

## Ocena rozprawy doktorskiej mgr Marty Moskot

### „Molekularne mechanizmy działania flawonoidów na procesy komórkowe zachodzące w ludzkich fibroblastach”.

Podstawą przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr Marty Moskot są cztery oryginalne, doświadczalne i stanowiące wspólny cykl tematyczny prace, opublikowane w doskonałych, anglojęzycznych czasopismach naukowych: *Journal of Biological Chemistry* (2014; IF ~ 4.6), *Scientific Reports* (2015; IF ~ 5.5), *Metabolic Brain Disease* (2015; IF ~ 2.6) i *Molecular and Cellular Biochemistry* (2015; IF = 2.4). Łączny IF wymienionych publikacji wynosi około 15, a więc jest wysoki. Należy także podkreślić, że dwie najwcześniej opublikowane prace są już cytowane. Oprócz kopii wymienionych publikacji praca doktorska zawiera siedmiostronicowy rozdział zatytułowany „Abstract” (napisany w języku angielskim) i ośmiostronicowy rozdział „Streszczenie”, w których doktorantka wprowadza czytelnika w przedmiot badań, podaje przesłanki do podjęcia badań przedstawionych w pracy doktorskiej, ukazuje cel pracy oraz dokonuje omówienia i dyskusji wyników opublikowanych w załączonych pracach.

W pracach opublikowanych w *Journal of Biological Chemistry* i *Scientific Reports*, oprócz doktorantki współautorami jest jeszcze 9 osób, a w pozostałych dwóch pracach po pięć. W każdej z załączonych prac doktorantka jest pierwszym autorem. Ponieważ załączone publikacje są wieloautorskie integralną częścią pracy doktorskiej są oświadczenia doktorantki i współautorów o wkładzie pracy w każdą z załączonych publikacji. Zamieszczone oświadczenia wyraźnie ukazują, że doktorantka wykonała samodzielnie niemal wszystkie prace doświadczalne, a więc: prowadzenie hodowli komórkowych, oczyszczanie RNA, prowadzenie ilościowej reakcji RT-PCR, wykrywanie białek metodą Western, ocenę liczby lizosomów, ocenę żywotności i potencjału migracyjnego komórek oraz analizę cyklu komórkowego. Doktorantka samodzielnie analizowała także dane mikromacierzowe i wykonywała analizy ontologii genów różnicujących oraz miała znaczący udział w przygotowywaniu publikacji. Udział współautorów, samodzielnych pracowników nauki, to głównie opracowywanie założeń i koncepcji badawczych, nadzór nad realizacją projektów oraz pisanie manuskryptów prac. Udział innych pracowników zespołu ograniczał się do pomocy doktorantce w wykonaniu niektórych doświadczeń, głównie pomiaru kinetyki syntezy glikozaminoglikanów i oznaczeniu ich poziomu w lizosomach, a także w wykonaniu analizy z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Z załączonych oświadczeń wynika zatem, że doktorantka jest nie tylko pierwszym, ale i głównym autorem prac będących podstawą rozprawy doktorskiej.

Problematyka załączonych prac mieści się w nurcie badań prowadzonych od wielu lat przez zespół, z którym doktorantka współpracuje. Dalekosiężnym celem tych badań jest zastosowanie flawonoidów w leczeniu lub wspomaganiu leczenia chorób spichrzeniowych. Możliwość taka pojawiła się gdy wykazano, że genisteina ma właściwość obniżania *in vitro* poziomu mukopolisacharydów, a późniejsze wieloletnie obserwacje kliniczne wskazały, że podawanie tego izoflawonoidu może obniżyć poziom nieprawidłowych mukopolisacharydów



i łagodzić patologiczne objawy towarzyszące mukopolisacharydozie typu III. Mechanizmy obniżania poziomu mukopolisacharydów przez genisteinę (a także inne flawonoidy) nie były znane, stąd naturalne dążenie do ich poznania, między innymi poprzez uzyskiwanie informacji o zmianach transkryptomu i proteomu, jakie zachodzą w komórkach pod wpływem badanych związków.

