

Łódź, dn. 27.07.2023

Prof. dr hab. n. med. Urszula Lewandowska  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Zakład Biochemii  
Katedra Biochemii i Chemii  
Wydział Lekarski

## **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Chałaśkiewicz**

### ***"Regulacja ekspresji genu SLC2A5 i białka GLUT5 przez wybrane biologicznie aktywne związki pochodzenia naturalnego"***

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Katarzyny Chałaśkiewicz została wykonana pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. Marii Koziółkiewicz z Instytutu Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej oraz Promotora dra hab. Marcina Ratajewskiego, prof. nadzw. z Instytutu Biologii Medycznej PAN.

#### **Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji**

Podstawę formalną wykonania niniejszej recenzji stanowi Uchwała nr 50/2023 z dn. 31.05.2023r. Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia Politechniki Łódzkiej oraz pismo Dziekana Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, dr hab. inż. Anny Diowski prof. uczelni z dnia 2 czerwca 2023 r.

#### **Podstawowe dane o kandydatce**

Pani mgr inż. Katarzyna Chałaśkiewicz ukończyła w 2019 roku, w trybie stacjonarnym studia drugiego stopnia na kierunku biotechnologia w specjalności biotechnologia molekularna i biochemia techniczne, na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej uzyskując w dniu 5 września 2019 roku tytuł zawodowy magistra.

Kandydatka zgodnie z podpisanym oświadczeniem nie ubiegała się do tej pory o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

### **Temat**

We wstępie swojej pracy Doktorantka uzasadnia znaczenie tematyki podjętych przez Nią badań, podkreślając metaboliczną rolę fruktozy w organizmie. Szczególną uwagę Doktorantka zwraca na rolę fruktozy w rozwoju procesów patologicznych prowadzących do zaburzeń metabolicznych oraz rozwoju niektórych nowotworów. Zagadnienia stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej wpisują się w nurt aktualnych badań prowadzonych na świecie na przestrzeni ostatnich dwóch dekad, które dostarczają przełomowych obserwacji dowodząc, że czynniki transkrypcyjne SNAI1 i SNAI2, regulują ekspresję genu *SLC2A5*, a tym samym transport i wchłanianie fruktozy.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że wybór tematu przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest uzasadniony i aktualny. Postawiony cel naukowy odpowiada poziomowi jakim powinna odznaczać się rozprawa doktorska.

### **Ocena formalna**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter badawczy i posiada układ edytorski typowy dla tego rodzaju monografii, liczy 129 stron maszynopisu, w tym 27 rysunków, 5 schematów i 2 tabele. Rozprawa zawiera Spis treści, Streszczenie w języku polskim oraz Streszczenie w języku angielskim (łącznie 6 stron), Wstęp teoretyczny przedstawiający aktualny stan wiedzy związanej z tematyką rozprawy (30 stron), Cel pracy (1 strona), Część doświadczalną (Materiały i Metody 27 stron), Wyniki badań własnych (33 strony), Dyskusję wyników (11 stron), Podsumowanie i wnioski końcowe (1 strona), oraz Wykaz stosowanych skrótów, spis ilustracji i tabel (4 strony). Uzupełnieniem treści rozprawy jest Bibliografia licząca 147 pozycji. Literatura wykorzystana do przygotowania dysertacji jest ściśle związana z tematyką rozprawy i obejmuje pozycje opublikowane głównie w ostatnich latach.

W kontekście oceny formalnej stwierdzam, że zarówno struktura rozprawy jak i zawartość merytoryczna poszczególnych części są poprawnie opisane. Wyjątek stanowi wykaz skrótów, który jest podany niealfabetycznie, co w moim odczuciu znacznie utrudnia czytanie przygotowanej monografii. Z kolei czytelne schematy opisywanych procesów przygotowane w programie BioRender ułatwiają czytanie pracy.



## Ocena merytoryczna

Wstęp teoretyczny został podzielony na kilkanaście podrozdziałów, w których Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów odpowiedzialnych za dokomórkowy transport i metabolizm fruktozy, w kontekście rozwoju chorób metabolicznych oraz niektórych nowotworów. W następnych podrozdziałach Wstępu Doktorantka szeroko przedstawiła i scharakteryzowała zagadnienia dotyczące złożoności oraz molekularnej kontroli ekspresji genu *SLC2A5*, takie jak: mechanizmy transkrypcyjne i epigenetyczne ekspresji genu *SLC2A5*, receptory jądrowe (receptor glukokortykoidów, GR; wątrobowy receptor X; LXR $\alpha$ , *liver X receptor  $\alpha$* ), białka o aktywności czynników transkrypcyjnych (ChREBP, *carbohydrate response element-binding protein*; TXNIP, *thioredoxin-interacting protein*; S100P, *small calcium-binding protein P*; ATF4, *activating transcription factor 4*), naturalne i syntetyczne inhibitory poziomu i aktywności transportera GLUT5 (*facilitated glucose transporter*), oraz GLUT5 w chorobach metabolicznych i nowotworowych.

