

**Prof dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek**  
**Politechnika Gdańska**  
**Katedra Chemii, Technologii**  
**i Biotechnologii Żywności**

ul. Narutowicza 11/12  
80-233 Gdańsk  
tel: 58 347 17 23  
fax: 58 347 22 48  
e-mail: agnieszka.bartoszek@pg.edu.pl



Gdańsk, 6 sierpnia 2023

Ocena rozprawy doktorskiej

**mgr inż. Katarzyny Chałaśkiewicz**

pt. **“Regulacja ekspresji genu SLC2A5 i białka GLUT5 przez wybrane biologicznie aktywne związki pochodzenia naturalnego”**

Otyłość i powiązane z nią choroby metaboliczne oraz, jak wskazują statystyki epidemiologiczne, choroby nowotworowe stały się największym wyzwaniem zdrowotnym XXI wieku. Chociaż wszystkie te zagrożenia mogłyby być znacząco wyeliminowane poprzez zmianę nawyków żywieniowych to trudności z ich wprowadzeniem zarówno na indywidualną, jak i populacyjną skalę powodują, że naukowcy stoją przed zadaniem znalezienia skutecznych terapii tych tzw. chorób cywilizacyjnych. Dodatkowym czynnikiem utrudniającym zmiany w sposobie odżywiania są producenci żywności, których celem jest zapewnienie konsumentom taniej, uzależniającej a przez to spożywanej w nadmiarze żywności, przynoszącej wysokie zyski. Za jeden ze składników żywieniowych mających właśnie takie uzależniające działanie uważana jest fruktoza. Monosacharyd, który wprawdzie może stanowić źródło energii dla organizmu, ale którego metabolizm w organizmie człowieka biegnie nieco innymi szlakami niż metabolizm glukozy i co gorsza nie indukując sygnałów sytości, które mogłyby ograniczać spożycie nadmiernych “kalorii”. Stąd też poszukiwane są farmakologiczne podejścia do ograniczenia przyswajania fruktozy. Opracowanie nowych terapii wymaga jednak – jak to mgr inż. Katarzyna Chałaśkiewicz ujęła we wstępie do swojej rozprawy doktorskiej – identyfikacji mechanizmów odpowiedzialnych za transport i metabolizm fruktozy w organizmie człowieka, a wiedza ta jest jeszcze daleka od pełnego zrozumienia. Tym problemom i poszukiwaniu naturalnych substancji ograniczających

przyswajanie fruktozy Doktorantka poświęciła swoje badania w ramach projektu doktorskiego.

Praca doktorska została zrealizowana na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej pod opieką dwojga promotorów Prof. dr hab. Marii Koziółkiewicz oraz Dr hab. Marcina Ratajewskiego, profesora nadzwyczajnego IBM PAN. Pani mgr inż. Katarzyna Chałaśkiewicz jest także absolwentką tego Wydziału, a tytuł magistra uzyskała na kierunku Biotechnologia w specjalności Biotechnologia Molekularna w 2019 roku. Zostałam również poinformowana, że mgr inż. Katarzyna Chałaśkiewicz nie ubiegała się uprzednio o stopień doktora. Celem podjętych badań w ramach projektu doktorskiego było poszukiwanie i identyfikacja związków polifenolowych pochodzenia roślinnego, które wykazują zdolność hamowania ekspresji genu kodującego transporter fruktozy *SLC2A5* oraz biosyntezę jego produktu, tj. białka GLUT5. Jako roślinny materiał badawczy wykorzystano ekstrakt z rumianku, który we wcześniejszych badaniach wykazywał obiecujące właściwości w obniżaniu transportu fruktozy *in vitro* do komórek w modelu ludzkiego układu pokarmowego.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera 130 stron. Na dysertację składają się następujące rozdziały: Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wstęp (poruszający trzy wątki tematyczne), Cel pracy, część eksperymentalna obejmująca Materiały i Metody oraz Wyniki badań i ich omówienie, Dyskusja i Podsumowanie, na końcu umieszczono Wykaz używanych skrótów, Listy tabel i rysunków oraz Bibliografię obejmującą 147 pozycji.

