



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD BIOLOGII KOMÓRKI

KIEROWNIK ZAKŁADU

PROF. DR HAB. ZBIGNIEW MADEJA

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Poświaty pt. „The interactome of AXL receptor provides insights into its biological roles and intracellular trafficking”

Według najbardziej klasycznej definicji endocytoza to proces wprowadzania do wnętrza komórki ze środowiska zewnętrznego różnych substancji przez wpuklenie błony komórkowej i utworzenie pęcherzyków zwanych endosomami. Ponieważ jednak proces ten dotyczy również wprowadzania do komórki aktywowanych związaniem odpowiedniego liganda receptorów błonowych odpowiedzialnych za przebieg różnych procesów komórkowych, zaczęto wiązać endocytozę z sygnalizacją komórkową. Początkowo zakładano, że związek ten polegać może głównie na usuwaniu aktywowanych receptorów z błony komórkowej i zakończenie przesyłania sygnału przez degradację kompleksu receptor-ligand. Szybko jednak okazało się, że sprawa jest znacznie bardziej złożona ponieważ czasami receptor nie ulega degradacji a w zamian następuje jego recykling do błony komórkowej. Co więcej stwierdzono również, że rozpoczęte w błonie komórkowej procesy przesyłania sygnału są kontynuowane także po internalizacji kompleksu ligand-receptor w procesie endocytozy. Odkrycia te były bardzo interesujące ponieważ rzucały nowe światło na znane zjawisko wielkiej różnorodności w przebiegu sygnalizacji od tego samego typu receptora w zależności od rodzaju komórki oraz jej stanu fizjologicznego. Mechanizm taki stwarzał bowiem możliwość dodatkowej regulacji przesyłania sygnału poprzez chociażby wydłużenie czasu jego trwania oraz poprzez wpływ na umiejscowienie sygnału w komórce. Z tego względu badania dotyczące mechanizmów endocytozy receptorów błonowych wydają się być niezwykle istotne. Jedną z receptorowych kinaz tyrozynowych, o której mechanizmach endocytozy niewiele wiadomo jest kinaza AXL. Dodatkowo niewiele wiadomo na temat białek oddziaływujących z kinazą AXL. Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy właśnie identyfikacji białek oddziaływujących z AXL oraz scharakteryzowania mechanizmów endocytozy tego receptora. Temat pracy wydaje się bardzo interesujący od strony naukowej i jego podjęcie jest jak najbardziej uzasadnione. Dodatkowo należy wspomnieć, że praca została wykonana w Zespole mającym olbrzymie doświadczenie w tego rodzaju badaniach.

UL. GRONOSTAJOWA 7

30-387 KRAKÓW

TEL. +48 (12) 664 61 42, FAX: +48 (12) 664 62 09

EMAIL:Z.MADEJA@UJ.EDU.PL

Przedstawiona do oceny praca doktorska została napisana w języku angielskim i liczy 127 stron maszynopisu. W tekście zamieszczono 40 rycin, 15 tabel i cytowano 431 pozycji literaturowych. Rozprawa doktorska Pani Agaty Poświaty ma typowy dla tego typu opracowań układ i składa się z następujących rozdziałów: spis używanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski, perspektywy na przyszłość, literatura, lista publikacji Doktorantki oraz materiały dodatkowe na płycie CD. W zwięzłym 19 stronicowym wstępie Autorka przedstawiła starannie przygotowany zestaw informacji ułatwiający czytelnikowi zrozumienie całości pracy. W pierwszej części wstępu Doktorantka omawia rodzinę receptorowych kinaz tyrozynowych TAM, ze szczególnym uwzględnieniem kinazy AXL. Drugą część stanowi omówienie najważniejszych informacji dotyczących procesu endocytozy a zwłaszcza jej roli w regulacji przesyłania sygnału od receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej i roli tych procesów w powstawaniu nowotworów. Wstęp napisany jest przejrzysto i dobrze wprowadza czytelnika do zagadnień będących przedmiotem pracy doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje staranny dobór najważniejszych informacji bez przeładowania zbędnymi szczegółami co powoduje, że tekst czyta się bardzo dobrze i jasno prowadzi on do przedstawienia szczegółowych celów pracy. Prosiłbym jednak o odniesienie się Doktorantki do dwóch kwestii. Na samym początku wstępu (str. 15) Autorka pisze, że nadekspresja kinaz TAM nie wykazuje potencjału onkogennego. Jednak kilka linijek dalej podaje informację, że jeden z przedstawicieli tej rodziny, AXL, wykazuje aktywność transformującą w odniesieniu do komórek NIH3T3. Jak należy rozumieć tę rozbieżność? Interesujące również byłoby dla mnie rozwinięcie tematyki wpływu AXL na aktywność migracyjną komórek a szczególnie rola tego receptora w bezpośredniej aktywacji maszynerii molekularnej komórki odpowiedzialnej za generowanie ruchu, np. kluczowych w tym procesie małych białek G z rodziny Rho. Jak to wydaje się wynikać z tekstu, obserwowany efekt jest raczej wynikiem działań pośrednich jak np. indukcja EMT. Informacje te byłyby bardzo interesujące w szczególności w kontekście innej pracy Zespołu (PNAS, 2021), której współautorką jest Doktorantka, a o której wspomniane jest więcej dopiero w dyskusji i rozdziale poświęconym dalszym planom i perspektywom na przyszłość.

