Uniwersytet Gdański | Związek Uczelni Fahrenheita

Prof. dr hab. Magdalena Gabig-Cimińska
Kierownik Pracowni Biologii Molekularnej Chorób Skórnych
Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN
w Gdańsku
ul. Kładki 24
80-822 Gdańsk

tel. +48 58 5236046
fax: +48 58 5236025
e-mail: magdalena.gabig-ciminska@ug.edu.pl

Gdańsk, 30 marca 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Wróbel pt.

„The role of ESCRT-I proteins in the regulation of lysosomal function and lysosome-related signaling"

wykonanej w Laboratorium Biologii Komórki Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej (MIBMiK) w Warszawie, pod kierunkiem prof. dr hab. Marty Miączyńskiej (promotor) oraz dr Jarosława Cendrowskiego (promotor pomocniczy).

Zgodnie z Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r., poz. 478, 619, 1630), niniejsza recenzja jest oceną wyboru przedmiotu badań i celów pracy, użytych metod badawczych i podejścia do rozwiązania postawionego problemu badawczego, a także wiedzy teoretycznej Kandydatki do stopnia naukowego Doktora i Jej umiejętności do samodzielnego przygotowania dzieła naukowego. Dokonałam nadto oceny strony formalnej pracy, tj. struktury, poprawności cytowania literatury, przygotowania ilustracji i dokumentacji naukowej.

Dysertacja została przedstawiona w postaci pracy naukowej napisanej w języku angielskim, jest więc jedną z możliwych form rozprawy doktorskiej, wymienionych we wspomnianej powyżej Ustawie. Wyjątek stanowi dwustronicowe Streszczenie w języku polskim, zamieszone zgodnie z wymogiem. Rozprawa doktorska Pani mgr Wróbel ma układ przyjęty dla opracowań z zakresu nauk biologicznych. Praca całościowo została rzetelnie przygotowana i stanowi przyjemną dla czytelnika lekturę. Napisana w sposób syntetyczny i rzeczowo na temat, została nadto starannie zilustrowana rycinami (wzdłuż całej pracy) i tabelami (w Materiałach i Metodach).

Gabig

Praca posiada stronę tytułową, spis treści i wyjaśnienia skrótów. Założenia i cele badań są jasno sprecyzowane i opisane w postaci 7 punktów. We Wstępie Doktorantka przedstawia tło podjętej problematyki rozprawy doktorskiej, co jest w zasadzie wyczerpującym wprowadzeniem do dalszych jej rozdziałów, a co więcej świadczy również o bardzo dobrym opanowaniu przez Doktorantkę wiedzy teoretycznej z zakresu tematyki pracy. W tym miejscu mam jednak jedną uwagę. Dotyczy ona, poza ogólnikową jednozdaniową informacją na str. 33, braku w zasadzie opisu w postaci krótkiej charakterystyki jednej z dwóch strategii terapeutycznych, tj. dot. zahamowania/złagodzenia nadmiernej aktywności lizosomalnej w leczeniu chorób autoimmunologicznych. Z tego względu, proszę Doktorantkę o odniesienie się do tego zagadnienia podczas prezentacji swojej dysertacji doktorskiej. Metodyka pracy jest adekwatna do stawianych problemów. Sedno rozprawy doktorskiej stanowią szczegółowo opisane i omówione w rozdziale Wyniki rezultaty prac Pani mgr Wróbel w postaci 7 podrozdziałów, odnoszących się odpowiednio do poszczególnych 7 celów badań. Wyniki te są dyskutowane w końcowej części rozprawy. Autorka przedstawiła ponadto perspektywy dalszych badań, podsumowanie w postaci 9 wniosków ścisłych, wspomaganych ogólnym stwierdzeniem naukowym, stosowny wykaz literatury, listę publikacji, których jest współautorem oraz materiał uzupełniający. Od strony redakcyjnej praca przedstawia się bardzo dobrze. Napisana jest językiem naukowym. W tym zakresie moja uwaga odnosi się jedynie do kilku drobnych kwestii: (i) niekompletnej listy skrótów w sekcji Abbreviations (być może lista ta dotyczyła wyjaśnienia najistotniejszych skrótów); (ii) stosowania przez Doktorantkę w tekście Streszczenia (po polsku) zwrotu „i/lub", co w języku polskim nie ma logicznego sensu i jest błędem, a jest prawdopodobnie zaczerpnięte bezpośrednio z prostego tłumaczenia z języka angielskiego sformułowania „and/or" (koniunkcja „i" oznacza mianowicie spełnienie obu z podanych w danym zdaniu warunków, podczas gdy alternatywa nierozłączna „lub" to, iż może być spełniony jeden bądź oba warunki; w ten sposób określenie „i/lub" jest błędne, ponieważ „i" zawiera się już w „lub"); a także użycia w tekście Streszczenia (po polsku) obu słów: „funkcjonowanie" oraz „funkcja" lizosomów w kontekście *stricte* ich działania bądź aktywności, co jednak powinno być określane tylko tym pierwszym, czyli „funkcjonowanie" (bo „funkcja" lizosomu jest mu niejako przypisana i nie ulega zmianie); (iii) we Wstępie rozwinięcia skrótu NFAT w liczbie mnogiej „nuclear factors of activated T-cell", podczas gdy mowa jest o pojedynczym czynniku