Część teoretyczna rozprawy zawiera przegląd literatury dotyczącej działania genu *SLC2A5* kodującego białko GLUT5, które jest wysoce specyficznym dokomórkowym transporterem fruktozy. Ten rozdział porusza trzy główne wątki ściśle powiązane z tematyką pracy. Pierwszy, najbardziej rozbudowany, to opis molekularnej kontroli ekspresji wspomnianego genu. Omówienie mechanizmów kontrolujących aktywność genu *SLC2A5* oraz ekspresję białka GLUT5 wskazuje na ich złożony charakter, bowiem zgodnie z przedstawionym przeglądem literaturowym zachodzi na czterech poziomach: poziomie receptorów jądrowych, czynników transkrypcyjnych, stabilności mRNA i poprzez mechanizmy epigenetyczne w tym regulację z udziałem miRNA. Na stronie 15, Doktorantka wspomina o wpływie pioglitazonu na ekspresję mRNA i białka GLUT5 u pacjentów z cukrzycą typu 2. sugerując udział mitochondrialnych enzymów oksydacyjnych. Na czym rola tych enzymów polegała w tym przypadku? Przedmiotem drugiego wątku poruszanego we Wstępie są naturalne i syntetyczne inhibitory transportera GLUT5. Tu na stronach 27/28 wskazane zostały trudności w znalezieniu selektywnych inhibitorów transportu fruktozy ze względu na podobieństwo białka GLUT5 do transportera glukozy GLUT1. W tym miejscu Doktorantka sugeruje, że naturalne związki fitochemiczne są bezpieczniejszą alternatywą w stosunku do związków syntetycznych. Skąd to przekonanie o mniejszym zagrożeniu

niepożądanymi efektami ubocznymi w przypadku substancji naturalnych zastosowanych jako inhibitory aktywności GLUT5? Trzeci wątek obejmuje przegląd literatury wskazującej na znaczenie białka GLUT5 w etiologii chorób dietozależnych. Wszystkie wspomniane tematy są omówione bardzo szczegółowo i wydaje się, że wyczerpująco w świetle dostępnych wyników badań. Tym bardziej przekonująco opisy te wskazują na olbrzymie braki w wiedzy dotyczącej przyswajania jednego z podstawowych składników żywności i znakomicie uzasadniają celowość podjętych przez Doktorantkę badań. Z obowiązku recenzenta zwrócę tylko uwagę na niekonsekwentne nazewnictwo lipidów, m.in. na stronie 31, gdzie wspomniana jest synteza trójglicerydów. Poprawna nazwa to triacyloglicerole, czego Doktorantka wydaje się być świadoma, bo w tym samym kontekście pisze o mono- i diacyloglicerolach. Poza tym rozdział Wstęp jest naprawdę bardzo klarownie i dobrze napisany z wyjątkowo jak na tak rozbudowane opracowanie nielicznymi błędami edytorskimi.

Cel pracy został bardzo jasno przedstawiony. Zrozumiałe jest, że zamiar Doktorantki to poszukiwanie polifenoli, wyizolowanych oraz stanowiących składniki ekstraktu z rumianku pospolitego, wykazujących zdolność do hamowania dokomórkowego transportu fruktozy. Stwierdzenie takiej zdolności miało pomóc w zidenyfikowaniu czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genu *SLC2A5*. Kolejność postępowania wydaje się, że uległa zmianie w trakcie realizacji badań, ale wyznaczone cele zostały z sukcesem zrealizowane.

Następny rozdział Materiały i Metody poświęcony jest omówieniu procedur eksperymentalnych, stanowi zatem fragment pracy, który może pośrednio świadczyć o staranności wykonywania doświadczeń laboratoryjnych. Po bardzo porządnie napisanym wstępie, rojący się od błędów opis stosowanych materiałów i metod był dużym zaskoczeniem. Linie komórkowe wymienione są tylko w postaci stosowanych skrótów, a jednak powinien to być pełniejszy opis. Nie sposób byłoby powtórzyć procedury doświadczalnej, ponieważ podane są tylko absolutnie skrótowe informacje co do wykorzystywanych odczynników biologicznych i chemicznych. W przypadku użytych preparatów do biologii molekularnej, także enzymów, podane jest tylko podstawowe oznaczenie, choć w katalogach firm na ogół można znaleźć szereg wariantów danego odczynnika. Dla przeciwności nie podano w stosunku do białka jakich organizmów są skierowane. Wręcz irytujące jest użycie angielskiego słowa "kit" w miejsce "zestaw", spolonizowanego określenia "ze sztoku x50" czy nazwanie spektrofotometru aparatem do pomiaru stężenia materiału genetycznego (str. 43). Nieco lepiej jest z opisem stosowanych metod, ale i tu można napotkać nadto liczne błędy edytorskie (w tym rozłączna pisownia "znad") oraz znaczeniowe: "DNA zaabsorbowane na powierzchni" str. 53, "Wartość różnicy absorbancji pomiędzy  $t$  i  $t_0$  wskazywał wartość efektywności transfekcji." str. 57, "Względą katywność aktywności transkrypcyjnej obliczono z średniej z 30 pojedynczych pomiarów lucyferazy z dołka, którą dzielono przez aktywność fosfatazy alkalicznej." str. 57/58,

