

dr hab. Aneta Rogalska, prof. UŁ
Katedra Biofizyki Medycznej,
Instytut Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź

Łódź, 14 lipca 2023 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Chałaśkiewicz
pt.: „*Regulacja ekspresji genu SLC2A5 i białka GLUT5 przez
wybrane biologicznie aktywne związki pochodzenia
naturalnego.*”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywieniu Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Marii Koziółkiewicz oraz dra. hab. Marcina Ratajewskiego, Prof. Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk. Pani Katarzyna Chałaśkiewicz uzyskała tytuł magistra 5 września 2019 roku na kierunku Biotechnologia w specjalności biotechnologia molekularna i biochemia techniczna na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywieniu Politechniki Łódzkiej. Nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie Technologia Żywności i Żywnienia.

Praca doktorska jest usytuowana w obszarze badań dotyczącym poszukiwania nowych związków polifenolowych, które byłyby inhibitorami ekspresji genu/białka SLC2A5/GLUT5 i dzięki temu byłyby pomocne w profilaktyce zaburzeń metabolicznych oraz obniżeniu zapadalności na choroby nowotworowe wywołane przekroczeniami dziennego spożycia fruktozy. Badania prowadzone przez mgr inż. Chałaśkiewicz dotyczą poznania mechanizmu działania wybranych fitozwiązków takich jak apigenina, chryzyna, kwas

ursolowy czy kwercetyna obecnych w ekstrakcie z rumianku pospolitego oraz ich wpływu na ekspresję genu *SLC2A5*. Ponadto w przedstawionej mi do oceny rozprawie podjęto próbę identyfikacji czynników transkrypcyjnych wpływających na ekspresję genu *SLC2A5*. Badania prowadzono z wykorzystaniem surowego i fermentowanego ekstraktu z rumianku pospolitego, a także wykorzystano siedem linii komórkowych.

Temat pracy doktorskiej jest jak najbardziej aktualny i niezwykle ciekawy. Wysokie spożycie fruktozy może przyczyniać się do wystąpienia zaburzeń metabolicznych, takich jak insulinooporność, upośledzenie tolerancji glukozy oraz hiperlipidemia. Część badań sugeruje również, że fruktoza może sprzyjać występowaniu nadciśnienia tętniczego. Nadmiar fruktozy przyczynia się również do niealkoholowego stłuszczenia wątroby, a od tego stanu dzieli nas niewielki krok do rozwoju marskości wątroby i raka. Zatem identyfikacja mechanizmów odpowiedzialnych za transport i metabolizm fruktozy w organizmie człowieka jest kluczowa zarówno z naukowego punktu widzenia, jak i społecznego. Pani mgr inż. Chałaśkiewicz skupiła się na białku odpowiedzialnym za dokomórkowy transport fruktozy jakim jest transporter GLUT5, kodowany przez gen *SLC2A5*. Podjęła się Ona badań dotyczących regulacji transkrypcji. We współczesnej nauce wciąż nierozwiązana pozostaje kwestia występowania miejsc wiązania dla czynników transkrypcyjnych, które to miejsca są bardzo trudne do powiązania z transkrypcją jakiegokolwiek genu. Ponadto duże wyzwanie stanowi powiązanie lokalizacji miejsc startu transkrypcji z takimi zjawiskami jak: metylacja histonów, pozycja nukleosomów, stan acetylacji, czy też dostępność miejsc wiążących czynniki transkrypcyjne. Aby zrozumieć interakcje pomiędzy elementami regulatorowymi w promotorach i wiążącymi się z nimi białkami regulatorowymi oraz to, jak współdziałają one w regulacji transkrypcji, potrzebne są badania na bardzo szeroką skalę. W tym wymagany jest szeroki wachlarz metod badawczych. Praca Pani Katarzyny Chałaśkiewicz jak najbardziej wpisuje się w ten nurt uzyskania całościowego obrazu procesów transportu fruktozy zachodzących w komórce. Pani Chałaśkiewicz podjęła wyzwanie dotyczące analizy związków

pochodzenia naturalnego w połączeniu z danymi o poziomie transkrypcji mRNA oraz ekspresji białek co pozwoliło na określenie funkcji genu w badanych liniach komórkowych.

