



2015 12. 18

UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Wydział Biologii

prof. dr hab. Artur Jarmołowski
Zakład Ekspresji Genów
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
ul. Umultowska 89
61-614 Poznań
tel.: 61 829 5959
faks: 61 829 5949
e-mail: artjarmo@amu.edu.pl

Poznań, 20. 12. 2015

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Marty Moskot pt. „Molekularne mechanizmy działania flawonoidów na procesy komórkowe w ludzkich fibroblastach”

Oceniana praca doktorska powstała w Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, afiliowanej przy Uniwersytecie Gdańskim. Promotorem rozprawy jest prof. PAN dr hab. Magdalena Gabig-Cimińska. Podjęty przez mgr Martę Moskot temat badawczy dotyczy poznania możliwości wykorzystania związków flawonoidowych w terapii lizosomalnych chorób spichrzeniowych, w tym przede wszystkim mukopolisacharydoz. Flawonoidy, polifenolowe związki będące wtórnymi produktami metabolizmu roślin, są od wielu lat cenionymi elementami diety z uwagi na ich pozytywny wpływ na zdrowie człowieka, głównie z uwagi na przeciwzapalne i oksydacyjne właściwości tych dość powszechnie występujących u roślin metabolitów. Od pewnego czasu prowadzone są również badania nad zastosowaniem flawonoidów przy wspomaganiu leczenia chorób nowotworowych. Badania nad wykorzystaniem flawonoidów w leczeniu mukopolisacharydoz zostały zainicjowane przez zespół kierowany przez prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna, który po raz pierwszy zauważył wyraźny wpływ genisteiny na obniżenie poziomu nagromadzenia glikozaminoglikanów w komórkach pacjentów cierpiących na mukopolisacharydozę. Okazało się, że genisteina, flawonoid obficie występujący w nasionach soi, może być obiecującym lekiem łagodzącym i opóźniającym rozwój mukopolisacharydozy. Zespół kierowany przez prof. PAN dr hab. Magdalenę Gabig-Cimińską kontynuuje te badania, próbując



zmaksymalizować zaobserwowany efekt leczniczy flawonoidów poprzez testowanie skuteczności innych polifenoli, a także ich ściśle kontrolowanych kombinacji. Drugi, moim zdaniem najważniejszy nurt badawczy tego zespołu dotyczy charakterystyki molekularnych mechanizmów działania różnorodnych flawonoidów na komórki ludzkie, przy wykorzystaniu nowoczesnych narzędzi biologii molekularnej, pozwalających na globalne spojrzenie na ekspresję całego genomu, a nie tylko obserwację zmian ekspresji pojedynczych genów. To właśnie takie globalne, transkryptomyczne podejście zastosowała w swojej pracy mgr Marta Moskot. Już teraz, na wstępie mojej oceny rozprawy doktorskiej przygotowanej przez mgr Martę Moskot, zanim przejdę do dokładniejszego omówienia zaprezentowanych w tej pracy wyników, chciałbym podkreślić, że rezultaty przedstawione w rozprawie są niezwykle ciekawe, a także ważne nie tylko z czysto poznawczego punktu widzenia, ale przede wszystkim dlatego, że dają nadzieje na ich zastosowanie w terapii lizosomalnych chorób spichrzeniowych. Przedstawione w ocenianej pracy doktorskiej wyniki pozwoliły na stworzenie modelu, który tłumaczy wpływ flawonoidów na biogenezę i działanie lizosomów. Wyniki te, co ważne, nie zamykają tego interesującego tematu badawczego, ale wyznaczają nowe kierunki badań, co jest dla mnie najlepszym wyznacznikiem dobrej pracy naukowej. Nie mam wątpliwości, że zarówno temat badań, niezwykle oryginalny a równocześnie o dużym znaczeniu aplikacyjnym, jak i uzyskane i przedstawione w rozprawie wyniki zasługują na najwyższą ocenę.