W rozdziałach opisujących stosowane materiały i metody Autorka zawiera wyczerpujące informacje dotyczące stosowanych metod eksperymentalnych oraz wykorzystanego materiału biologicznego. W swoich badaniach Doktorantka wykorzystwała

szereg metod biochemicznych, biologii molekularnej i biologii komórki, które są bez wątplenia właściwe do rozwiązania problemu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej. Opis stosowanych metod jest jasny i dokładny, stwarzający możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń.

W rozdziale „Wyniki” Autorka przedstawiła główne osiągnięcia swoich badań. Najważniejsze obserwacje poczynione przez Autorkę to przede wszystkim identyfikacja, dzięki zastosowaniu metody BioID, szeregu białek wchodzących w interakcję z receptorem AXL, odpowiedzialnych m.in. za regulację cytoszkieletu aktynowego, aksonogenezę, organizację połączeń międzykomórkowych, przekazywanie sygnału oraz zaangażowanych w proces endocytozy. Ta ostatnia obserwacja, wskazująca na istotną rolę endocytozy dla funkcjonowania receptora AXL, była podstawą dalszych badań charakteryzujących endocytozę indukowaną aktywacją receptora AXL. W szeregu bardzo dobrze zaplanowanych eksperymentów Autorka wykazała, że stymulacja komórek ligandem receptora AXL, białkiem GAS6, indukuje szybkie pobieranie kompleksu ligand/receptor przez komórki na drodze endocytozy zarówno zależnej jak i niezależnej od klatryny. Jednakże indywidulane hamowanie poszczególnych ścieżek endocytarnych nie prowadziło do całkowitego zahamowania endocytozy. Jedynie zablokowanie 2 ścieżek powodowało częściowe zmniejszenie pobierania kompleksów GAS6-AXL. Co ciekawe, całkowite zahamowanie procesu endocytozy można było uzyskać jedynie poprzez zahamowanie aktywności kinazowej receptora AXL. Do najciekawszych obserwacji dokonanych w pracy można niewątpliwie zaliczyć stwierdzenie, że internalizacja receptora AXL zachodzi znacznie szybciej niż takich receptorów jak EGFR czy PDGFR β i internalizowany AXL nie jest degradowany lecz prawdopodobnie ulega procesowi recyklingu do błony komórkowej co może być jedną z przyczyn obserwowanej przedłużonej sygnalizacji aktywowanego receptora AXL.

Reasumując, Autorka otrzymała oryginalne, interesujące i spójne wyniki jednoznacznie identyfikujące białka współdziałające z aktywowanym receptorem AXL oraz opisała po raz pierwszy mechanizmy endocytozy tego receptora i przedstawiła przesłanki wskazujące na znaczenie tego procesu w sygnalizacji od tego receptora.

Lektura tej bardzo interesującej części pracy nasunęła mi kilka uwag i pytań o ustosunkowanie się do których chciałbym prosić Doktorantkę:

1/ Czy możliwe jest precyzyjniejsze zdefiniowanie terminów „proximal protein” i „distal protein” w metodzie BioID?

2/ Aktywność biologiczna białka GAS6 określana przez fosforylację AXL (Fig. 4.2) była zauważalna przy stężeniu 100 ng/ml. O ile dobrze się doczytałem w większości doświadczeń stosowano stężenie GAS6 w wysokości 400 ng/ml. Jakie jest stężenie białka GAS6 w surowicy i jaki jest zakres stężeń tego białka stosowany w różnych badaniach *in vitro*?

3/ Autorka słusznie podkreśla duże podobieństwo w funkcjach biologicznych zidentyfikowanych białek wchodzących w interakcję z aktywowanym receptorem AXL pomiędzy komórkami LN229 i HEK293. Pewne różnice jednak istnieją. Czy można pokusić się o próbę powiązania tych różnic z pochodzeniem/funkcjami tych różnych komórek?

4/ Czy w badaniach innych zespołów stwierdzających, że GAS6 może wiązać się ze wszystkimi receptorami TAM, stwierdzono jakąś aktywność biologiczną w wyniku aktywacji receptora czy wykazywano jedynie fizyczne wiązanie liganda do receptorów?