Rozprawa ma typowy układ, zgodny z wymogami stawianymi pracom doktorskim. Napisana jest w formie liczącego 129 stron manuskryptu i składa się z rozdziałów, takich jak: *wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, podsumowanie, wykaz skrótów i symboli, spis ilustracji i tabel, piśmiennictwo*. Rozprawa zawiera 5 schematów i 2 tabele. Całość uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca napisana jest rzeczowo, poprawnym językiem, więc czyta się ją bardzo dobrze.

Wstęp doskonale wprowadza w temat dysertacji. Doktorantka omawia sposoby regulacji transportera fruktozy SLC2A5/GLUT5 tj. poprzez białka regulatorowe, aktywność białek stabilizujących transkrypt, modyfikacje potranslacyjne białka transportera oraz omawia zmiany na poziomie epigenetycznym. Dużą część wstępu Doktorantka poświęciła szczegółowemu omówieniu czynników transkrypcyjnych zaangażowanym w regulację ekspresji genu *SLC2A5* w tym receptory jądrowe jak receptor glukokortykoidów, wątrobowy receptor X, a także białka o aktywności czynników transkrypcyjnych w tym ChREBP, TXNIP, białko S100P czy czynnik transkrypcyjny ATF4. We wstępie zastosowano schematy ilustrujące wpływ TXNIP na zwiększenie transkrypcji oraz stabilności transportu białka do błony komórkowej, a także schemat dotyczący wpływu cAMP na transkrypcję i stabilność *SLC2A5*. Należy podkreślić, że w tej części pracy zwrócono również uwagę na modyfikacje potranslacyjne białek uczestniczących w translokacji GLUT5 do błony apikalnej. We wstępie omówiono również regulację stabilności mRNA dla *SLC2A5* oraz epigenetyczne mechanizmy regulacji ekspresji genu *SLC2A5* w tym acetylację, metylację oraz zależną od mikroRNA (głównie miR-125b i miR-92a-1) regulację biosyntezy białka. We wstępie również poruszona została kwestia poszukiwania inhibitorów transportera GLUT5 jak inhibitor z jeżyny bezkolcowej, glukozyd astragaliny, galusan epikatechiny, kurkumina, Mt-10-cynamonian, cyjanidyno-3-O-arabinozyd, MNSBA i inne, a szczególną uwagę skupiła Doktorantka na chryzynie, kwasie ursolowym, apigeninie i kwercetynie. Co ważne, Doktorantka ma świadomość podobieństwa strukturalnego pomiędzy członkami rodziny białek GLUT i

związanych z tym trudnościami badawczymi. We wstępie zwrócono również uwagę na konsekwencje zaburzonego transportu fruktozy i spożywania jej w nadmiernej ilości, takie jak niealkoholowe stłuszczenie wątroby, stymulowanie adipocytów, produkcja substratu do *de novo* syntezy glukozy, zapalenie jelita grubego i choroba Crohna, dysfunkcja naczyń krwionośnych i limfatycznych czy zaburzenia flory jelitowej. Doktorantka sugeruje również, na podstawie literatury, że zwiększony poziom fruktozy może stać się przyczyną m.in. nowotworu szyi, nerek, płuc, wątroby, endometrium czy trzustki. Wysokie spożycie cukru może przełożyć się na wysoki poziom hemoglobiny glikowanej i insuliny, a tym samym na zwiększone zagrożenie nowotworami. W podsumowaniu wstępu Pani Chałaśkiewicz wskazuje również na metodę edycji genów CRISPR/cas9 jako narzędzie do wyciszenia genu *SLC2A5*. Przetawia również schemat z dotychczas zidentyfikowanymi czynnikami transkrypcyjnymi oraz białkami zaangażowanymi w regulację ekspresji genu *SLC2A5*, co pozwoliło Jej umotywić cele pracy i uzasadnić wybór badanych parametrów. Podsumowując wstęp pracy jest spójny i świadczy o wysokiej wiedzy Doktorantki w tematyce badanych zagadnień.