Praca doktorska mgr Marty Moskot jest zbiorem czterech artykułów opublikowanych w *Journal of Biological Chemistry*, *Scientific Reports*, *Metabolic Brain Disease* i *Molecular and Cellular Biochemistry*. Wszystkie te periodyki naukowe są znane i cenione w środowisku naukowym. Prace, które się w nich ukazują podlegają ostrej krytyce ze strony zaproszonych do ich oceny recenzentów. Dodatkowo, Autorka ocenianej rozprawy przygotowała omówienie uzyskanych i opublikowanych wyników, przedstawione w ocenianej pracy doktorskiej zarówno w języku polskim, jak i po angielsku. We wszystkich stanowiących tę rozprawę artykułach mgr Marta Moskot jest pierwszym autorem, co jednoznacznie wskazuje na Jej wiodącą rolę w ich powstaniu. Do rozprawy dołączono również odpowiednie



oświadczenia, które precyzują wkład poszczególnych współautorów. Z ich analizy wynika jednoznacznie, że rola mgr Marty Moskot przy powstawaniu artykułów, na których oparta jest oceniana praca doktorska, jest znacząca i adekwatna do zajmowanej na liście autorów pozycji. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa pełni wszystkie wymogi formalne stawiane pracom doktorskim.

Dwie główne strategie proponowane i stosowane obecnie w leczeniu lizosomalnych chorób spichrzeniowych to enzymatyczna terapia zastępcza (ETZ) oraz transplantacja szpiku kostnego. W obu przypadkach terapia polega na działaniach zmierzających do uzupełnienia w organizmie pacjenta brakującego enzymu. Przy zastosowaniu którejkolwiek z tych strategii, lekarze napotykają na poważny problem kliniczny związanym z niemożliwością przekroczenia przez enzym bariery krew – mózg, co stanowi olbrzymie utrudnienie przy leczeniu objawów neurologicznych, występujących w kilku typach mukopolisacharydoz oraz w sfingolipidozach. Drugim poważnym problemem jest wysoki koszt stosowania obu tych podejść terapeutycznych. W leczeniu omawianych schorzeń możliwe jest również alternatywne podejście, polegające na obniżeniu wydajności syntezy substratu rozkładanego przez uszkodzony enzym poprzez podanie choremu precyzyjnie dobranych związków niskocząsteczkowych. Podejście to ma trzy główne zalety, po pierwsze związki takie mogą przekraczać barierę krew – mózg, po drugie, z uwagi na obecność u pacjentów cierpiących na mukopolisacharydozy resztkową aktywność zmutowanych enzymów, nawet niewielkie zmniejszenie stężenia substratów powoduje wyraźne obniżenie ich akumulacji w lizosomach, i po trzecie – terapia taka jest tania i prosta. Jednym z takich związków, negatywnie działających na nagromadzenie się glikozoaminoglikanów w lizosomach fibroblastów pochodzących od chorych na mukopolisacharydozy typu I, II, IIIA i IIIB okazała się być ginesteina.

Głównym celem rozprawy doktorskiej mgr Marty Moskot było pozyskanie informacji na temat działania flawonoidów na procesy komórkowe zachodzące w ludzkich fibroblastach. Dane te miały posłużyć do zaproponowania modelu działania flawonoidów, przede wszystkim w aspekcie ich roli w powstawaniu i funkcji lizosomów. Wszystkie podjęte



zadania badawcze miały na celu zrozumienie, w jaki sposób flawonoidy regulują pracę lizosomów. W pracy mgr Marta Moskot porównała działanie dwóch izoflawonów, genisteiny i daidzeiny, oraz flawonolu, kemferolu. Obiektem badań były przede wszystkim ludzkie fibroblasty skórne HDFa, a także fibroblasty pochodzące od osób dotkniętych mukopolisacharydozą typu II, jak i ludzkie komórki nowotworu szyjki macicy HeLa oraz embrionalne fibroblasty mysie MEF.

Globalną analizę ekspresji genów ludzkich fibroblastów skórnych przeprowadzono przy użyciu mikromacierzy oligonukleotydowych firmy Illumina. Porównano transkryptom linii nietraktowanych i traktowanych genisteiną, kemferolem i daidzeiną, a także mieszaniną genisteiny i kemferolu oraz genisteiny i daidzeiny. W eksperymentach zastosowano stężenia, które zostały precyzyjnie dobrane w trakcie wykonanych wcześniej eksperymentów kontrolnych. Dane o zmianach transkryptomu fibroblastów pod wpływem działania badanych flawonoidów zostały przeanalizowane pod kątem przynależności zidentyfikowanych genów do odpowiednich przedziałów komórkowych lub procesów metabolicznych. Skorzystano w tym badaniu z dostępnych i sprawdzonych algorytmów służących do analiz ontologicznych. Wśród struktur, z którymi powiązane były geny o zmienionej ekspresji dominowały geny związane z dwoma przedziałami komórkowymi – lizosomami i jądrem komórkowym. Ciekawe jednak, że w przypadku genów związanych z lizosomami zmiana wywołana flawonoidami miała charakter pozytywny, a w przypadku genów związanych z prawidłowym funkcjonowaniem jądra komórkowego przeciwnie – negatywny. Wynik ten był podobny zarówno dla komórek hodowanych w obecności genisteiny, kemferolu, jak i mieszaniny genisteiny i kemferolu. Takiej zależności nie zaobserwowano w przypadku zastosowania daidzeiny, a także mieszaniny daidzeiny z genisteiną. Wyniki te najlepiej świadczą o specyficzności działania poszczególnych flawonoidów. Dla potwierdzenia zmian ekspresji wybranych genów pozytywnie zweryfikowano uzyskane wyniki mikromacierzowe wykonując PCR w czasie rzeczywistym. Opierając się na rezultatach przeprowadzonych analizy ontologicznej wytypowano do dalszych badań kilka procesów komórkowych, które wydawały się najbardziej wrażliwe na flawonoidy. Były to: metabolizm lizosomów, szlaki