Podsumowując, część teoretyczna recenzowanej rozprawy doktorskiej jest spójna, logiczna w formie i bogata w treść, co świadczy o właściwym zaznajomieniu się Doktorantki z tematyką badawczą oraz stanowi bardzo dobre wprowadzenie do przeprowadzonych badań.

## Cel

Cel pracy oraz szczegółowe zadania badawcze zostały sformułowane w sposób jasny i nie budzący żadnych wątpliwości merytorycznych. Celem zasadniczym ocenianej rozprawy było "poszukiwanie oraz identyfikacja związków polifenolowych, jako potencjalnych inhibitorów ekspresji genu *SLC2A5* oraz poziomu białka GLUT5 ". Cel pracy został podzielony na trzy cele szczegółowe, w tym:

1. Zbadanie wpływu wybranych fitozwiązków (apigenina, chryzyna, kwas ursolowy, kwercetyna) obecnych w ekstrakcie z rumianku pospolitego na ekspresję genu *SLC2A5*.
2. Zbadanie wpływu surowego i fermentowanego ekstraktu z rumianku pospolitego na ekspresję genu *SLC2A5*.
3. Próba identyfikacji czynnika/czynników transkrypcyjnych wpływających na ekspresję genu *SLC2A5*.

## Metodyka pracy

Rozdział metodologiczny zawierający opis materiałów i badań stosowanych w pracy jest wystarczający do interpretacji uzyskanych wyników. Stwierdzam, że Doktorantka jest doświadczonym eksperymentatorem, bardzo dobrze znającym nowoczesne techniki badawcze z zakresu biochemii, biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej. W pracy zastosowano szeroki wachlarz metod, technik i analiz m.in. ilościowy RT-PCR, Western blotting, klonowanie promotora genu *SLC2A5*, transfekcję komórek Caco-2, analizę EMSA (*electrophoretic mobility shift assays*), przygotowanie ekstraktu bogatego w polifenole z rumianku pospolitego (*Matricaria chamomilla* L.) oraz poddanie go fermentacji i analizie chromatograficznej (UPLC, *Ultra-Performance Liquid Chromatography*).

## Wyniki i dyskusja

Wyniki badań własnych Doktorantka bardzo dobrze udokumentowała na 27 rysunkach oraz 2 schematach, opisując poszczególne zależności i analizowane parametry. Świadczą one o ogromnej pracy włożonej przez Doktorantkę, w wykonanie badań eksperymentalnych i przedstawienie wyników w przejrzystej formie, pozwalającej na ich łatwe przestudiowanie.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka w sposób logiczny omówiła otrzymane wyniki w konfrontacji z danymi z piśmiennictwa. W mojej opinii, bardzo wartościową częścią przeprowadzonej dyskusji jest również wskazanie (lub próba wskazania) przyczyn obserwowanych rozbieżności pomiędzy wynikami uzyskanymi przez Doktorantkę i wynikami innych zespołów badawczych. Powyższe fakty świadczą o odpowiedzialności badawczej i dużej wiedzy nabytej przez mgr inż. Katarzynę Chałaśkiewicz z zakresu biologii molekularnej, inżynierii genetycznej oraz projektowania innowacyjnych strategii terapeutycznych w chorobach metabolicznych i nowotworu jelita grubego.

Na etapie wstępnym pracy do istotnych wyników otrzymanych przez Doktorantkę należało ustalenie, że spośród 14 przebadanych linii komórkowych, najwyższą ekspresję mRNA genu *SLC2A5* i poziomu białka GLUT5 wykazała linia nowotworu jelita grubego (Caco-2), co potwierdziło zasadność użycia tej linii w dalszych eksperymentach. W mojej ocenie powyższy wniosek został oparty na niekompletnych wynikach dotyczących poziomu białka GLUT5, ponieważ został on oceniony w 7 z 14 linii. Jak wiadomo, nie zawsze



ekspresja genu koreluje z ekspresją produktu tego genu, o czym w dyskusji nadmieniam również Doktorantka.