“...wykonano krzywą standardową na stężenie białka z wykorzystaniem szoku(2 mg/ml) BSA w zakresie 0-2000  $\mu\text{g/ml}$ .” str. 58. Co więcej dla tej krzywej (prostej?) wzorcowej obliczono nachylenie krzywej  $r^2$ . Nieco została nadwyrężona moja cierpliwość edytorska w tym rozdziale. Jak się okazało nie tylko w tym, bo omówienie wyników zostało napisane równie niepożądnym pod względem edytorskim i błędów jest zbyt wiele by je wszystkie przytoczyć.

Rozdziały rozprawy poświęcone prezentacji wyników (Rozdział Wyniki) otwiera omówienie wstępnych doświadczeń mających na celu, jak można się domyślić, dobór warunków prowadzenia prac właściwych. Rozpoczyna się ta część poszukiwaniem najlepszego modelu komórkowego, przy czym dopiero na dalszej stronie (str. 68) zostało wyjaśnione, że najlepszy model to ten o najwyższej ekspresji mRNA *SLC2A5*. Na str. 67 wymienione są testowane modele ludzkich linii komórkowych, spośród których najwyższą ekspresję mRNA genu *SLC2A5* i białka GLUT5 stwierdzono dla linii Caco-2. Niestety także w tym miejscu (str. 67) zostały podane tylko skrótowe nazwy linii komórkowych; natomiast informacja jakich pożywek użyto do ich hodowania powinna się znaleźć w części metodycznej. Kolejnym etapem przygotowawczym było określenie wpływu polifenoli wybranych spośród tych obecnych w ekstraktach z rumianku, i przy tym znanych z literatury jako przeciwdziałające zespołowi metabolicznemu, na żywotność komórek Caco-2. Uzyskane wyniki pozwoliły na wybór stężenia 20  $\mu\text{M}$  polifenoli jako tego niepowodującego cytotoxyczności, choć wątpliwość budzi 24-godzinny czas inkubacji z badanymi związkami, bo efekty na ekspresję genu *SLC2A5* (m.in. inhibicja przez apigeninę i stymulacja przez kwercyтынę) widoczne były dopiero po 48 godzinach. Posumowując ten etap badań, dalsze doświadczenia miały być prowadzone z użyciem linii komórkowej Caco-2, dla stężenia polifenoli wynoszącego 20  $\mu\text{M}$  (prawidłowy wybór, bo stężenie bliskie biodostępności i łatwo osiągalne w przewodzie pokarmowym, gdzie polifenole stykają się z enterocytami) oraz 24-godzinnego czasu inkubacji, jak wynika z przynajmniej niektórych dalszych doświadczeń. Dlaczego nie 48-godzinna inkubacja skoro ta dawała statystycznie istotne wyniki przy wstępnej ocenie wpływu na ekspresję genu *SLC2A5* i co więcej Doktorantka sama podkreśla ten fakt w rozdziale Dyskusja? Tu jeszcze jedno pytanie odnośnie opisu osi Y na wykresach umieszczonych w części wynikowej rozprawy - co to za jednostki, w których wyrażana jest ekspresja mRNA czy względna aktywność promotorowa? Nie są te jednostki zdefiniowane ani w części metodycznej ani w podpisach pod wykresami.

Kolejny etap prac badawczych skupiał się na poszukiwaniach regionu regulatorowego w obrębie promotora genu *SLC2A5* oraz potencjalnych czynników regulujących aktywność transkrypcyjną tego genu. Doktorantka zastosowała szereg podejść metodycznych, które pozwoliły jej na zidentyfikowanie regionu -214/+58 jako tej tzw. sekwencji E-box stanowiącej miejsce rozpoznawane przez białka regulatorowe. W tym przypadku, jak wskazywała analiza *in silico*, białkami tymi mogły być czynniki USF-1 i USF-2 (rodzina