Doktorantka za **cel pracy** postawiła sobie analizę związków polifenolowych hamujących ekspresję genu lub białka *SLC2A5/GLUT5* i ambitnie wyodrębniła cele szczegółowe pracy.

W rozdziale **materiały** zostały wymienione zastosowane linie komórkowe, plazmidy, media hodowlane, szczepy bakteryjne, enzymy restrykcyjne, użyte odczynniki i zastosowana aparatura. W rozdziale **metody** Doktorantka wymienia zastosowane linie komórkowe. Siedem ludzkich linii nowotworowych zostało wybranych do badań na podstawie analizy RT-PCR przeprowadzonej dla 13 linii komórkowych. Doliczyłam się 14 linii. Szkoda, że te wstępne wyniki nie zostały zamieszczone w pracy. Do swoich badań Doktorantka wykorzystwała kilka dobrze dobranych nowoczesnych metod biologii molekularnej do oznaczenia badanych parametrów, w tym test CellTiter-Glo do oceny żywotności komórek, ilościowy RT-PCR. Przeprowadziła klonowanie promotora *SLC2A5*, zastosowała analizę *in silico* regionu flankującego 5' genu, oznaczyła aktywności promotorową. Wykorzystała metodę Western blot do oznaczenia ekspresji białek takich jak GLUT5, SNAI1, SLUG, histon

H3 czy histon H4. Zmiany apoptotyczne oszacowano w pracy wykonując oznaczenia luminescencyjne kaspaz wykonawczych 3/7. Wykonano ponadto test zmiany ruchliwości elektroforetycznej (EMSA) i immunoprecypitacje chromatyny. Przygotowano także ekstrakt z rumianku i poddano go fermentacji.

Rozdział **wyniki** jest przygotowany przejrzysto, z dobrze dobranymi wykresami i tabelami ilustrującymi otrzymane wyniki. Wyniki nie pozostawiają wątpliwości, które z określonych różnic są istotne statystycznie. Doktorantka potwierdziła wysoki poziom ekspresji mRNA *SLC2A5* jak i białka GLUT5 w linii raka jelita grubego Caco-2. W celu zidentyfikowania czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za regulację ekspresji genu *SLC2A5* sklonowała sekwencję 5'-flankującą genu. Przeprowadziła także analizę *in silico* oraz określiła aktywność wybranej sekwencji w teście genów reporterowych, co pozwoliło na poznanie lokalizacji promotora i sekwencji wzmacniającej. Doktorantka założyła, że czynniki USF-1 i USF-2 indukują aktywność genu reporterowego zawierającego promotor genu *SLC2A5*. W badaniach tych wykorzystała metody bioinformatyczne z jednej strony, a z drugiej przeprowadziła czasochłonne eksperymenty z użyciem wektorów ekspresyjnych. Kolejnym krokiem badań Pani mgr inż. Chłaskiewicz była lokalizacja miejsca odpowiedzi czynników USF. Analiza delecyjna pozwoliła Jej na zidentyfikowanie sekwencji E-BOX. Doktorantka wyciszyła ekspresję badanych czynników poprzez siRNA i wykluczyła niestety ich wpływ na ekspresję genu *SLC2A5*. Analogiczne badania przeprowadziła dla czynników SNAI1 i SNAI2 rozpoznających odkrytą sekwencję E-BOX. Nadekspresja SNAI1 i SNAI2 powodowała zahamowanie aktywności promotora genu *SLC2A5* oraz białka GLUT5. Doktorantka potwierdziła testem EMSA wiązanie się czynników SNAI1 i SNAI2 do sekwencji regulatorowej promotora genu *SLC2A5*.