W dalszej części badań Doktorantka dokonała oceny cytotoksyczności w stosunku do komórek Caco-2 wybranych związków polifenolowych, takich jak: kwasu ursolowego, chryzyny, kwercetyny oraz apigeniny. Powyższe związki są składnikami ekstraktu z rumianku, który jako jedna z niewielu roślin wykazuje aktywność hamującą transport fruktozy poprzez obniżanie aktywności transportera GLUT5. Najbardziej cytotoksyczne okazały się chryzyna i kwercetyna, podczas gdy apigenina nie wykazywała właściwości cytotoksycznych w stosunku do komórek Caco-2.

Kluczowym elementem przedłożonej pracy doktorskiej była ocena wpływu wybranych związków polifenolowych (apigeniny, kwercetyny, kwasu ursolowego, chryzyny) na poziom mRNA genu *SLC2A5* w komórkach Caco-2. Analiza ilościowa RT-PCR pokazała brak wpływu chryzyny i kwasu ursolowego na ekspresję tego genu. Apigenina zaś hamowała znacznie ekspresję mRNA dla *SLC2A5*, natomiast kwercetyna indukowała transkrypcję tego genu. Wyniki uzyskane w trakcie następnych eksperymentów pozwoliły Doktorantce wytypować apigeninę jako związek wyraźnie hamujący transkrypcję genu *SLC2A5* (w sposób zależny od stężenia po 48h inkubacji) i białka GLUT5 w komórkach raka jelita w sposób odmienny niż trichostatyna A.

Kolejnym etapem prac było zbadanie molekularnych mechanizmów wpływających na inhibicję ekspresji transportera fruktozy, GLUT5. Spośród kilkunastu czynników transkrypcyjnych (RELA, NFATc4, YY1, STAT5A, PLAGL2, SP1, MYB, STAT1, PLAG1, HNF1a, USF1, SNAI1 i SNAI2) wiążących się do promotora genu *SLC2A5*, w dokonanej analizie (przy zastosowaniu oprogramowania MatInspector), zidentyfikowano dwa czynniki SNAI1 i SNAI2, jako regulatory ekspresji genu *SLC2A5*, które dotychczas nie były opisywane w literaturze. Udokumentowanie tej zależności stanowi nowy oryginalny wynik uzyskany w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej. Wynik ten wzbogaca listę czynników transkrypcyjnych opisanych dotychczas jako istotne dla regulacji ekspresji genu *SLC2A5*, transportera fruktozy.

Ponadto, w ramach realizowanej pracy doktorskiej wykazano, że trichostatyna A uwrażliwia komórki Caco-2 na cisplatinę i oxaliplatinę. Zaobserwowano 5-6 krotny spadek  $IC_{50}$  po preinkubacji komórek z trichostatyną A, a następnie ich inkubacji z lekami przeciwnowotworowymi (cisplatiną i oxaliplatiną). Uzyskane wyniki są bardzo istotne



w kontekście wysokiej oporność komórek nowotworu jelita grubego na chemioterapię. Co ciekawe, eksperyment przeprowadzony na komórkach HT-29 (o niskiej ekspresji mRNA *SLC2A5*) wykazał specyficzność działania trichostatyny A wobec komórek z wysoką ekspresją genu *SLC2A5*. Trichostatyna A nie uwrażliwiała tych komórek na chemoterapeutyki.

W niniejszej pracy zbadano również wpływ ekstraktu "surowego" z rumianku pospolitego oraz ekstraktu poddanego fermentacji bakteryjnej (*Levilactobacillus brevis*) na ekspresję genu *SLC2A5* oraz genów kodujących białka regulatorowe SNAI1 i SNAI2. Ekstrakt poddany fermentacji indukował ekspresję SNAI1 i SNAI2 oraz hamował ekspresję genu *SLC2A5* i poziom transportera fruktozy, białko GLUT5. Otrzymane wyniki pokazały wysoką aktywność fermentowanego ekstraktu z rumianku, która była znacznie wyższa niż aktywność zaobserwowana dla "surowego" ekstraktu. Jednocześnie wyniki analizy chromatograficznej wskazywały na brak apigeniny w fermentowanym ekstrakcie z rumianku. W wynikach dotyczących badań nad ekstraktami Doktorantka prezentuje czytelny schemat otrzymywania ekstraktu z rumianku, wspomina o analizie UPLC (o wysokiej zawartości apigeniny), ale brakuje w nich porównania składu obu badanych ekstraktów, co w mojej opinii dałoby możliwość pełniejszej dyskusji na ich temat w kontekście modelowania ekspresji genu *SLC2A5*.