5/ W wynikach przedstawionych na rycinie 4.16 wyraźnie widać spadek poziomu endocytozy po 30 min od stymulacji. Czy wiadomo po jakim czasie system powraca do stanu wyjściowego, tzn. stanu w którym można po stymulacji zaobserwować indukcję endocytozy po 5 min? Dodatkowo byłbym zainteresowany opinią Doktorantki dotyczącą biologicznego znaczenia obserwowanych różnic w kinetyce przebiegu endocytozy w czasie stymulacji komórek różnymi czynnikami.

6/ Na rycinie 4.20 przedstawiono wyniki kolokalizacji receptora AXL i białek CLC lub PICALM w 1 i 5 min od stymulacji. Jaki był wynik tego eksperymentu po 10 min od stymulacji? Ponieważ rejestracja była wykonywana przez 10 min takie dane powinny być dostępne.

Całość pracy pod względem sposobu prezentacji wyników jest bardzo dobrze przemyślana i ułatwia czytelnikowi zrozumienie prowadzonych badań. Z jednym wyjątkiem. Wydaje mi się, że wielkość prezentowanych zdjęć mikroskopowych powinna być zdecydowanie większa. O ile małe rozmiary rycin są zrozumiałe w pracach w czasopiśmie naukowych gdzie konieczne jest ograniczenie miejsca, o tyle w przypadku pracy doktorskiej takiego ograniczenia nie ma. Oczywiście korzystając z wersji elektronicznej można sobie

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII UJ

dowolnie powiększać zdjęcia jednak przy wersji drukowanej jest to pewien kłopot. Tym bardziej, że akurat dokumentacja fotograficzna jest na bardzo dobrym poziomie i pięknie potwierdza wnioski płynące z innych doświadczeń.

W 10 stronicowym rozdziale „Dyskusja” Autorka krytycznie i ostrożnie ocenia własne wyniki na tle danych literaturowych. W rozdziale „Wnioski” przedstawiono główne osiągnięcia badawcze i konkluzje płynące z przeprowadzonych badań. Rozprawę kończy krótki rozdział, w którym Autorka opisuje możliwe kierunki rozwoju rozpoczętych badań.

Przedstawione tutaj uwagi i pytania w żadnym stopniu nie wpływają na jak najbardziej pozytywną ocenę całej pracy doktorskiej. Wręcz przeciwnie, świadczą o tym, że pracę czyta się z dużym zainteresowaniem a otrzymane wyniki są zachętą do stawiania wielu nowych pytań. Pani mgr Agata Poświata jest ponadto współautorką 3 prac eksperymentalnych opublikowanych w wyśmienitych czasopismach (PNAS, Molecular Cancer Research i Cellular and Molecular Life Sciences). W części tych publikacji wykorzystano wyniki prezentowane w ocenianej pracy doktorskiej. Prace te chociaż opublikowane w okresie ostatniego roku były już 7-krotnie cytowane w literaturze światowej.

Podsumowując, zarówno dorobek naukowy jak i rozprawę doktorską Pani mgr Agaty Poświaty oceniam bardzo wysoko. W moim przekonaniu Autorka uzyskała wartościowe, stanowiące nowość naukową wyniki, które otwierają szerokie perspektywy badawcze na przyszłość. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Agaty Poświaty przez Wysoką Radę Naukową Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o rozważenie możliwości wyróżnienia ocenianej pracy.



(Zbigniew Madeja)



Dr hab. Joanna Kamińska
Pracownia Genetyki i Biologii Molekularnej Drożdży
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
02-106 Warszawa; ul. Pawińskiego 5a

Warszawa, 30.06.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr. Agaty Poświaty zatytułowanej: „The interactome of AXL receptor provides insights into its biological roles and intracellular trafficking.”

Przedstawiona do recenzji praca wykonana została w Pracowni Biologii Komórki Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej. Promotorem pracy jest Pani prof. dr hab. Marta Miączyńska, a promotorem pomocniczym Pani dr Daria Zdżalik-Bielecka.