Jedną z najpoważniejszych trudności w precyzowaniu mechanizmów działania genisteiny i innych flawonoidów w odniesieniu do określonego procesu komórkowego jest ich wielokierunkowe działanie. W przypadku genisteiny, bodaj najpełniej przebadanego izoflawonoidu pod kątem możliwych zastosowań terapeutycznych, i która bez wątpienia hamuje cykl komórkowy, hamuje aktywność kinaz tyrozynowych i topoizomerazy II oraz działa jako SERM (ang. *Selective Estrogen Receptor Modulator*), wykryto dziesiątki potencjalnych celów molekularnych. Należy także pamiętać, że efekt i kierunek działania związków z grupy flawonów może znacząco zależeć od ich stężenia, a zatem w znacznym stopniu od biodostępności i właściwości farmakokinetycznych.

Powyższe uwarunkowania i ograniczenia możliwych zastosowań terapeutycznych flawonoidów są oczywiście dobrze znane doktorantce i w gruncie rzeczy to one w znacznym stopniu zadecydowały o kierunku badań, opisanych w pracy doktorskiej. Jeśli bowiem zamierza się uzyskać możliwość sterowania poziomem ekspresji wąskiej grupy genów poprzez podawanie wytypowanych związków, zatem rozsądne jest uzyskanie wiedzy o tym, w jaki sposób interesujące nas związki wpływają na poziom aktywności także innych genów i na przebieg rozmaitych ścieżek sygnałowych, co powinno ułatwić opracowanie racjonalnej strategii terapeutycznej.

Zgodnie z wyrażonym w pracy doktorskiej celem, badania prowadzono na fibroblastach skóry osób dorosłych, jako modelowych komórkach niezmienionych chorobowo. Ponadto, w niektórych doświadczeniach do analizy włączono fibroblasty skóry pobrane od dzieci chorych na mukopolisacharydozę typu II oraz komórki nowotworowe linii HeLa i modyfikowane genetycznie embrionalne fibroblasty myszy. Podstawowe dane o poziomie transkryptów doktorantka uzyskiwała w wyniku prowadzenia badań mikromacierzowych, a najistotniejsze wyniki weryfikowała z zastosowaniem ilościowej reakcji RT-PCR. Aby ocenić wpływ genisteiny, daidzeiny i kemferolu na poziom transkrypcji genów, badane związki stosowano w stężeniach 30  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ , eksponując komórki na wymienione flawonoidy do 48 godzin, a w niektórych przypadkach do 72 godzin. Oprócz oznaczenia globalnej ekspresji genów, bardziej szczegółowej analizie poddawała doktorantka zmiany ekspresji genów metabolizmu glikozaminoglikanów, sfingolipidów i genów związanych z biogenezą lizosomów. Za znaczącą zmianę poziomu transkrypcji doktorantka przyjmowała (na ogół) co najmniej dwukrotny wzrost lub spadek poziomu transkryptów w odniesieniu do nietraktowanych komórek kontrolnych. Analizy ontologiczne genów różnicujących wykonywała z zastosowaniem właściwych narzędzi bioinformatycznych.

W chronologicznym ujęciu, w pierwszej pracy (*The Phytoestrogen Genistein Modulates Lysosomal Metabolism and Transcription Factor EB (TFEB) Activation*) doktorantka wykazała, że traktowanie fibroblastów genisteiną powodowało, w zależności od dawki i czasu ekspozycji



komórek na ten izoflawonoid, zmianę poziomu ekspresji setek genów, przy czym około 300 uległo aktywacji, a około 370 represji. Spośród 69 genów wskazanych jako mających związek z syntezą glikozaminoglikanów 19 ulegało pod wpływem genisteiny znacznie zmienionej ekspresji. Najważniejszą, istotną z terapeutycznego punktu widzenia, obserwacją doktorantki było wykazanie, że genisteina może stymulować ekspresję genów zaangażowanych w degradację GAG.