### Uwagi

Rozprawa została zredagowana w sposób przejrzysty i poprawny stylistycznie. Jest też zasadniczo napisana poprawnym językiem naukowym, chociaż Doktorantce nie udało się uniknąć pewnych nieścisłości oraz niezręcznych sformułowań, m.in.: "czyste medium", "czyste polifenole", "produkcja glukozy". Doktorantka w kilku miejscach pracy stosuje skrót, którego rozwinięcie wprowadza dopiero w kolejnych zdaniach/akapitach (np.: FBS). Z kolei rozwinięcia niektórych skrótów nie pojawiają się w tekście (np.: PEPCK1). Rysunek 27 jest niekompletnie oznaczony, brak A,B,C i D, które pojawiają się w opisie.

Te drobne uwagi wymienione powyżej nie rzutują jednak na moją bardzo wysoką ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej.

W trakcie przygotowywania niniejszej recenzji nasunęło mi się kilka pytań. Prosiłabym, aby Doktorantka odniosła się do każdego z poniższych punktów.





1. Dlaczego ocenę cytotoksyczności związków polifenolowych (apigeniny, kwercetyny, kwasu ursolowego, chryzyny) Doktorantka przeprowadziła tylko po 24h inkubacji, skoro ocenę ich wpływu na ekspresję mRNA genu *SLC2A5* przeprowadziła po 48h inkubacji?
2. Dlaczego ocena wpływu ekstraktu "surowego" z rumianku na żywotność komórek Caco-2 została przeprowadzona po 24h, a ekstraktu poddanego fermentacji po 48h?
3. Dlaczego Doktorantka w pierwszych etapach badań, wybierając model eksperymentalny, nie zbadała również ekspresji mRNA genu *SLC2A5* i transportera GLUT5 w prawidłowych komórkach nabłonkowych jelita?
4. Ciekawa jestem czy Doktorantka sama wykonywała badania (lub które z nich) z zakresu inżynierii genetycznej, w tym np.: klonowanie promotora genu *SLC2A5* ? Podjęcie takich badań i ich wykonanie z pewnością było wielkim wyzwaniem i pokazało determinację Doktorantki w uzyskaniu końcowych wyników.
5. Na końcu rozdziału "Dyskusja" Doktorantka opisuje ograniczenia przedłożonej rozprawy Doktorskiej, z którymi jak pisałam powyżej w pełni się zgadzam. Doktorantka zwraca uwagę na fakt, że *"zasadne byłoby powtórzenie tego etapu badań....."*, w związku z tym mam pytanie, czy Doktorantka zamierza prowadzić dalsze prace badawcze w tym temacie?

#### Podsumowanie i wnioski końcowe

W podsumowaniu oceny pracy stwierdzam, że jest ona znaczącym osiągnięciem Doktorantki zrealizowanym z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych, w szczególności z zakresu biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. Uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki są nowatorskie – stanowią cenne źródło wiedzy na temat wpływu badanych związków (trichostatyny A, apigeneiny, ekstraktu z rumianku po fermentacji bakteryjnej) na ekspresję czynników transkrypcyjnych (SNAI, SNAI2) oraz ekspresję genu *SLC2A5* i poziom białka GLUT5 w komórkach raka jelita. Prezentują one nową wiedzę na temat molekularnych mechanizmów regulacji wychwytu/transportu fruktozy w komórkach nowotworowych jelita. Ponadto, wskazują na wysoki potencjał związków pochodzenia naturalnego, jako inhibitorów transportera GLUT5, w leczeniu chorób o podłożu metabolicznym i niektórych nowotworów jelita.

Z przyjemnością, zatem pragnę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca autorstwa mgr inż. Katarzyny Chałaśkiewicz zatytułowana "*Regulacja ekspresji genu SLC2A5 i białka GLUT5 przez wybrane biologicznie aktywne związki pochodzenia naturalnego*" spełnia określone ustawowo warunki stawiane rozprawie doktorskiej, dlatego wnioskuję do Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Chałaśkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.





Łódź, dn. 27.07.2023

Prof. dr hab. n. med. Urszula Lewandowska  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Zakład Biochemii  
Katedra Biochemii i Chemii  
Wydział Lekarski

## WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE

rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Chałaśkiewicz

*"Regulacja ekspresji genu SLC2A5 i białka GLUT5 przez wybrane biologicznie aktywne związki pochodzenia naturalnego"*

Ze względu na fakt, że:

1. podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne z punktu widzenia metodologicznego i aplikacyjnego,
2. cele pracy zostały zrealizowane, a osiągnięte oryginalne wyniki mają charakter poznawczy i stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny,

wniosuję do Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia Politechniki Łódzkiej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Chałaśkiewicz.