syntezy i degradacja glikozoaminoglikanów, metabolizm sfingolipidów oraz cykl komórkowy i proliferacja. Ekspresję genów związanych w tymi procesami metabolicznymi poddano następnej gruntownej analizie. W przypadku genów związanych z metabolizmem glikozoaminoglikanów, zaobserwowano obniżenie ekspresji genów, których produkty są zaangażowane w początkowe etapy syntezy łańcuchów siarczanu heparanu, dermatanu i chondryny, a także polimeryzację łańcucha siarczanu heparanu i siarczanu keratanu. Efekty te skorelowane były z ogólnym obniżeniem akumulacji glikozoaminoglikanów pod wpływem podanych flawonoidów.

W przypadku traktowania ludzkich fibroblastów geisteiną zaobserwowano sporą grupę genów wykazującą podwyższoną ekspresję. Geny te kodowały lizosomalne hydroksylazy, enzymy uczestniczące w degradacji glikozoaminoglikanów. To właśnie zaburzenia w aktywności tej grupy enzymów są przyczyną mukopolisacharydoz. Podobne, choć nie identyczne obserwacje poczyniono badając działanie kemferolu. Te bardzo interesujące i ważne obserwacje naukowe powiązały działania genisteiny i kemferolu z regulacją biogenezy i funkcją lizosomów. Jednak najważniejszym, moim zdaniem, odkryciem naukowym opisanym w pracy doktorskiej mgr Marty Moskot jest wykazanie, że badane flawonoidy wpływają na ekspresję czynnika transkrypcyjnego EB. W przypadku TFEB wykazano, nie tylko wzrost poziomu transkrypcji genu kodującego ten ważny dla działania lizosomów czynnik transkrypcyjny, oraz pokazano, że przekłada się to na stężenie kodowanego przez ten gen białka, a także, co szczególnie mnie zainteresowało, wpływa na zmianę lokalizacji TFEB z cytoplazmatycznej na jądrową. Zarówno wzrost poziomu omawianego czynnika transkrypcyjnego, jak i jego akumulacja w jądrze komórkowym – miejscu jego aktywności, ma wpływ na działanie lizosomów. TFEB nazywany jest czynnikiem biogenezy lizosomów, ponieważ rozpoznaje promotory genów białek związanych z lizosomami i pozytywnie reguluje ich ekspresję. To właśnie podniesienie poziomu TFEB i/lub jego aktywacja pod wpływem flawonoidów może odpowiadać za zwiększoną ekspresję ponad 60 genów lizosomalnych, w tym również genów całej grupy hydrolaz. Ta interesująca hipoteza znalazła swoje potwierdzenie w eleganckich eksperymentach, w których wyciszono



ekspresję genu *TFEB* przy pomocy siRNA i wykazano, że genisteina powodowała wtedy o wiele mniejszy wzrost ekspresji genów związanych z funkcją lizosomów. Na podstawie wykonanych eksperymentów i uzyskanych danych o zmianach ekspresji poszczególnych genów w fibroblastach poddanych działaniu określonego flawonoidu, mgr Marta Moskot zaproponowała listę lizosomalnych chorób spichrzeniowych, w których leczeniu można by zastosować podawanie genisteiny, kemferol lub mieszaniny obu tych substancji.