jądrowym, owszem należącym do rodziny czynników transkrypcyjnych zidentyfikowanych w aktywowanych limfocytach T (analogicznie w przypadku czynnika FOXO); we Wstępie rozwinięcia skrótu „ELL-associated protein" jako „RNA polymerase II elongation factor ELL (Eleven nineteen Lysine rich Leukemia)"; zapisu nazw kompleksów ESCRT-0, ESCRT-I, itd. niekiedy z, a czasem bez łącznika; użycia określenia „expected results", co w nauce winno być stosowane w dużą ostrożnością, ze względu na fakt, iż dla większości badań (poza tymi, które są absolutnie z zakresu testów kontrolnych), nawet jeśli wydają się mieć przewidywany wynik, to jednak mają charakter odkrywczy.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Wróbel było wyjaśnienie mechanizmu ESCRT-zależnego, odpowiadającego za przenoszenie i dostarczenie do komórek ładunku biologicznego, poprzez opisanie udziału w sygnalizacji endolizosomalnej i działaniu lizosomu jednego z czterech typów tych endosomalnych kompleksów sortujących, tj. ESCRT-I. W tym miejscu ciekawość budzi fakt podjęcia przez Doktorantkę prac skupionych wokół obiektu badawczego, jakim jest ESCRT-I, stąd będę wdzięczna za uzasadnienie wyboru do badań właśnie tego kompleksu pośród pozostałych systemów ESCRT.

Problematyka badawcza dotycząca poznania i zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podstaw endocytarnej aktywności komórki, jej homeostazy, w tym szczegółowo równowagi lizosomalnej dotyczącej biosyntezy i aktywności lizosomu, odpowiednio w stanach zdrowia i choroby, należy do jednych z najtrudniejszych zagadnień biologii molekularnej. Postęp metodologiczny odegrał kluczową rolę w wygenerowaniu naszej obecnej wiedzy na temat biologii tego „wielozadaniowego" organellum. Mimo dostępności nowoczesnych metod analizy dla badań tożsamości lizosomów, czyli ich morfologii, komórkowego rozmieszczenia, poruszania się czy działania, wyniki tych prac są często niejednoznaczne, a rezultaty uzyskiwane w analogicznych eksperymentach naukowych przez różne grupy badawcze bywają znacząco od siebie odmienne. Nie oznacza to jednak, że takimi badaniami nie należy się zajmować. Wprost przeciwnie, są one konieczne, choć warto w takiej sytuacji zdawać sobie sprawę z poziomu skomplikowania układu badawczego oraz konieczności zachowania ostrożności w interpretacji wyników analiz.

Galo

Odnosząc się w tym miejscu do rezultatów przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej, pragnę zwrócić uwagę na następujące fakty, prosząc jednocześnie Doktorantkę o ustosunkowanie się do kwestii:

(i) Przeprowadzone badania dotyczą analiz morfologii struktur lizosomalnych komórek pozbawionych kompleksu ESCRT-I (tj. białek TSG101 i Vps28), poprzez badania wielkości LAMP1- oraz LysoTracker (LTR)-struktur pozytywnych, tj. późnych endosomów (LE) i lizosomów (L). W pierwszej kolejności chciałabym prosić Doktorantkę o przedstawienie parametrów morfometrycznych struktur kwaśnych w komórkach nowotworowych pochodzących z linii komórkowych raka jelita grubego RKO w porównaniu z komórkami zdrowej tkanki.

W przedstawionych do recenzji badaniach oceniano uśrednioną lub przeciętną powierzchnię oraz intensywność sygnału fluorescencyjnego poszczególnych LE i L, podczas gdy interesującym wydawałoby się być może oszacowanie także liczby/ilości tych struktur, dla wnioskowania o wzroście bądź spadku liczby/ilości powiększonych LE i L w komórce nowotworowej po usunięciu ESCRT-I, biorąc jednakże pod wzgląd fakt, iż np. LAMP znakują nie tylko LE i L, ale także błonę plazmatyczną i LAMP carrier vesicles (szczątkowo też autolizosomy), dlatego inne komplementarne metody są zwykle stosowane. W tym miejscu prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie informacji: „In control cells, GFP-MCOLN1 was mainly observed on LAMP1-positive structures, both LysoTracker-negative (late lysosomes) or LysoTracker-positive (lysosomes; Fig. 4.8A)" (str. 61), podczas gdy wiadomo, że LE (obok L) są strukturami LTR-pozytywnymi, a nie negatywnymi.

W przypadku wewnątrzkomórkowej dystrybucji L, ciekawym dla badania mechanizmów molekularnych byłoby ocenienie ich lokalizacji, można je bowiem różnicować przestrzennie w oparciu o ich położenie (charakterystyka heterogeniczności różnych populacji L - klastrowanie). Wiadomo, że L mogą koncentrować się w regionie przyjądrowym, otaczającym centrum organizujące mikrotubule (MTOC) lub lokalizować się bardziej obwodowo i blisko błony plazmatycznej. Lizosomy przyjądrowe są bardziej kwaśne, nieruchome i podatne na fuzję z endosomami lub autofagosomami, podczas gdy L obwodowe są bardziej ruchliwe i mogą ulegać egzocytozie, oba typy uczestnicząc odpowiednio w poszczególnych szlakach komórkowych i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Towarzyszące badania analizy komórkowego szlaku endocytarnego mogłyby

dotyczyć również studiów ruchliwości L, ich kierunku ruchu (postępowy w kierunku błony komórkowej vs. wsteczny w stronę jądra), przemieszczania i prędkości.