W drugiej części wymienionej pracy doktorantka charakteryzowała wzór ekspresji czynnika transkrypcyjnego TFEB, głównego regulatora ekspresji genów zaangażowanych w biogenezę autofagolizosomów, lizosomów, lizosomalną egzocytotę i metabolizm lipidów. Stosując szereg podejść doświadczalnych (reakcję qRT-PCR, analizę ekspresji genów w embrionalnych fibroblastach myszy, u których jeden allel genu TFEB został zastąpiony transgenem zawierającym gen  $\beta$ -galaktozydazy pod kontrolą promotora TFEB, interferencję RNA i inne) doktorantka wykazała, że genisteina stymulowała ekspresję genu kodującego TFEB, nasilała translokację TFEB do jądra komórkowego modulując aktywność genów zależnych od tego czynnika transkrypcji, a także zwiększała liczebność lizosomów. Analiza bioinformatyczna ujawniła, że potencjalnie promotorowe regiony większości spośród genów związanych z biogenezą i funkcją lizosomów (ale także wiele innych genów) zawierają co najmniej jedną sekwencję regulacyjną „cis” nazywaną CLEAR (ang. *Coordinated Lysosomal Expression And Regulation*) mogącą oddziaływać z TFEB. Doktorantka wskazała zatem, że poziom transkrypcji wielu genów może być potencjalnie modulowany przez genisteinę.

W drugiej, w chronologicznym ujęciu, pracy: („*Modulation of expression of genes involved in glycosaminoglycan metabolism and lysosome biogenesis by flavonoids*”) doktorantka wykazała, że nie tylko genisteina, ale także kemferol i daidzeina modulują ekspresję genów związanych z biosyntezą i degradacją glikozaminoglikanów. Jak wykazała doktorantka najsilniejsze działanie hamujące biosyntezę GAG wykazywała genisteina i kemferol, a także ich mieszanina. Stosując testy długoterminowe (do 10 dni) doktorantka wykazała, że daidzena, mimo, iż nie hamowała syntezy GAG, powodowała, że ich poziom obniżał się, co wskazuje że flawonoidy mogą modulować poziom GAG poprzez różne mechanizmy.

Z kolei analiza transkryptomyczna wykazała, że liczba genów, których aktywność uległa zmianie pod wpływem kemferolu lub mieszaniny kemferolu i genisteiny była znacznie wyższa niż w komórkach traktowanych tylko samą genisteiną. Analiza wyników mikromacierzowych i ich weryfikacja metodą qRT-PCR pozwoliła doktorantce na ustalenie podobieństw i różnic w zmianach ekspresji kilkudziesięciu genów zaangażowanych w metabolizm GAG i w biogenezę lizosomów, a także zmian w transkrypcji genu kodującego czynnik TFEB. Doktorantka nie wykazała jednak, aby badane flawonoidy wywoływały istotne różnice w ekspresji genów w fibroblastach skóry dorosłych, zdrowych osób w porównaniu do fibroblastów pobranych od dzieci chorych na mukopolisacharydozę typu II.

Trzecią, w chronologicznym ujęciu, pracę („*Activities of genes controlling sphingolipid metabolism in human fibroblasts treated with flavonoids*”) doktorantka poświęciła wyekstrahowaniu z danych otrzymanych z globalnej analizy ekspresji genów informacji o zmianach poziomu ekspresji genów związanych z metabolizmem glikosfingolipidów (GSL) w fibroblastach ludzkich hodowanych w obecności genisteiny i kemferolu. Doktorantka wykazała, że jeśli komórki traktowano najwyższymi stosowanymi stężeniami kemferolu przez 48 godzin, to



spośród 121 genów związanych z metabolizmem GSL znaczące zmiany zachodziły w przypadku 29 genów (19 – wzrost ekspresji, 10 - obniżenie ekspresji), Zasadniczą obserwacją z wykonanych badań jest to, że spośród genów, których ekspresja jest modulowana przez użyte związki, poziom transkrypcji mniej więcej połowy ulega obniżeniu, a połowy podwyższeniu, co powoduje, że wyjaśnienie ostatecznego, wypadkowego efektu działania flawonów na metabolizm glikosfingolipidów wymaga dalszych badań.