Bardzo ciekawą obserwacją, wymagającą jednak dalszych badań, jest wykazany przez Doktorantkę negatywny wpływ genisteiny i kemferolu na ekspresję genów związanych z cyklem komórkowym i szerzej, metabolizmem DNA. Produkty białkowe tych genów wydają się być zlokalizowane głównie w jądrze komórkowym lub szkielecie cytoplazmatycznym. Są to na przykład liczne cykliny, kinazy, białka kompleksu MCM, czynniki uczestniczące w replikacji oraz polipeptydy związane z punktami kontrolnymi tego procesu. Autorka rozprawy wykazała, że genisteina powoduje obniżenie liczby komórek w fazie G₀/G₁ i podwyższenie ich liczby w fazie G₂/M. Zmiany te są skorelowane ze zmianami ekspresji białek kontrolujących przejścia między poszczególnymi etapami cyklu komórkowego. Co ważne dla klinicznego zastosowania flawonoidów, nie zaobserwowano negatywnego wpływu badanych flawonoidów na żywotność ludzkich fibroblastów skórnych. Zaobserwowano pozytywny efekt genisteiny na migrację poddanych odpowiednim testom fibroblastów.

Oceniana rozprawa doktorska nie tylko dostarczyła, tak jak założyła Autorka, gruntowanych informacji na temat molekularnych mechanizmów leczniczego działania flawonoidów w przypadku podawania ich chorym na mukopolisacharydozy, ale także zaproponowała spójny model, który wyjaśnia dlaczego genisteina i inne roślinne polifenolowe metabolity wtórne wykazują pozytywne działanie przy leczeniu chorób związanych z nieprawidłową akumulacją glikozoaminoglikanów lub sfingolipidów. Jak już wspomniałem, najciekawszym moim zdaniem wynikiem ocenianej rozprawy jest rola flawonoidów w regulacji aktywności czynnika biogenezy lizosomów TFEB. Muszę przyznać, że ten temat pozostawił we mnie uczucie pewnego niedosytu. Czy prace na ten temat są kontynuowane?



Czy postulowany w pracy opublikowanej w *Journal of Biological Chemistry* model wzrostu fosforylacji TFEB pod wpływem genisteiny został eksperymentalnie potwierdzony? Czy importowana do jądra jest tylko ufosforylowana forma tego czynnika transkrypcyjnego? Czy działa on w jądrze tylko w formie ufosforylowanej oraz czy działa tam jako monomer, homo- a może heterodimer? Nie do końca zrozumiałem także zaprezentowane wyjaśnienie negatywnego wpływu genisteiny na ekspresję genów kodujących enzymy zaangażowane w syntezę glikozoaminoglikanów poprzez działanie tego izoflawonu na receptor EGF. Prosiłbym o wyjaśnienie tych spraw podczas publicznej obrony doktoratu. Chciałbym jednak podkreślić, że pytania moje wynikają z czystej ciekawości naukowca i w żadnym stopniu nie wpływają na moją ocenę osiągnięć mgr Marty Moskot.

Rozprawę doktorską mgr Marty Moskot oceniam bardzo wysoko. Autorka przedstawiła w niej niezwykle oryginalne wyniki naukowe, które mają duże znaczenie w zrozumieniu terapeutycznego efektu flawonoidów w leczeniu mukopolisacharydoz wielu typów, ale także wskazała na możliwość zastosowania flawonoidów przy leczeniu lub wspomaganiu terapii w przypadku innej choroby spichrzeniowej, sfingolipidozy. Na podstawie uzyskanych przez Doktorantkę wyników można było zaproponować spójny model działania genisteiny i innych flawonoidów, wyjaśniający obniżenie gromadzonych w lizosomach glikozoaminoglikanów jako wynik hamowania aktywności enzymów ich syntezy oraz jednoczesny wzrost ekspresji czynnika transkrypcyjnego EB, którego działanie stymuluje ekspresję genów kodujących enzymy odpowiedzialne za rozpad mukopolisacharydów w lizosomach. Model ten pozwala przewidzieć, która z lizosomalnych chorób spichrzeniowych może być celem leczenia za pomocą flawonoidów. Oceniana praca w pełni spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Marty Moskot do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na oryginalność i olbrzymią wartość naukową zaprezentowanych w pracy wyników, proszę wysoką Radę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Marty Moskot. Jeszcze raz chciałbym na koniec mojej recenzji podkreślić



UNIwersYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Wydział Biologii

znaczenie badań prowadzonych przez mgr Martę Moskot przy opracowywaniu terapii stosowanych w leczeniu wielu lizosomalnych chorób spichrzeniowych.

prof. dr hab. Artur Jarmołowski