Ogólna refleksja - czy wykonanie analiz morfologii struktur lizosomalnych technikami różnego typu dot. wizualizacji mikroskopii elektronowej czy też cytometrii przepływowej nie wzbogaciłoby niniejszych badań?

(ii) Odnosząc się do fragmentu treści rozprawy doktorskiej Pani mgr Wróbel: "Various types of lysosomal dysfunction may also cause lysosomal enlargement, however accompanied by increased lysosomal pH [304], observed as a lower or a lack of LysoTracker staining intensity. Stronger LysoTracker staining of cells lacking ESCRT-I described here (Fig. 4.3-4.4) shows that the pH of lysosomes is not increased but rather decreased. Moreover, strong LysoTracker staining of enlarged lysosomes upon ESCRT-I deficiency (Fig. 4.3-4.4) indicates that they preserve their integrity, as damaged lysosomes would not maintain their acidic pH [49, 198, 199]." (str. 90), chciałabym prosić Doktorantkę o krótkie przedyskutowanie go w świetle literatury, która mówi o tym, iż sondy LTR wykazują fluorescencję, która jest w dużej mierze niezależna od pH, gromadząc się niejako „na oślep" w kwaśnych organellach wewnątrzkomórkowych, przez co nie informują dokładnie o pH. Dlatego sondy LTR znakują lizosomy, jak również późne endosomy i z tego powodu nie należy wykorzystywać sygnału fluorescencyjnego jako miary pH, a co najwyżej z grubsza kwasowości struktur. Co ważne, na całkowitą fluorescencję tych kwasotropowych barwników wpływa wielkość, liczba i charakter zawartości kwaśnych organelli (*Stagi M, et al. Lysosome size, motility and stress response regulated by fronto-temporal dementia modifier TMEM106B. Mol Cell Neurosci. 2014;61:226-240; DiCiccio JE, Steinberg BE. Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification. J Gen Physiol. 2011;137:385-390*, i in.).

(iii) W badaniach dot. udziału sygnalizacji zależnej od wapnia [Ca^{2+}] w aktywacji czynników MiT-TFE w komórkach pozbawionych ESCRT-I, traktowanych chelatorem wewnątrzkomórkowego [Ca^{2+}] (BAPTA-AM) lub inhibitorem MCOLN1 (ML-S11), wykazano, iż nie jest to proces zależny od kalcyneuryny. Wobec tych prac chciałabym zapytać Doktorantkę o to, w jakich warunkach względem [Ca^{2+}] prowadzono hodowlę?

(iv) Wpływ siRNA na wzrost komórek (ich przeżywalność i proliferację) jest oczywisty, zatem moje pytanie dotyczy tego, jak prezentują się wyniki badania cytotoksycznego działania siRNA wobec zastosowanych linii komórkowych? Nadto, jaki był stopień wyciszania ekspresji badanych genów na poziomie ich transkryptów po ekspozycji komórek na poszczególne siRNA?

(v) Status aktywacji mTORC1 w komórkach pozbawionych kompleksu ESCRT-I i jej wkład w aktywację MiT-TFE badano analizując poziomy ufosforylowania substratów tej kinazy białkowej. Zbadano też stan aktywacji mTORC1 poprzez analizę jego subkomórkowej lokalizacji, mając na uwadze fakt, iż aktywacja mTORC1 następuje pod wpływem jego rekrutacji z cytozolu do błony lizosomalnej. Tutaj z kolei chciałabym prosić Doktorantkę o przedstawienie informacji dotyczących poziomu ekspresji genów i białek endogennych czynników TFEB i TFE3 w komórkach jelita grubego typu dzikiego, a także tych użytych w niniejszej pracy badawczej (tj. RKO i DLD-1); czy dla tych badań rozważano/rozważa się generowanie linii komórkowych nowotworowych trwale wyrażających znakowane wersje TFEB (w tym dla zapewnienia sobie badań dotyczących oceny poziomu białek, również statusu fosforylacji TFEB, szczególnie w testach Western Blot)? Wiadomo bowiem, że ze względu na niski poziom ekspresji endogennego TFEB w większości linii komórkowych, zastosowanie przeciwciał zazwyczaj wymaga konstytutywnej ekspresji egzogennego TFEB.

(vi) Na rycinie 4.23 przedstawiono wyniki badań wpływu aktywacji sygnalizacji zależnej od GTPazy Rag na poziom fosforylacji TFEB, będącego jednym z substratów mTORC1, w komórkach pozbawionych ESCRT-I. Czy robiono analogiczne badanie dla czynnika TFE3?

(vii) Regulacja biogenezy lizosomu odbywa się na różnych poziomach, transkrypcyjnym i translacyjnym. W przypadku tego pierwszego jest ona istotnie kontrolowana przez czynnik transkrypcyjny TFEB, a dokładnie przez jego aktywację i dojądrową translokację w komórce, co z kolei uwarunkowane jest stanem defosforylacji TFEB. Obecnie wiemy też o udziale acetylacji TFEB w jego przejściu z cytozolu do jądra i promocji biogenezy lizosomu, jako zjawisk niezależnych od defosforylacji TFEB. Czy zatem Doktorantka uwzględniłaby w swoim opisie rozdziału 6 (tj. Perspektywy dalszych badań) potencjalne badania nad mechanizmem ESCRT-zależnym w kontekście acetylacji TFEB?

