności istniejących pomiędzy różnicowaniem/dojrzywaniem komórek układu krwiotwórczego i limfoidalnego.

Rozdział „Podsumowanie i wnioski” zawiera wykaz ośmiu najważniejszych obserwacji dokonanych przez Autorkę oraz zdanie stwierdzające odrębność regulacji ekspresji *VDR* u myszy i u człowieka. Te informacje znajdują pełne pokrycie w wynikach przeprowadzonych badań. Lepiej jednak byłoby przedstawić je w sposób bardziej zhierarchizowany, z wyraźnym podkreśleniem tych obserwacji, które są najbardziej nowatorskie w piśmiennictwie, np. autoregulacja genu *VDR* w komórkach progenitorowych hematopozy i w szeregu mieloidalnym.

Po dyskusji następuje spis stu czterdziestu sześciu pozycji piśmiennictwa lub adresów stron internetowych ułożonych według kolejności cytowania, właściwie dobranych i

cytowanych. Zwracam jednak uwagę na niekonsekwencję w sposobie ich cytowania: w większości pozycji Doktorantka podaje wszystkich autorów, a w niektórych, np. poz. 52, 121, 122, 123 – tylko pierwszego autora, co jest prawdopodobnie wynikiem niedopatrzania. Pracę kończy wykaz rycin i tabel.

W podsumowaniu stwierdzam, że moja ogólna ocena rozprawy jest bardzo wysoka. Autorka podjęła i zrealizowała temat o dużym znaczeniu poznawczym. Uzyskane wyniki mają charakter nowatorski i nadają kierunek dalszym badaniom nad rolę genu *VDR* i jego produktu w hematopoezie prawidłowej i nowotworowej u człowieka. Doktorantka wykazała dogłębną znajomość tematyki dotyczącej podjętych badań, umiejętność korzystania z piśmiennictwa naukowego, doboru i opanowania właściwego warsztatu badawczego, zaplanowania i realizacji badań oraz właściwej interpretacji ich wyników. O nowatorstwie badań i wiodącej roli Doktorantki w ich realizacji świadczy też to, że ich wyniki były publikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, przy czym w jednym artykule Doktorantka była pierwszym, w drugim zaś drugim autorem. **Ocenianą rozprawę uważam za wyróżniającą się.**

**Uważam więc, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Sylwii Janik „Regulacja ekspresji genu *VDR* w czasie hematopoezy u myszy” spełnia ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora i wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Sylwii Janik do dalszych etapów przewodu doktorskiego**



Prof. dr hab. s. med. DARIUSZ WOŁOWIEC  
specjalista chorób wewnętrznych,  
hematologii i klinicznej immunologii klinicznej  
140 227