czynników *upstream stimulatory factors*), ale wyciszenie kodujących je genów na drodze interferencji z zastosowaniem siRNA nie potwierdziło tych oczekiwań. Ekspresja mRNA genu *SLC2A5* nie została zahamowana. Innymi kandydatami sugerowanymi przez analizę *in silico* mogącymi wiązać się do zidentyfikowanej sekwencji E-box i regulować aktywność genu *SLC2A5* były czynniki transkrypcyjne SNAIL1 i SNAIL2 (ang. *snail family zinc fingers*). Doświadczenia potwierdziły, że nadekspresja tych czynników transkrypcyjnych hamuje ekspresję mRNA genu *SLC2A5* oraz ekspresję białka GLUT5, co nie było wcześniej wiadome. Tym samym zostały zaproponowane białka regulatorowe, które mogłyby być molekularnym celem dla związków/substancji obniżających transport fruktozy poprzez oddziaływanie na regulację ekspresji genu kodującego transporter fruktozy. To bardzo ciekawy wynik. Opis tego etapu prac jest naszpikowany skrótami, jak to w biologii molekularnej; niestety dwa najważniejsze skróty nie zostały wyjaśnione w tekście, dlatego umieściłam ich pełne nazwy w niniejszej recenzji. Nie zostały też umieszczone na liście stosowanych skrótów, która co więcej bezlitośnie nie jest ułożona alfabetycznie, więc każda próba znalezienia co dany skrót oznacza wymaga przeszukiwania całej listy.

Kolejne badania koncentrowały się na udokumentowaniu, że substancje zwiększające ekspresję czynników transkrypcyjnych SNAIL1 i SNAIL2 rzeczywiście hamują ekspresję genu *SLC2A5* i kodowanego przezeń białka GLUT5. Za taką substancję na podstawie danych literaturowych Doktorantka uznała inhibitor deacetylaz histonowych - trichostatynę A, choć ani w rozdziale Wyniki ani w rozdziale Dyskusja nie uzasadniła dlaczego. To bardziej generalna uwaga do części rozprawy zatytułowanej Wyniki. Nie ma uzasadnienia podjętych badań, nie ma sugestii jaka hipoteza badawcza była postawiona i weryfikowana, dlaczego wykorzystano takie a nie inne podejście doświadczalne. W rozprawie doktorskiej są to punkty pozwalające ocenić wkład intelektualny i dojrzałość doktoranta jako naukowca. Jako recenzent mam w tym przypadku z tym kłopot. Wracając do trichostatyny A, Doktorantka zbadała wpływ tego związku na istotne z punktu widzenia projektu doktorskiego efekty biologiczne w komórkach Caco-2. Po ustaleniu braku cytotoksyczności trichostatyny A w bardzo niskich nanomolarnych stężeniach (dlaczego taki wybór?), zbadała jej wpływ na ekspresję genu *SLC2A5* oraz aktywność sklonowanego wektora. W obu przypadkach zaobserwowano zależny od stężenia (powino być wyrażane w  $\mu\text{M}$ , a nie  $\text{uM}$ ) efekt hamujący. Sprawdzone też zostało czy jest to pochodną zmian w poziomie acetylacji histonów i rzeczywiście potwierdzono wzrost acetylacji, szczególnie w przypadku histonu H3, sugerując, że to umożliwiło ekspresję genów odpowiedzialnych za hamowanie ekspresji genu *SLC2A5*. Jak można wnosić z dalszego opisu, Doktorantka miała na myśli geny kodujące czynniki transkrypcyjne SNAIL1 i SNAIL2. Dalsze doświadczenia potwierdziły, że wzrost acetylacji histonów H3 i H4 w komórkach Caco-2 jest skorelowany z nadekspresją wspomnianych czynników transkrypcyjnych i spadkiem ilości białka GLUT5. A zatem Doktorantka wykazała, że można modulować transport fruktozy przy użyciu

niskocząsteczkowych związków mających zdolność regulowania ekspresji genu *SLC2A5*. To już jednak moja, mam nadzieję słuszną, interpretacja wyników, bowiem Doktorantka ograniczyła się w tym miejscu do ich bardzo lakonicznego opisu. Pomimo umieszczenia w kolejnych częściach rozprawy rozdziału poświęconego Dyskusji, ograniczenie prezentacji wyników wyłącznie do skrótowego odniesienia do załączonych wykresów nie wydaje mi się właściwą formą.

Równie lakonicznie opisane są poboczne doświadczenia mające na celu potwierdzenie sugerowanej w literaturze naukowej roli białka GLUT5 w rozwoju oporności na leki przeciwnowotworowe – tu zawierające platynę (dlaczego te właśnie wybrano?). Doktorantka wykazała, przy użyciu dwóch linii komórkowych ludzkiego raka jelita grubego – Caco-2 o wysokim poziomie ekspresji genu *SLC2A5* oraz HT-29 o niskiej jego ekspresji – że zmniejszenie ekspresji białka GLUT5 przez trichostatynę A uwrażliwia te pierwsze komórki na cisplatynę i oksaliplatynę. W komórkach HT-29 gdzie ta ekspresja jest z natury niska, efektu manipulacji poziomem ekspresji genu *SLC2A5* na oporność na wspomniane chemoterapeutyki nie stwierdzono.