Rozdział pt. Dyskusja przedstawia szczegółową interpretację uzyskanych w badaniach rezultatów na tle doniesień bibliograficznych. Lektura tego rozdziału utwierdziła mnie w przekonaniu o dojrzałości naukowej Pani mgr Wróbel i umiejętności prowadzenia przez Nią pracy badawczej.

Umiejętne zaplanowanie badań i konsekwentne ich zrealizowanie dostarczyło szeregu oryginalnych wyników istotnych pod względem poznawczym oraz potencjalnie aplikacyjnym. Zdobycie nowej wiedzy w omawianym zakresie staje się podstawą do opracowania nowych strategii leczenia, w tym pacjentów onkologicznych, a w tym choćby omijania lekooporności nowotworów. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała wnioski trafnie oceniające istotę prowadzonych badań. Z tym wiąże się pytanie, jaki jest status upublicznienia tych wyników na skalę międzynarodową, w postaci doniesień publikacyjnych, czy wszystkie wyniki opublikowano już, czy w przygotowywaniu są jeszcze jakieś artykuły? Obecnie Pani mgr Wróbel jest współautorem dwóch interesujących artykułów naukowych, opublikowanych w *eLife* oraz *Life Science Alliance*, odpowiednio 200 i 40 punktowych.

Reasumując, pragnę podkreślić, iż zagadnienia będące przedmiotem rozprawy leżą w głównym nurcie badań nad komunikacją między- i wewnątrzkomórkową w procesach nowotworzenia. Z tego też względu uważam temat rozprawy doktorskiej za wybrany trafnie, a przedstawione zagadnienia dotyczące zjawiska jako ważne, aktualne naukowo i bardzo interesujące. Doktorantka uzyskała bowiem istotne naukowo wyniki, które poszerzają naszą wiedzę o wymaganym udziale kompleksu ESCRT-I w prawidłowym dostarczaniu substancji odżywczych pochodzących z degradacji lizosomalnej celem ograniczenia aktywacji czynników MiT-TFE poprzez szlak sygnałowy Rag GTPase-mTORC1, a w efekcie dla łagodzenia wzmożonego działania aparatu endolizosomalnego w nowotworach. Oceniana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, co pozwala stwierdzić, iż spełnione zostały warunki określone wspomnianą uprzednio ustawą, tj. Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r., poz. 478, 619, 1630). Biorąc powyższe pod uwagę wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie Pani mgr Marty Wróbel do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Mając na względzie bardzo dobre naukowo podejście Doktorantki do problemu, znamienitą zdolność poradzenia sobie z obfitością wyników i mnogością informacji będących pochodną wykonanych badań, momentami trudnymi do interpretacji, Jej wkład w wiedzę stymulującą wzrost ilości i jakości badań nad mechanizmami molekularnymi leżącymi u podstaw działania układu endolizosomalnego, stosownie do przebiegu stanów patologicznych w organizmie, zgłaszam formalny wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Wróbel stosowną nagrodą.

Magdalena Gabig-Cimińska

Prof. dr hab. Magdalena Gabig-Cimińska

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 26 kwietnia 2023

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
Zakład Biochemii Komórki
Dr hab. Aneta Kasza, prof. UJ

Praca doktorska została wykonana w Laboratorium Biologii Komórki w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Jej promotorem jest prof. dr hab. Marta Miączyńska a promotorem pomocniczym dr Jarosław Cendrowski.

Zespół pani profesor Marty Miączyńskiej od wielu lat zajmuje się białkami, które są zaangażowane w procesy transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego i transportu błonowego. Tej tematyki dotyczy również przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Marty Wróbel zatytułowana „The role of ESCRT-I proteins in the regulation of lysosomal function and lysosome-related signaling". Celem pracy doktorskiej było scharakteryzowanie roli endosomalnego kompleksu sortującego ESCRT-I (ang. endosomal sorting complexes required for transport) w utrzymaniu homeostazy lizosomów. Doktorantka badała wpływ ESCRT-I na morfologię i funkcję lizosomów oraz przekaz sygnału generowany przez te organelle. Otrzymane wyniki rzucają nowe światło na konsekwencje wynikające z braku ESCRT-I na homeostazę lizosomów. Badania są szczególnie istotne w kontekście obserwowanego w wielu typach nowotworów obniżonego poziomu białek tworzących kompleks ESCRT i związanego z tym złego rokowania dla pacjentów.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa ma układ typowy dla prac doktorskich. Jest napisana bardzo dobrze.

We **Wstępie** Autorka porusza wszystkie zagadnienia istotne dla zrozumienia pracy doktorskiej a więc opisuje transport endosomalny, wzbogacając ten opis dwiema rycinami; przedstawia białka istotne w pełnieniu przez lizosomy ich funkcji biologicznej; opisuje rolę lizosomów w homeostazie cholesterolu; ich istotność jako rezerwuaru jonów wapnia; charakteryzuje ścieżki sygnałowe aktywowane przez lizosomy skupiając się

szczegółowo na szlaku mTORC1 oraz czynnikach transkrypcyjnych z rodziny MiT-TFE (wzbogacając ten opis trzema rycinami); opisuje budowę i funkcje kompleksów ESCRT, uzupełniając tę charakterystykę ryciną. Wstęp kończy omówienie stanów patologicznych wynikających z wadliwie funkcjonujących białek wchodzących w skład ESCRT oraz strategii terapeutycznych koncentrujących się na wadliwie funkcjonujących lizosomach.