Pracownia prof. Miączyńskiej od lat zajmuje się procesami transportu wewnątrzkomórkowego, szczególnie zaś opisywaniem wpływu endocytozy na wewnątrzkomórkową transdukcję sygnału z receptorów błony komórkowej. Przez długi czas endocytoza była postrzegana jako mechanizm zakończenia przekazywania sygnału przez redukcję poziomu receptorów na powierzchni komórki i ich degradację. Natomiast dane, uzyskane, również w pracowni Prof. Miączyńskiej, wykazały, że endocytoza nie zakańcza transdukcji sygnału i kolejne przedziały komórkowe, endosomy, również odgrywają ważną rolę w przekazywaniu sygnałów wpływając na transport kompleksów ligand-receptor i na aktywność receptorów wewnątrz komórki. Rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Poświaty dotyczy charakterystyki receptorowej kinazy tyrozynowej, białka Axl należącego do rodziny TAM (od pierwszych liter nazw receptorów z tej rodziny TYRO3, Axl, Mer). Działanie receptorów TAM różni się od działania innych receptorowych kinaz. Jak wykazały badania na myszach nie odgrywają one istotnej roli na wczesnych, embrionalnych etapach rozwoju organizmu, natomiast są potrzebne w zróżnicowanych już tkankach. Dane literaturowe opisują ich udział min. w usuwaniu komórek obumarłych na drodze apoptozy, które mają na swojej błonie komórkowej fosfatydyloserynę. Obecność receptorów TAM jest więc potrzebna do utrzymania homeostazy tkankowej, szczególnie ich rola uwidacznia się w układzie rozrodczym, nerwowym i immunologicznym. Najwięcej danych dotyczących receptora Axl jest w odniesieniu do jego udziału w progresji różnych typów nowotworów, we wnikaniu wirusów i w powiązaniu z chorobami autoimmunologicznymi. Ze względu na zwiększoną aktywność receptora Axl w wielu typach nowotworów istotnym jest poznanie mechanizmów prowadzących do jego aktywacji i inaktywacji. W związku z tym Pani mgr Agata Poświata podjęła się identyfikacji białek oddziałujących z receptorem Axl, oceniła jego udział w wychwycie białka GAS6, liganda dla receptorów z rodziny TAM, oceniła udział aktywności domeny kinazowej receptora Axl w jego endocytozie indukowanej ligandem,

scharakteryzowała kinetykę internalizacji kompleksu ligand–receptor (GAS6-Axl) oraz zidentyfikowała szlaki endocytarne uczestniczące w internalizacji kompleksów GAS6-Axl.

Część eksperymentalną Doktorantka poprzedziła wstępem związanym z tematyką pracy i obejmującym dwa zagadnienia. Pierwsza część to charakterystyka rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych TAM z rozbudowanym fragmentem dotyczącym kinazy Axl. Drugą częścią jest opis procesu endocytozy, różnych ścieżek molekularnych tego procesu tj. endocytozy zależnej od klatryny i różnych typów od niej niezależnych. Ukazane zostało znaczenie endocytozy w procesie regulacji przekazywania sygnału przez receptorowe kinazy tyrozynowe, a także jej udział w karcynogenezie. Do tej części rozprawy mam niewiele uwag. Dotyczą one rozdziału 1.4.1.2.6 z opisem endocytozy zależnej od endofilin w którym pojawia się dużo szczegółów, a które nie zostały dobrze wprowadzone jak GSK3 β i CDK5 oraz ścieżka SLIT-ROBO.

Drugi rozdział przedstawia cel pracy jakim było zidentyfikowanie białek oddziałujących z receptorem Axl oraz charakterystyka ścieżki endocytozy tego receptora jako istotnych podstaw do opracowania między innymi terapii nowotworów, gdyż nadprodukcja receptora Axl koreluje ze złą prognostyką leczenia, metastazą i nabywaniem odporności na chemioterapię przez komórki rakowe. Do realizacji tego celu zastosowane zostały różnorodne metody badawcze od metod inżynierii genetycznej, przez produkcję rekombinowanych białek, analizę Western blot i hodowle komórkowe, metody mikroskopowe, bioinformatyczne, statystyczne. Zostały one opisane szczegółowo w kolejnym rozdziale Materiały i Metody.

Rozdział 4 zawiera wyniki dotyczące dwóch wspomnianych wcześniej wątków badawczych. W pierwszej części Doktorantka opracowała dwa układy doświadczalne, które pozwolił jej na identyfikację białek oddziałujących z receptorem Axl przed i po indukcji ligandem GAS6. Układy te to dwie linie komórkowe: linia embrionalna HEK293 i linia LN229 z glejaka do których wprowadziła plazmid z genem kodującym białko Axl w fuzji z ligazą biotyny BirA* i epitopem HA. Zidentyfikowane w tych układach białka wiążące się do receptora Axl zostały pogrupowane wg. uczestnictwa w procesach lub wg. pełnionej funkcji, co wykazało, że znaczącą grupą białek oddziałujących z badanym receptorem stanowią m.in. białka zaangażowane w endocytozę. Ze względu na fakt, że nie było nic wiadomo o endocytozie receptora Axl drugą część pracy Doktorantka poświęciła charakterystyce endocytozy tego receptora w komórkach linii LN229. W tym celu przeprowadziła cykl doświadczeń w których stwierdziła że:

- 1) inkubacja komórek z białkiem GAS6 indukuje endocytozę Axl i GAS6
- 2) internalizacja GAS6 jest zależna od obecności receptora Axl, ale nie TYRO3, innego receptora z rodziny TAM;
- 3) kinazowa funkcja receptora Axl jest konieczna do jego internalizacji oraz internalizacji liganda, białka GAS6;
- 4) kinetyka endocytozy Axl różni się od kinetyki endocytozy dwóch innych receptorów dla epidermalnego czynnika wzrostu i płytkowego czynnika wzrostu, maximum internalizacji Axl jest obserwowane szybciej;
- 5) endocytoza Axl zachodzi na kilka sposobów tj. na drodze makropinocytozy, w sposób zależny od GTPazy Arf6 oraz na drodze nazwanej w skrócie CLIC/GEEC;

6) po internalizacji tylko część białka Axl trafia do wczesnych i późnych endosomów/ lizosomów i w związku z tym znacząca pula białka Axl nie ulega degradacji;

7) brak degradacji receptora Axl prowadzi do długotrwałego pobudzenia szlaku sygnałowego w którym działa kinaza Akt, regulująca wiele różnych funkcji komórkowych, w tym proliferację komórek, przeżycie oraz metabolizm.

Wyniki przedstawione w rozprawie zostały otrzymane w trakcie wielokrotnie powtórzonych eksperymentów, opracowane statystycznie i ładnie zaprezentowane graficznie. Ciąg tych eksperymentów przedstawiony jest logicznie i pracę bardzo dobrze się czyta.

Do przedstawionych wyników mam następujące uwagi i pytania:

- 1) W rozdziale 4.1.1 odwołanie do ryciny 4.2A jest w nieadekwatnym miejscu. Tekst bezpośrednio poprzedzający sugeruje, że we wspomnianym fragmencie ryciny jest schemat przedstawiający plazmid pcDNA3.1-GAS6-Myc-His, w rzeczywistości fragment ten przedstawia Western blot.
- 2) Przedstawiono na rycinie 4.2D, analizę poziomu fosforylacji Axl po dodaniu różnych ilości białka GAS6. Otrzymany wynik podsumowano zwięźle, że dodanie białka GAS6 indukuje tę fosforylację. W dalszych eksperymentach używano białka GAS6 do indukowania kinazowej funkcji receptora Axl, nie podano jednak dlaczego z wszystkich przetestowanych stężeń wybrano stężenie 400 ng/ml. Zabrakło mi tu odniesienia do relacji między stężeniem liganda a aktywnością receptora i stwierdzenia, że spośród testowanych wybrano najniższe stężenie GAS6 skutkujące maksymalną fosforylacją Axl.
- 3) W podrozdziale 4.1.2 nie opisano części ryciny 4.3A. Rycina ta przedstawia charakterystykę komórek używanych linii (HEK293 i LN229) pod względem obecności w nich białek receptorów TAM tj. białek TYRO3, Axl i Mer, natomiast tekst odnosi się tylko do obecności lub braku białka Axl. Dopiero w rozdziale 4.2.2 Doktorantka odnosi się do wyniku z tej ryciny.
- 4) Zauważyłam niejednolity system podpisu niektórych rycin np. 4.3D wraz z 4.3I opis dotyczący czasu po dodaniu GAS6 jest w innym stylu niż na rycinach 4.12A i 4.32.
- 5) Na rycinie 4.6 A nie ma wstawki z powiększeniem fragmentu zdjęcia jak to jest napisane w podpisie.
- 6) W rozdziale 4.1.4 podano w tekście, że 64 białka oddziaływały z Axl specyficznie w warunkach stymulacji komórek GAS6, zaś na diagramie na rycinie 4.8 jest podane 54. Co jest prawdą?
- 7) Na kolejnych rycinach, począwszy od ryciny 4.12, na których uwidaczniiano lokalizację GAS6 używając przeciwciał anti-myc powinien na zdjęciach z mikroskopu być podpis GAS6-Myc, a nie samo GAS6.
- 8) Rycina 4.13 – w podpisie jest o wyciszeniu z użyciem gNT#1 i gNT#2, ale brak przykładowych zdjęć mikroskopowych dla jednej z tych prób, jak to ma miejsce dla komórek zubożonych w *AXL* i *TYRO3*.
- 9) Nie całe zinternalizowane GAS6 współlokalizowało się z Axl, tylko ok. 70%. Gdzie znajduje się pozostałe 30% GAS6 – rycina 4.16D?
- 10) Doktorantka pokazała, że usunięcie genu *AXL* skutkuje brakiem internalizacji GAS6. Wyciągnęła z tego wniosek, że Axl jest podstawowym receptorem dla GAS6. Jest to

zgodne z wynikami zaprezentowanymi w pracy autorstwa Wen-I Tsou i wsp., z 2014 (doi: 10.1074/jbc.M114.569020). Jednak w przytoczonej pracy autorzy pokazali, że dodatek GAS6 jeżeli towarzyszy mu dodatek liposomów z fosfatydyloseryną, lub komórkami z fosfatydyloseryną na błonie komórkowej to GAS6 aktywuje również dwa pozostałe receptory z rodziny TAM. Zresztą brak mi odniesienia do przytoczonej pracy również w Dyskusji.