Czwartą, w chronologicznym ujęciu, i ostatnią załączoną pracę (*"Effects of flavonoids on expression of genes involved in cell cycle regulation and DNA replication in human fibroblasts"*) poświęciła doktorantka analizie zmian poziomu ekspresji genów istotnych dla regulacji cyklu komórkowego w fibroblastach traktowanych różnymi dawkami genisteiny, kemferolu, daidzeiny. Jak wykazała, wymienione związki powodują zmiany w ekspresji około 200 genów związanych z regulacją cyklu komórkowego i replikacji, przy czym głównie obniżają poziom transkrypcji wymienionych genów. Zgodnie ze znanymi właściwościami genisteiny związek ten blokował cykl komórkowy głównie w fazie G2/M. Oceniając cytotoksyczność metodą MTT, doktorantka wykazała, że fibroblasty skóry są stosunkowo odporne na działanie genisteiny w stężeniach stosowanych w powyższych badaniach (do 100  $\mu\text{M}$ ).

Praca doktorska mgr Marty Moskot jest pierwszym i jednocześnie bardzo obszernym badaniem mikromacierzowym skierowanym na poznanie zmian transkryptomu w fibroblastach ludzkich pod wpływem genisteiny kemferolu i daidzeiny, flawonoidów o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym w niektórych schorzeniach. Materiał doświadczalny zawarty w publikacjach będących podstawą pracy doktorskiej jest olbrzymi, stąd wyniki badań transkryptomicznych znacznie poszerzą bazy danych gromadzące informacje o wpływie związków naturalnych, a w szczególności flawonoidów na procesy komórkowe. Poza uzyskaniem ogólnych informacji o globalnych zmianach ekspresji genów w fibroblastach skóry, jakie zachodzą w wyniku hodowli tych komórek w obecności genisteiny kemferolu i daidzeiny w dawkach do 100  $\mu\text{M}$  i czasie do 48 godzin, doktorantka uzyskała szczegółowe, pogłębione dane opisujące zmiany ekspresji genów kodujących białka biorące udział w biogenezie lizosomów oraz metabolizmie glikozaminoglikanów i glikosfingolipidów, a także genów związanych z regulacją cyklu komórkowego w fibroblastach.

Do najważniejszych wyników szczegółowych należy zaliczyć wykazanie przez doktorantkę istnienia istotnych różnicowań efektu działania badanych flawonoidów oraz wykazanie, że w niektórych przypadkach można oczekiwać wzmocnienia efektu terapeutycznego, ponieważ w tych samych warunkach można, stosując niektóre flawonoidy, obniżyć poziom transkrypcji genów białek ulegających patologicznemu spichrzeniu, a jednocześnie zwiększyć poziom transkrypcji genów kodujących białka zaangażowane w degradację tych makrocząsteczek. Innym ważnym wynikiem jest uzyskanie ważnych danych dotyczących regulacji ekspresji czynnika transkrypcyjnego TFEB i genów będących pod jego kontrolą.

Doktorantka prowadziła badania z zastosowaniem nowoczesnych metod doświadczalnych i bioinformatycznych. Wyniki badań zostały klarownie zaprezentowane środowisku naukowemu i trudno jest mieć jakieś zasadnicze zastrzeżenia do prac poddanych



już solidnej, merytorycznej recenzji, zatem pozwolę sobie jedynie na kilka uwag mających pewien związek z pracą doktorską, ale nie wpływających na jej ocenę.

[1]. W pracy doktorskiej, zarówno w streszczeniu jak i załączonych publikacjach brak jest poszerzonej dyskusji o potencjalnych zastosowaniach terapeutycznych badanych flawonoidów, w kontekście danych o toksyczności i biodostępności tych związków. W zdecydowanej większości prac opisujących wpływ flawonoidów na rozmaite procesy komórkowe stosowano i nadal stosuje się stosunkowo duże stężenia badanych związków. W krytycznych opracowaniach dotyczących dawek genisteiny (i innych izoflawonów) podkreśla się, że uzyskanie w surowicy wyższego stężenia genisteiny niż  $30 \mu\text{M}$  jest w zasadzie niemożliwe i sugeruje się nawet, aby badając efekty biologiczne genisteiny w doświadczeniach *in vitro* nie stosować stężeń genisteiny wyższych niż  $5 \mu\text{M}$ .