Cele pracy są bardzo klarownie i szczegółowo omówione.

Stosowane w pracy doktorskiej **materiały i metody** są bardzo przejrzyście opisane. Ta część obfituje w 17 tabeli, które bardzo ułatwiają rozeznanie się w stosowanych liniach komórkowych, szczepach bakteryjnych, odczynnikach i starterach. Metody są opisane bardzo starannie, w sposób umożliwiający ich powtórzenie przez innych badaczy. Praca oparta jest przede wszystkim na metodach obrazowania mikroskopowego.

Wyniki stanowią najobszerniejsza część pracy. Są przedstawione w sposób bardzo klarowny. Doktorantka rozpoczęła swoje badania od analizy wpływu kompleksu ESCRT-I na morfologię lizosomów. W tym celu obniżyła w komórkach linii raka jelita grubego RKO i DLD-1 poziom białek Tsg101 i Vps28 stosując siRNA komplementarne do ich transkrypów. Rezultaty tych eksperymentów sugerują, iż obniżony poziom ESCRT-I powoduje zwiększenie rozmiarów struktur, których detekcja przeprowadzana była za pomocą przeciwciał rozpoznających marker późnych endosomów i lizosomów, białko LAMP1 (ang. lysosomal associated membrane protein 1). Obserwacja ta została potwierdzona również przez zastosowaniu barwnika fluorescencyjnego LysoTracker, który wybarwia nieuszkodzone lizosomy mające niskie pH. Struktury uwidocznione za pośrednictwem LysoTracker w komórkach z obniżonym poziomem komponentów ESCRT-I wykazywały się większym rozmiarem i podniesionym poziomem sygnału fluorescencji. Ich niezaburzona funkcjonalność została potwierdzona nie tylko poprzez detekcję niskiego pH ale również poprzez analizę dystrybucji głównej lizosomalnej endopeptydazy - katepsyny D. Powiększona objętość lizosomów obserwowana w komórkach z wyciszonym ESCRT-I skłoniła doktorantkę do weryfikacji hipotezy o wpływie badanego kompleksu na proces degradacji białek powierzchniowych lizosomów. W tym celu przy użyciu mikroskopu konfokalnego sprawdzona została pula ubikwitynowanych białek w komórkach kontrolnych oraz z wyciszonym ESCRT-I. Obniżony poziom ESCRT-I przekładał się na akumulację ubkwitynowanych białek w

strukturach wybarwionych LysoTracker i przeciwciałami anty-LAMP-1. Wniosek o zaangażowaniu kompleksu ESCRT-I w procesy prowadzące do degradacji białek powierzchniowych lizosomów został dodatkowo potwierdzony poprzez analizę poziomu jednego z nich, białka MCOLN1. Analiza ta została przeprowadzona metodą western blot oraz obrazowania przy użyciu mikroskopu konfokalnego.

Kolejną częścią pracy była identyfikacja szlaków sygnałowych aktywowanych w wyniku wyciszenia kompleksu ESCRT-I. W tym celu doktorantka stosując bazę danych GO (ang. Gene Ontology) przeprowadziła analizę wyników uzyskanych metodą sekwencjonowania RNA z komórek RKO kontrolnych (transfekowanych kontrolnym siRNA) i z komórek z wyciszeniem komponentów kompleksu ESCRT-I. Uzyskane wyniki potwierdziły opisany wcześniej przez grupę badawczą prof. Miączyńskiej zwiększony poziom ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź zapalną w komórkach z niefunkcjonalnym kompleksem ESCRT-I. Stwierdzono ponadto podwyższony poziom ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w procesie autofagii i metabolizmu cholesterolu. Aby poznać czynniki transkrypcyjne zaangażowane w indukcję transkrypcji zidentyfikowanych genów zastosowano oprogramowanie Bioconductor RcisTarget i bazę danych SwissRegulon. Przeprowadzona analiza pozwoliła wyodrębnić czynniki transkrypcyjne z rodziny NF-κB (NFKB1, REL, RELA), AP-1 (FOS, FOSB, FOSL1, JUNB, JUND), MiT-TFE (TFEB) oraz SREBP (SREBF1/2). Doktorantka skupiła się na szczegółowym zbadaniu udziału czynników z rodziny MiT-TFE, białek TFEB i TFE3 w procesach aktywowanych w wyniku wyciszenia kompleksu ESCRT-I. Stosując metodę western blot potwierdziła podwyższony poziom obu badanych białek w całkowitych lizatach komórkowych oraz we frakcji jądrowej wyizolowanej z komórek z obniżonym poziomem białek Tsg101 i Vps28. Mimo, że doktorantka w swojej pracy skupia się na wpływie obniżonego poziomu Tsg101 na translokację TFEB i TFE3 do jądra komórkowego w dyskusji znalazło się potencjalne wytłumaczenie obserwowanego wpływu zaburzonego poziomu ESCRT-I na podwyższony poziom badanych czynników transkrypcyjnych w całkowitej frakcji komórkowej. W celu dalszego potwierdzenia istotności TFEB i TFE3 w badanych procesach doktorantka uzyskała komórki z wyciszonymi komponentami kompleksu ESCRT-I i dodatkowo z wyciszonymi za pomocą siRNA badanymi czynnikami transkrypcyjnymi. Skuteczność wyciszenia była sprawdzana metodą western blot oraz