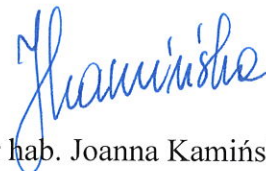
- 11) Czy na rycinach 4.22 i 4.23 siCLTC#1 i #2 to to co w opisie siCHC#1 i #2?
- 12) Endocytoza niezależna od klatryny nazwana w skrócie CLIC/GEEC jest zależna od aktyny. Doktorantka zauważa to i razem ze stwierdzeniem, że β -aktyna została znaleziona jako białko oddziałujące z Axl podaje jako jeden z argumentów, za sprawdzeniem czy endocytoza Axl zachodzi na tej drodze. Jednakże wg danych w tabeli 4.1 po inkubacji komórek linii LN229 z białkiem GAS6 receptor Axl nie oddziałuje z β -aktyną.

Kolejny rozdział 5 to Dyskusja. Autorka omówiła w nim wyniki obu części eksperymentalnych w odniesieniu do danych literaturowych, czy wyników zdeponowanych w dostępnych bazach danych oraz do wyników prac badawczych prowadzonych przez innych członków grupy. W moim odczuciu jest to najsłabsza część tej rozprawy. W części dotyczącej analizy oddziaływań receptora Axl zawartego w tabeli 4.1, zabrakło mi porównania (innego niż liczbowe) oddziaływań w komórkach linii LN229 do tych w komórkach linii HEK293, przykładowo odpowiedzi na pytanie z czego różnice w opisanych zbiorach mogą wynikać np. czy białka, które specyficznie oddziałują w komórkach LN229 ale nie oddziałują w HEK293, to takie które w linii HEK293 nie powstają. Przy analizowaniu wspomnianej tabeli uwagę moją zwróciły dwa białka, β -aktyna i łańcuch ciężki kinezy, białko KIF5b. Wspomniane białka oddziałują z Axl w badanych liniach komórkowych dokładnie odwrotnie tak w warunkach podania jak i bez podania liganda. Czy to może mieć jakieś znaczenie biologiczne? Mam też pytanie do Doktorantki. Bazując na danych dotyczących znaczenia receptora Axl w warunkach fizjologicznych czy potrafi przewidzieć jakie skutki uboczne może mieć stosowanie inhibitorów funkcji kinazy receptora Axl w leczeniu nowotworów, infekcji wirusowych? Takiej dywagacji zabrakło mi w Dyskusji. Chciałabym się też dowiedzieć jak białko Axl jest aktywowane w komórkach nowotworowych, szczególnie jakie jest powiązanie między uzyskaniem oporności na chemioterapię a indukcją receptora Axl.

W rozdziale Wnioski Autorka wypunktowała osiągnięcia swojej pracy, a w kolejnym przedstawiła perspektywy dalszych badań. Do pracy dołączona jest Bibliografia obejmująca imponującą listę 431 pozycji, spis prac ze współautorstwem Doktorantki oraz płyta CD z dodatkowymi materiałami.

W warstwie edytorskiej praca jest dopracowana. Pojedyncze błędy wspomniane wcześniej nie zmniejszają wartości rozprawy. Pomimo wymienionych uwag krytycznych uważam, że Autorka zaprojektowała i przeprowadziła szereg cennych eksperymentów poszerzających naszą wiedzę o regulacji i oddziaływaniach receptorowej kinazy tyrozynowej Axl. Dowodem na to jest fakt, że wyniki prac Autorki weszły w skład trzech prac eksperymentalnych opublikowanych w 2021 (PNAS) oraz w 2022 (Molecular Cancer Research i Cellular and Molecular Life Sciences). Wskazuje to na wysoki poziom prowadzonych przez Doktorantkę prac badawczych i ogrom włożonej pracy, dlatego uważam, że pracę można uznać za wyróżniającą się.

Podsumowując moja ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Poświaty jest pozytywna. Stwierdzam, że Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Składam więc wniosek Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie Pani mgr Agaty Poświaty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Joanna Kamińska

dr hab. Paweł Niewiadomski
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
ul. Banacha 2c pok. 02.104
02-097 Warszawa

Warszawa, 6.07.2022 r.

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Agaty Poświaty p.t.