W doświadczeniach wykonywanych w ramach pracy doktorskiej znaczący wpływ na proces transkrypcji doktorantka obserwowała dopiero dla stężeń  $60 \mu\text{M}$  i  $100 \mu\text{M}$ , natomiast przy  $30 \mu\text{M}$  zmiany były niewielkie lub w przypadku genów związanych z metabolizmem GAG, czy genów mających wpływ na cykl komórkowy, niewidoczne. Jak zatem można powiązać ze sobą: i. dane o biodostępności, ii. pojawianie się *in vitro* pożądaných zmian ekspresji genów zasadniczo dopiero w obecności wysokich stężeń flawonoidów, iii. obserwowane w badaniach klinicznych zachęcające efekty terapeutyczne genisteiny (przynajmniej w stosunku do chorych zespołem Sanfilippo)?

[2]. Jakkolwiek doktorantka wykazała, że genisteina nie jest nadmiernie toksycznym związkiem dla fibroblastów skóry to jednak, na co wskazują dane z piśmiennictwa, może w tych samych stężeniach powodować śmierć neuronów. Jeśli myśli się o zastosowaniu genisteiny (i innych flawonoidów) jako cytostatyku, np. jako leku przeciwnowotworowego, to problem toksyczności nie musi być znaczącą przeszkodą. Jeśli jednak genisteina, bądź inne flawonoidy miałyby być użyte jako modulatory ekspresji genów w komórkach nienowotworowych, to problem toksyczności staje się istotny, bowiem chodzi oczywiście o to aby podawane związki nie wywoływały niepożądanych skutków ubocznych. W tym też kontekście bardziej informatywnym testem badania cytotoxyczności niż MTT mógłby być długoterminowy test klonogeny.

[3]. We wszystkich publikacjach stanowiących podstawę pracy doktorskiej podstawowym materiałem do badań mikromacierzowych był RNA izolowany z fibroblastów traktowanych genisteiną bądź innymi flawonoidami, a analizy transkryptomyczne wykonywane były na macierzach BeadChips. Czy w przypadku każdej publikacji wykonywała doktorantka odrębne serie badań, czy też - jeśli to było możliwe - korzystała z surowych danych uzyskanych w wyniku analizy wykonanej we wcześniejszych publikacjach?

[4]. Czy doktorantka próbowała wykorzystać otrzymane, własne dane w szerszym kontekście? W piśmiennictwie można znaleźć szereg prac, w których badania mikromacierzowe stosowano do badania zmian ekspresji genów pod wpływem genisteiny w komórkach nowotworowych. Czy doktorantka próbowała porównywać zmiany w ekspresji genów związanych z metabolizmem GAG, syntezą glikosfingolipidów oraz biogenezą liposomów pomiędzy prawidłowymi fibroblastami i komórkami nowotworowymi?

Przytoczone powyżej uwagi i pytania, jak już wspomniałem, odnoszą się jedynie pośrednio do pracy doktorskiej i nie wpływają na ocenę rozprawy. W bezpośrednim

odniesieniu do tekstu pracy, chciałbym jedynie zwrócić uwagę, że u dołu strony 13 rozdziału „Streszczenie” znajduje się niefortunnie sformułowane zdanie: „Odkrycie to stanowiło istotny etap prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy badań i wskazywało na rolę genisteiny i kemferolu w procesie biogenezy i funkcji lizosomu”. Chodzi oczywiście o to, że wymienione związki mogą modulować proces biogenezy. Ponadto wydaje mi się, że w tytuł rozprawy mógłby być uściślony poprzez dodanie „wybranych” flawonoidów.

W podsumowaniu oceny stwierdzam, że moim zdaniem rozprawa doktorska mgr Marty Moskot całkowicie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ustawy o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 (Dz.U. nr 65. poz.595) z późniejszymi zmianami (Dz.U. nr 84 poz. 455). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie doktorantki mgr Marty Moskot do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, oceniając wysoko wartość merytoryczną rozprawy, oraz biorąc pod uwagę, że wyniki zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, a także uwzględniając możliwe implikacje praktyczne wyników badań doktorantki, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Gliwice, 1 grudnia 2015.



Prof. dr hab. Zdzisław Krawczyk

e-mail: [krawczyk@io.gliwice.pl](mailto:krawczyk@io.gliwice.pl)