RT-PCR. Zaangażowanie TFEB i TFE3 w ścieżki sygnałowe aktywowane w wyniku zaburzenia funkcji ESCRT-I doktorantka analizowała poprzez pomiar poziomu transkryptów genów NPC1 i MCOLN1 regulowanych przez badane czynniki transkrypcyjne. Uzyskane wyniki dowodzą, iż podwyższona ekspresja tych genów obserwowana w komórkach z wyciszeniem komponentów kompleksu ESCRT-I zostaje zniesiona w komórkach z obniżonym poziomem badanych czynników transkrypcyjnych.

Identyfikacja podwyższonej ekspresji genów kodujących białka związane z metabolizmem cholesterolu w komórkach z wyciszonymi komponentami kompleksu ESCRT-I skłoniła doktorantkę do zbadania transportu cholesterolu w badanym modelu komórkowym. Stosując filipin, fluorescencyjny związek, który wiąże się do cholesterolu, doktorantka potwierdziła zaburzenia w endosomalnym transporcie egzogennego cholesterolu w komórkach z wyciszonym ESCRT-I. Doktorantka konkluduje, iż w komórkach z wyciszonym kompleksem ESCRT-I indukowana jest ekspresja genów kodujących białka związane z homeostazą cholesterolu w celu kompensacji zaburzeń jego endosomalnego transportu.

Wyciszenie komponentów kompleksu ESCRT-I indukuje aktywację czynników transkrypcyjnych z rodziny MiT-TFE i zaburza degradację białka MCOLN1, będącego lizosomalnym kanałem jonów Ca2+. Chelator wewnątrzkomórkowych jonów Ca2+ - BAPTA-AM i inhibitor aktywności MCOLN1 - ML-SI1 zostały zastosowane przez doktorantkę w celu zbadania wpływu zahamowania przekazu sygnału związanego z jonami wapnia na translokację białek z rodziny MiT-TFE do jądra komórkowego. Moje zastrzeżenie budzi sformułowanie ze str. 76 dotyczące analizy zdjęć preparatów mikroskopowych prezentowanych na rycinie 4.16. Pani Marta Wróbel stwierdza, że w komórkach kontrolnych traktowanych BAPTA-AM lub ML-SI1 nie jest obserwowana redukcja ilości TFEB czy TFE3 w jądrze komórkowym w stosunku do komórek nietraktowanych. Na prezentowanych zdjęciach nie ma ani jednej komórki, w której badane czynniki transkrypcyjne w komórkach kontrolnych (siCtrl, DMSO) nietraktowanych modulatorami Ca2+ byłyby zlokalizowane w jądrze komórkowym wiec nie rozumiem dlaczego doktorantka spodziewała się jeszcze większego ich braku w jądrze. Podobnie na zdjęciach prezentowanych na rycinach 4.13, 4.15 i 4.17 TFEB w komórkach kontrolnych (siCtrl, nietraktowane) jest zawsze widoczny tylko w

cytoplazmie. Wyniki western blot prezentowane na ryc. 4.11 pokazują, że TFEB jest obecny we frakcji jądrowej w komórkach kontrolnych (choć w mniejszej ilości niż w komórkach z niefunkcjonalnym ESCRT-I) ale nie znajduje to odzwierciedlenia na prezentowanych zdjęciach. Podobnie trudno na podstawie zdjęć stwierdzić, że translokacja do jądra komórkowego TFEB została zahamowana w komórkach traktowanych siTsg101 i BAPTA-AM. Połowa z komórek widocznych na zdjęciu ma jądra komórkowe zielono wybarwione więc można mówić o częściowym zahamowaniu translokacji (ryc. 4.16A). Zastanawia mnie dlaczego sygnał pochodzący od TFE3 widoczny w cytoplazmie komórek traktowanych BAPTA-AM jest znacznie słabszy niż sygnał pochodzący z komórek nietraktowanych BAPTA-AM czy traktowanych ML-SI1 (ryc. 4.16B). Kończąc ten wątek pracy doktorskiej doktorantka wykluczyła udział fosforylacji zależnej od kalcyneuryny w badanych procesach.

W dalszej części pracy doktorantka pogłębiała wątek ścieżek sygnałowych zaangażowanych w przekaz sygnału indukowany brakiem kompleksu ESCRT-I. Biorąc pod uwagę dane literaturowe wskazujące na udział mTORC1 w fosforylacji TFEB indukowanej brakiem Tsg101 doktorantka skupiła się na roli mTORC-1 w badanych procesach. Przedstawione wyniki dowodzą, że brak Tsg101 nie wpływa na kanoniczny szlak mTORC1 natomiast aktywuje szlak nie-kanoniczny zależny od Rag GTPazy. Konstytutywnie aktywny mutant RagC - S75L hamuje aktywację TFEB i TFE3 w komórkach z wyciszonym Tsg101.

Z wyjątkiem wyników prezentowanych na rycinach 4.11 i 4.12B eksperymenty były powtórzone przynajmniej 3 krotnie i mają zanalizowaną istotność statystyczną.