„The interactome of AXL receptor provides insights into its biological roles and intracellular trafficking”

Z przyjemnością podjąłem się recenzowania pracy doktorskiej mgr Agaty Poświaty dotyczącej roli transportu wewnątrzkomórkowego w funkcji receptorowej kinazy tyrozynowej AXL. Białko AXL jest zaangażowane w fizjologiczne procesy związane z usuwaniem apoptotycznych komórek w procesie fagocytozy oraz modulowaniem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. W wielu nowotworach kinaza AXL pełni rolę inhibitora apoptozy, stymulatora proliferacji, a także wspomaga inwazję komórek nowotworowych poprzez zwiększanie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (ang. epithelial-mesenchymal transition; EMT). W związku z tym badania receptora AXL mogą być użyteczne nie tylko dla pogłębienia naszej wiedzy na temat receptorowych kinaz tyrozynowych, ale również jako przyczynek do projektowania nowatorskich terapii przeciwnowotworowych.

Jak wiele receptorów błonowych, białko AXL jest pod wpływem stymulacji ligandem internalizowane za pośrednictwem transportu pęcherzykowego. W swojej pracy mgr Poświata podjęła się zbadania regulacji receptora AXL w dwóch aspektach. W pierwszej części pracy zbadała interaktom AXL używając metody BioID i stwierdziła że wiele białek oddziałujących z białkiem AXL bierze udział w transporcie wewnątrzkomórkowym. W drugiej części skupiła się na konkretnych procesach transportowych i ich roli w internalizacji i funkcji kinazy AXL.

Praca napisana jest w języku angielskim i ma typowy układ charakterystyczny dla rozpraw doktorskich. We „Wstępie” doktorantka wyczerpująco opisuje receptor AXL, jego regulację, a także rolę w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Ponadto przedstawia proces endocytozy w jego różnych odmianach które zbadała w ramach swojego stażu doktorskiego. Wstęp jest napisany logicznie i przejrzystie i zawiera wszystkie informacje niezbędne do zrozumienia dalszych części pracy. Łatwo ze wstępu wydedukować przesłanki kierujące doktorantką przy wyborze przedmiotu badań. Wykazuje on jednoznacznie szeroką wiedzę doktorantki i jej sprawne poruszenie się w tematyce swojej pracy. Wstęp jest opatrzone atrakcyjnymi wizualnie i klarownymi rycinami.

„Cele pracy” są jasno opisane i zwięźle uzasadnione. W pełni zgadzam się z doktorantką co do wysokiej

wagi i oryginalności przedstawionej problematyki i uważam, że szczegółowe cele badawcze które sobie postawiła stanowią dobry przyczynek do zgłębienia tych zagadnień.

W „Materiałach i Metodach” doktorantka drobiazgowo opisuje wszystkie metody zastosowane w ramach jej pracy doktorskiej. Metody są bardzo bogate, a jednocześnie dobrane bardzo dobrze pod kątem celów pracy. Wśród nich znajdują się nowoczesne techniki, takie jak BioID oraz mutageniza CRISPR/Cas9. Opisy metod są wystarczające do powtórzenia jej badań przez nawet mało doświadczonego naukowca, co powoduje, że praca doktorska Pani mgr Poświaty może stanowić świetny zasób do wprowadzania stażystów oraz dyplomantów w metodologię stosowaną w laboratorium.

„Wyniki” podzielone są na dwie główne części. W pierwszej, składającej się z rozdziału 4.1, doktorantka opisuje badania proteomiczne mające na celu określenie białek oraz ich grup funkcjonalnych, które wiążą się z receptorem AXL zarówno w komórkach nietraktowanych jak i traktowanych ligandem GAS6. W drugiej części, zawierającej rozdziały 4.1-4.5, doktorantka, zainspirowana faktem że wiele z białek oddziałujących z AXL jest zaangażowanych w transport pęcherzykowy, szczegółowo przygląda się endocytozie AXL i jej roli w regulacji sygnalizacji przez ten receptor. Pokazuje, że AXL po związaniu GAS6 jest szybko internalizowane przy użyciu kilku dróg zarówno klatryno-zależnej jak i klatryno-niezależnych. Co więcej, internalizacja tego receptora nie powoduje jego degradacji w lizosomach, a raczej przyczynia się do przedłużonej aktywności przekładającej się na aktywację kinazy AKT. Wyniki opisane są przejrzysto i opatrzone są wysokiej jakości rycinami.

W „Dyskusji” doktorantka podsumowuje swoje wyniki oraz przedstawia je w szerszym kontekście badań opisanych w literaturze. Doktorantka bardzo dobrze porusza się w tematyce i swobodnie przywołuje badania innych zespołów nawiązujące do Jej wyników. Opisuje też perspektywy praktycznego zastosowania swoich badań, ze szczególnym naciskiem na przedostawanie się do komórek wirusów SARS-CoV-2 i Zika. Biorąc pod uwagę olbrzymi koszt społeczny pandemii COVID-19, badania które przybliżają nas do wynalezienia metod zablokowania penetracji wirusa SARS-CoV-2 do komórek, takie jak przedstawiona tu dysertacja, mają olbrzymi potencjał aplikacyjny.