W drugiej części badań Doktorantka pracowała z trichostatyną A, będącą inhibitorem deacetylaz histonów, która na podstawie literatury jest inhibitorem ekspresji genu *SLC2A5*, co także w niniejszej rozprawie potwierdziła eksperymentalnie testem genów reporterowych. Analiza ekspresji genów metodą RT-PCR jak i ekspresji białka metodą Western blot w czasie rzeczywistym pozwoliła Doktorantce stwierdzić, że trichostatyna A

indukuje ekspresję mRNA dla genów SNAI1 i SNAI2 oraz hamuje ekspresję genu *SLC2A5*. Testem EMSA zostało potwierdzone wiązanie się białek SNAI1 i SNAI2 do fragmentu zawierającego element regulatorowy E-BOX, a za pomocą metody opartej na immunoprecypitacji chromatyny potwierdzono wiązania się czynnika SNAI1 do promotora. Cennym aspektem powierzonej mi do recenzji pracy jest uwrażliwienie przez trichostatynę A komórek nowotworowych o wysokiej ekspresji genu *SLC2A5* na cisplatynę i oksaliplatynę. Wydaje się, że kontynuacja tych badań może mieć w przyszłości charakter aplikacyjny.

Trzecim etapem pracy było wytypowanie związków pochodzenia roślinnego hamujących ekspresję genu *SLC2A5*. Przetestowano zatem apigeninę, kwercetynę, kwas ursolowy oraz chryzynę. Apigenina spośród badanych związków hamowała ekspresję SNAI1 na poziomie mRNA i białka, a tym samym okazała się być skutecznym inhibitorem *SLC2A5*. Ze względu na wysoką zawartość apigeniny w rumianku, Doktorantka wykonała ekstrakt z kwiatów rumianku pospolitego *Matricaria chamomilla L.*, który także poddano procesowi fermentacji mlekowej. Co ciekawe proces fermentacji nasilił właściwości hamujące preparatu względem genu *SLC2A5*, a także indukował silną ekspresję SNAI1. W niniejszej pracy przeprowadzono analizę UPLC i na tej podstawie stwierdzono, że inne związki niż apigenina odpowiadają za indukcję czynnika SNAI1 i za hamowanie ekspresji *SLC2A5*, bowiem nie znaleziono w tym preparacie aktywnej apigeniny. Wnioski jakie Doktorantka wyciągnęła świadczą o jej dojrzałości jako badacza.

W kolejnym rozdziale pojawia się bardzo dobrze przeprowadzona i przemyślana **dyskusja**. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka do swoich badań podchodzi krytycznie, zwraca uwagę na pewne słabe strony podjętych badań, co świadczy o dojrzałym podejściu do wnioskowania. Ostatecznie Doktorantka w rozdziale **podsumowanie** przedstawia dobrze skonstruowane wnioski ze swoich badań. Znakomicie podkreślają one wagę badań podjętych przez Doktorantkę i wskazują na możliwość wykorzystania poczynionych obserwacji dotyczących zarówno cytotoksyczności, jak i mechanizmu działania badanych ekstraktów w terapii raka jelita grubego w celu przeciwdziałania skutkom nadmiernego spożycia fruktozy. Doktorantka logicznie wiąże swoje obserwacje z

piśmiennictwem. Autorka wykazała się w pracy bardzo dobrą znajomością poruszanej tematyki. Powołuje się Ona na 147 pozycji literaturowych, ułożonych w kolejności pojawiania się w tekście. W większości są to oryginalne prace anglojęzyczne, opublikowane w czasopismach o wysokim IF. Podsumowanie wyników przeprowadzonych przez Doktorantkę badań jest prawidłowe i nie budzące zastrzeżeń.

Podczas lektury pracy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania i uwagi.