Dyskusja jest wyjątkowo ciekawie napisana. Pani Marta Wróbel bardzo wyczerpująco omawia uzyskane wyniki w oparciu o opublikowane dane literaturowe. Dyskusja została podzielona na podrozdziały, które odnoszą się do poszczególnych części tematycznych przedstawionych w rozdziale „Wyniki". Podobnie jak poprzednie części również dyskusja jest wzbogacona o rycinę obrazującą konsekwencje wyciszenia kompleksu ESCRT-I dla homeostazy lizosomów. Dyskusja otrzymanych wyników pokazuje bardzo dobrą znajomość zagadnień dotyczących pracy doktorskiej. Ta konkluzja jest dodatkowo uwypuklona po przeczytaniu rozdziału **Perspektywy na przyszłość**, w którym doktorantka omawia kierunki potencjalnych dalszych badań. Rozprawa kończy się

Podsumowaniem wyników uzyskanych podczas realizacji pracy doktorskiej. Ostatni rozdział to **Spis Literatury**. Obejmuje on 335 pozycji, wiele z nich dotyczy prac opublikowanych w ostatnich latach. Praca zawiera również **Suplement** obejmujący listę zidentyfikowanych w wyniku sekwencjonowania RNA genów, które ulegają podwyższonej ekspresji w wyniku wyciszenia Tsg101 (1166 genów), Vps28 (601 genów) oraz Tsg101 i Vsp28 (480 genów).

Uważam, że przedstawiona 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 więc do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie pani mgr Marty Wróbel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Kano

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Immunologii
Department of Immunology

Warszawa, 28/04/2023

dr hab. n med. Małgorzata Firczuk
Zakład Immunologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Ul. Nielubowicza 5, budynek F
tel. (4822) 5992172, email: mfirczuk@wum.edu.pl

RECENZJA rozprawy doktorskiej mgr Marty Wróbel
pt. „The role of ESCRT-I proteins in the regulation of lysosomal function and lysosome-related signaling"

Recenzja została sporządzona w związku z powołaniem mnie przez Radę Naukową Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN do pełnienia funkcji recenzenta pracy doktorskiej mgr Marty Wróbel pt. "The role of ESCRT-I proteins in the regulation of lysosomal function and lysosome-related signaling". Przestawiona do recenzji rozprawa doktorska wykonana została pod kierunkiem Prof. dr hab. Marty Miączyńskiej, pełniącej funkcję promotora oraz dr Jarosław Cendrowskiego, pełniącego funkcję promotora pomocniczego. Projekt doktorski realizowany był w ramach grantu TEAM, finansowanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej.

Tematyka pracy dotyczy zagadnień związanych z endocytozą, transportem ładunku wewnątrz komórek, lizosomami. Przedstawiona rozprawa doktorska ma standardowy układ, podzielona jest na dziesięć rozdziałów takich jak: *Wstęp*, *Cele pracy*, *Materiały i Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Perspektywy na przyszłość*, *Podsumowanie i wnioski*, *Literatura*, *Publikacje autorki*, *Materiały dodatkowe*. Praca napisana jest w języku angielskim, nieliczne drobne błędy językowe nie wpływają na ogólny, bardzo dobry odbiór pracy. Poniżej odniosę się do poszczególnych części pracy.

Wstęp

Rozdział *Wstęp* wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z transportem wewnątrzkomórkowym, budową i funkcją lizosomów, rolą endosomalnych kompleksów sortujących ESCRT w transporcie wewnątrzkomórkowym, w warunkach fizjologicznych i

patologicznych. W tym rozdziale opisana jest również budowa i funkcja kompleksu mTORC1, szlaki sygnałowe regulowane przez mTORC1 oraz czynniki transkrypcyjne z rodziny MiT-TFE i ich regulacja przez fosforylację. Na koniec Wstępu Doktorantka opisuje również blokowanie funkcji lizosomów jako cel terapeutyczny w nowotworach i innych chorobach, odnosząc się do potencjalnego, praktycznego zastosowania wyników badań związanych z endocytozą i lizosomami. Rozdział *Wstęp* napisany jest bardzo dobrze. Doktorantka wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z tematyką pracy systematycznie i w sposób uporządkowany.

Cele pracy

Następnie Doktorantka definiuje cel pracy, którym jest charakterystyka roli kompleksu ESCRT-I w utrzymaniu homeostazy lizosomów i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej związanej z lizosomami. W szczególności, Doktorantka skupia się na takich zagadnieniach jak:

- ocena budowy i funkcji lizosomów w komórkach wykazujących obniżoną ekspresję ESCRT-I
- zbadanie roli kompleksu ESCRT-I w degradacji białek błonowych lizosomów
- zidentyfikowanie czynników transkrypcyjnych związanych z funkcją lizosomów, aktywowanych w komórkach z obniżoną ekspresją ESCRT-I oraz mechanizmu ich aktywacji.

Cele pracy przedstawione zostały w sposób jasny i precyzyjny.