Rozdział „Wnioski” zawiera najważniejsze punkty podsumowujące wyniki oraz dyskusję. Wnioski są prawidłowe i zwięźle opisane. Pracę kończy rozdział „Perspektywy na przyszłość” (ang. „Future prospects”), który nie jest typową częścią rozpraw doktorskich, ale moim zdaniem doskonale uzupełnia „Dyskusję” i „Wnioski”. Doktorantka przedstawia tam możliwości rozwinięcia swoich badań w ciekawych i obiecujących kierunkach. Jedyne, czego mi tutaj trochę brakuje to propozycja badań aplikacyjnych które mogłyby przybliżyć nas do opanowania epidemii wirusowych.

Zastosowane w doktoracie piśmiennictwo jest niezwykle bogate (ponad 400 pozycji) i zastosowane w sposób adekwatny do opisywanych treści.

W czasie lektury dysertacji nasunęło mi się kilka pytań i wątpliwości:

1. Rozdział 4.1 poświęcony jest badaniu „interaktomu” kinazy AXL metodą BioID. Badania te są w większości opisane w pracy Zdżalik-Bielecka i wsp., 2021. Ponieważ doktorantka nie znajduje się w tej pracy wśród autorów których wkład polegał na projektowaniu badań, nasuwa się pytanie o

indywidualny wkład intelektualny doktorantki w wyniki zawarte w tym rozdziale.

2. Na rycinie 4.15 autorka przedstawia badania sugerujące, że aktywność domeny kinazowej AXL jest niezbędna do jej internalizacji. W tym celu wykorzystuje inhibitory AXL. Dlaczego nie jest tu zastosowana bardziej celowana metoda zaburzenia aktywności kinazy AXL taka, jak np. punktowa mutageneza „kinase dead” albo usunięcie domeny kinazowej? Inhibitory często mają niespecyficzny wpływ na komórki, co może utrudnić interpretację badań.
3. Na rycinie 4.20 przedstawione są wyniki badania kolokalizacji markerów endocytozy klatrynozależnej CLC i PICALM z AXL w komórkach traktowanych ligandem GAS6. Trudno te wyniki zinterpretować, ponieważ brakuje w nich statystycznego opracowania. Autorka wybiera pojedyncze komórki i bardzo wąskie obszary do badania, co wzbudza podejrzenie, że wyniki te mogły być dziełem przypadku a nie powtarzalnym zjawiskiem. Co więcej, badania kolokalizacji zawsze obciążone są dużym błędem ze względu na ograniczoną rozdzielczość metod mikroskopowych. Rygorystyczne opracowanie statystyczne tych wyników zdecydowanie poprawiłoby ich wartość poznawczą. Podobne zastrzeżenie można mieć np. do ryciny 4.24.
4. Na rycinie 4.24 przedstawiona jest kolokalizacja markerów makropinocytozy z AXL. Poza przedstawionymi powyżej wątpliwościami dotyczącymi braku opracowania statystycznego, zastanawia mnie dlaczego doktorantka nie próbowała zablokować makropinocytozy i sprawdzić wpływ takiej utraty funkcji na recykling AXL.
5. W podrozdziale 4.5.1 doktorantka stawia tezę, że „większość” receptora AXL podlega endocytozie w sposób niezależny od kompartmentu EEA1-pozytywnego. Tezę tą opiera na statycznym badaniu kolokalizacji EEA1 z AXL. Wydaje się, że jest to zbyt daleko posunięty wniosek. Receptory AXL mogą nawet w 100% przechodzić przez kompartment endosomów EEA1-pozytywnych, ale spędzać w tym kompartmentcie mało czasu, przez co statycznie obserwowana kolokalizacja AXL i EEA1 może być częściowa, podczas gdy np. receptory EGFR mogą po prostu dłużej pozostawać w tym typie endosomów, przez co ich kolokalizacja może być na statycznym obrazie wyższa.

Powyżej wymienione wątpliwości nie umniejszają jednak w moim odczuciu jakości i wagi dokonanych przez doktorantkę odkryć. Pani mgr Poświata podjęła się zbadania niezwykle ciekawych zjawisk nowoczesnymi metodami. Jej badania były przedmiotem trzech publikacji, w tym jednej pierwszoautorskiej, a opracowanie ich wyników w niniejszej dysertacji dowodzi, że Pani mgr Poświata jest dojrzałym naukowcem o szerokiej wiedzy i umiejętności samodzielnego prowadzenia badań. **Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Agaty Poświaty spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i stawiam wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej do publicznej obrony. Wnioskuje również o wyróżnienie rozprawy.**

Paweł Niewiadomski