1. Pani mgr inż. Chałaśkiewicz w rozdziale 2.5 dwukrotnie powołuje się na sekwencjonowanie, raz dotyczy to fragmentu obejmującego region 5'UTR (-214/+58), drugi raz mutacji sekwencji E-BOX promotora genu *SLC2A5*. Jaką metodą było przeprowadzone sekwencjonowanie?
2. W rozdziale 2.6: Analiza ekspresji białka - nie podano stężeń badanych związków i czasu ich działania w komórkach.
3. Nie znalazłam w pracy wyjaśnienia skrótu UPLC, opisu metody i wyników, a na nie powołuje się Doktorantka.
4. Doktoranta wskazała, że apigenina ma szerokie spektrum działania, w tym hamuje aktywność deacetylazy histonowej, szlak Wnt/ β katenina, czy metylotransferazy histonowej. Jakie inne mechanizmy znane Pani z literatury mogą być przyczyną aktywności cytotoksycznej apigeniny?
5. Doktorantka podkreśliła, że analiza UPLC wykazała brak apigeniny w ekstrakcie po fermentacji, co sugeruje, że związki inne niż apigenina obecne w preparacie są odpowiedzialne za indukcję czynnika SNAI1 i za hamowanie ekspresji *SLC2A5*. Czy Doktorantka może zasugerować jakie inne związki lub metabolity mogłyby za to odpowiadać?

Autorka nie ustrzegła się pewnych błędów, które jednak nie wpływają na moją bardzo dobrą ocenę merytoryczną pracy. Z obowiązku recenzenta chciałabym również zwrócić uwagę na kilka zauważonych nieścisłości, co być może w przyszłości pozwoli Doktorantce ich uniknąć. Doktorantka nie zawsze wyjaśniała skróty przy pierwszym użyciu w tekście (m.in. PEPC1 i

G6Paz, str. 32; SOB, str. 55). Pojawiło się w pracy też kilkanaście literówek. Wykaz skrótów mógłby być alfabetycznie uporządkowany, co ułatwiłoby korzystanie z niego.

Wniosek końcowy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Chłaśkiewicz pt.: „Regulacja ekspresji genu *SLC2A5* i białka *GLUT5* przez wybrane biologicznie aktywne związki pochodzenia naturalnego” ma dużą wartość poznawczą i niewątpliwie wzbogaca naszą wiedzę na temat hamującego wpływu ekstraktów z roślin na pobieranie fruktozy przez komórki nowotworowe jak i na temat regulacji ekspresji głównego transportera fruktozy GLUT5. Praca zawiera elementy nowości naukowej, a także dowodzi umiejętności Doktorantki w zakresie planowania i przeprowadzenia badań naukowych oraz interpretacji uzyskanych wyników. Doktorantka wykazała się także bardzo dobrą znajomością literatury przedmiotu. Praca ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie.

Stwierdzam, że praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 187.1, punkt 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. **Z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Dyscypliny Technologii Żywności i Żywnienia Politechniki Łódzkiej z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Chłaśkiewicz do dalszych etapów postępowania doktorskiego i jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

Uzasadnienie:

Niniejsza rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom naukowy, posiada elementy nowości naukowej oraz potencjał do kontynuacji podjętej tematyki badawczej. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej zostały już opublikowane w *International European Journal of Pharmacology*, czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania (IF = 5,195), znajdującym się na liście JCR oraz na liście czasopism punktowanych MEiN (liczba punktów - 100 pkt). W opublikowanej pracy Doktorantka jest pierwszym autorem. Doktorantka znacząco przyczyniła się do poszerzenia wiedzy na temat nowych, skutecznych związków pochodzenia roślinnego, które mogą być wykorzystywane w terapii

przeciwnowotworowej jak i leczeniu cukrzycy, nadciśnienia czy zaburzeń lipidowych wywołanych nadmiernym spożyciem fruktozy. Doktorantka również włożyła realny wkład w poznanie funkcjonowania elementów regulatorowych genu *SLC2A5*. Ponadto, Doktorantka - biorąc pod uwagę jej stosunkowo krótką karierę naukową - posiada bardzo dobry dorobek publikacyjny – jest współautorką sumarycznie czterech prac, opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu światowym, oraz współautorką licznych doniesień zjazdowych

załączam wyrazy szacunku

Aneta Rogalska

dr hab. Aneta Rogalska, prof. UŁ