Ostatnim etapem prac było sprawdzenie czy także polifenole, a w szczególności te obecne w ekstraktach z rumianku mogą regulować ekspresję *SLC2A5*/GLUT5 i przez to wpływać na poziom transportu fruktozy. Opis tych badań jest bardzo staranny, taki jakiego mi brakowało przy prezentacji wcześniejszych wyników. Doświadczenia w tym przypadku przeprowadzono także dla ekstraktu z rumianku i jego preparatu poddanego fermentacji mlekowej; ten ostatni miał imitować metabolizm obecnych w ekstrakcie fitozwiązków, w szczególności apigeniny, przez mikrobiotę jelitową. Już wstępne porównania trichostatyny A i apigeniny wykazały, że w zastosowanym układzie badawczym apigenina nie zwiększa acetylacji histonu H3, a zatem zdolność tego polifenolu do modulacji ekspresji *SLC2A5*/GLUT5 o ile w ogóle ma miejsce, to według innego mechanizmu. Te wstępne obserwacje potwierdzone zostały w dalszych doświadczeniach (Wyniki, rozdział 10), gdzie stwierdzono zależne od stężenia apigeniny hamowanie ekspresji genów *SLC2A5* i *SNAI1* oraz obniżenie poziomu białka GLUT5 w komórkach Caco-2. Ekstrakt z rumianku, także fermentowany nie zawierający już apigeniny, również hamował ekspresję genu *SLC2A5* w komórkach Caco-2, ale stymulował ekspresję genów kodujących zarówno czynnik transkrypcyjny *SNAI1*, jak i *SNAI2*. Nie zaskakuje fakt, że Doktorantka próbuje odnieść te obserwacje do apigeniny, która zgodnie z danymi literaturowymi miałaby być tym aktywnym składnikiem ekstraktu z rumianku kojarzonym z przeciwdziałaniem zespołowi metabolicznemu, a okazało się, że jej obecność nie jest konieczna dla modulacji aktywności transkrypcyjnej genów, które wcześniej zostały rozpoznane jako istotne dla regulacji transportu fruktozy. Mieszaniny polifenoli zachowują się jak zupełnie nowe substancje i jak to wykazaliśmy w wielu badaniach prowadzonych w naszym zespole, ich działania nie można przewidzieć na podstawie obserwacji poczynionych dla wyizolowanych składników. Wyniki badań Doktorantki

wskazujące na odmienność działania apigeniny i zawierającego ją ekstraktu z rumianku stanowią kolejne potwierdzenie naszej hipotezy.

Część badawczą podsumowuje starannie opracowany rozdział Dyskusja, w którym krok po kroku uzasadniono celowość kolejnych etapów badawczych i przedyskutowano także w stosunku do wyników dostępnych w literaturze. Może zabrakło mi w tym miejscu takiej dalekosiężnej oceny jak przeprowadzone badania mogą wpłynąć na prewencję zespołu metabolicznego. Interesującą propozycją jest natomiast wskazanie potencjalnej istotności produktów fermentacji mlekowej ekstraktu z rumianku, m.in. kwasu mlekowego, w regulacji ekspresji *SLC2A5/GLUT5*. Czy należy rozumieć, że każdy ekstrakt roślinny w wyniku takiej fermentacji nabierze tych samych właściwości biologicznych i może stać się inhibitorem transportu fruktozy?

Podsumowując, recenzowana praca zarówno pod względem koncepcji, wykorzystanego warsztatu badawczego, uzyskanych wyników dostarcza zarówno całkiem nowych, jak i uzupełniających obecny stan wiedzy informacji na temat mechanizmu regulacji transportu fruktozy poprzez modulację ekspresji mRNA genu *SLC2A5* przez czynniki transkrypcyjne *SNAI1* i *SNAI2* oraz inhibicję ekspresji jego produktu tzn. transportera *GLUT5*. Przeprowadzone badania wskazują, że zahamowanie dokomórkowego transportu fruktozy jest możliwe pod wpływem niskocząsteczkowych związków chemicznych wpływających na regulację ekspresji genu kodującego transporter fruktozy.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa pt. “Regulacja ekspresji genu *SLC2A5* i białka *GLUT5* przez wybrane biologicznie aktywne związki pochodzenia naturalnego” spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia, przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule Naukowym w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. nr 65, poz 595) z późniejszymi zmianami (Dz. U./z 2017 r., poz 1789) i przedstawiam Radzie ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Chałaśkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agnieszka Bartoszek