Materiały i metody oraz Wyniki

Głównym narzędziem zastosowanym w pracy było obniżenie ekspresji kluczowych podjednostek kompleksu ESCRT-I za pomocą siRNA w modelowych liniach komórkowych raka jelita grubego RKO i DLD-1. W ten sposób uzyskano komórki o znacząco obniżonej aktywności kompleksu ESCRT-I. W pierwszej kolejności, w komórkach z obniżoną aktywnością ESCRT-I, scharakteryzowano morfologię lizosomów. Mikroskopowa analiza markerów lizosomalnych wykazała, że obniżenie aktywności ESCRT-I prowadzi m.in. do powstania powiększonych lizosomów, ale nie upośledzała ich integralności, utrzymania niskiego pH i zawartości katepsyny D. Po usunięciu ESCRT-I zaobserwowano również zmniejszoną degradację kanału wapniowego MCOLN1, który jest białkiem błonowym obecnym na lizosomach. W następnej kolejności, aby dokonać globalnej analizy zmian w ekspresji genów w komórkach z obniżoną aktywnością ESCRT-I, wykonano analizę sekwencjonowania RNA. Wykazano, że obniżenie aktywności ESCRT-I indukuje ekspresję genów związanych z różnymi szlakami, m. in. odpowiedzią prozapalną, aktywacją leukocytów,

autofagią i/lub biogenezą lizosomów, syntezą cholesterolu. W dalszej części skupiono się na genach związanych z autofagią, biogenezą lizosomów i sygnalizacją zależną od lizosomów. Jako potencjalnie mediatory zaangażowane w indukcję ekspresji tych genów wytypowano czynniki transkrypcyjne z rodziny MiT-TFE, takie jak TFEB i TFE3. Wykazano, że po wyciszeniu ESCRT-I dochodzi do obniżenia fosforylacji, nasilenia translokacji jądrowej i aktywacji tych czynników. W dalszych etapach poszukiwano mechanizmu aktywacji tych czynników w wyniku obniżenia aktywności ESCRT-I. Wykazano, że niedobór ESCRT-I indukuje sygnalizację TFEB/TFE3 poprzez inaktywację szlaku mTORC1 zależnego od GTPazy Rag. Ostatecznie wyciągnięto wniosek, że ESCRT-I, poprzez aktywację GTPazy Rag, indukuje niekanoniczną ścieżkę aktywacji mTORC1, która prowadzi do fosforylacji czynników transkrypcyjnych MiT-TFE oraz ich cytoplazmatycznej retencji, zapobiegając ich aktywacji. Doktorantka proponuje mechanizm, w którym obniżenie ekspresji ESCRT-I prowadzi do obniżenia składników odżywczych, głównie aminokwasów, co prowadzi do zablokowania aktywności GTPazy Rag i selektywnego zablokowania aktywności mTORC1 względem substratów zależnych od GTPazy Rag. Mam kilka pytań do tej części pracy:

1. Po wyciszeniu ESCRT-I w badanych liniach komórkowych widoczne jest wyraźne zwiększenie ilości TFEB i TFE3 na poziomie białka w lizatach całkowitych (Ryc. 4.11), natomiast wzrost na poziomie mRNA jest niewielki (Ryc. 4.12). Jak można to wytłumaczyć? Czy Doktorantka rozważała zwiększoną stabilność/ zmniejszoną degradację TFEB i TFE3 w lizosomach, ze względu na zablokowanie „autophagic flux”? Czy Doktorantka badała to zagadnienie i rozważała ten mechanizm aktywacji TFEB i TFE3 po wyciszeniu ESCRT-I? Czy wiadomo z wcześniejszych badań, czy zwiększona ilość czynników TFEB i TFE3 może prowadzić do ich aktywacji?

2. Doktorantka wnioskuje, że ESCRT-I blokuje translokację jądrową czynników TFEB poprzez niekanoniczną aktywacje mTORC1, mediowaną przez GTPazę Rag. W pracy nie przedstawiono jednak jednoznacznych dowodów na to, że fosforylacja i inaktywacja tych czynników zachodzi jedynie z udziałem mTORC1. Być może jest to oczywisty fakt, znany z literatury. Jednak we Wstępie do pracy na str. 26 Doktorantka wspomina o innych kinazach, które mogą regulować aktywacje TFEB, tj AKT, GSK3β. Czy możliwy jest udział innych kinaz w translokacji TFEB do jądra, który obserwowany jest w wyniku

wyciszenia ESCRT-I? Wyniki przedstawione na Ryc. 4.20 trochę to sugerują, gdyż po wyciszeniu ESCRT-I w komórkach z zablokowaną aktywnością mTORC1 za pomocą inhibitora INK128 nadal widać znaczący wzrost ilości TFEB w jądrach komórek.

3. Ekspresja konstytutywnie aktywnego wariantu białka RagC powoduje zwiększoną fosforylację TFEB (Ryc. 4.23) oraz praktycznie całkowity brak tego białka w jądrze (Ryc. 4.22). Wyciszenie ESCRT-I w tych komórkach z ekspresją konstytutywnie aktywnego wariantu białka RagC nie powoduje obniżenia fosforylacji TFEB i jego translokacji jądrowej. Niewątpliwie potwierdza to znacząca rolę GTPazy RagC w aktywacji TFEB po wyciszeniu ESCRT-I. Czy po zablokowaniu mTORC1 widać spadek tej fosforylacji? Czy Doktorantka wykonała takie eksperymenty? Może warto by było je wykonać, aby potwierdzić rolę mTORC1 w tych procesach?

W rozdziałach *Dyskusja* i *Wnioski* Doktorantka opisuje uzyskane wyniki i odnosi się do licznej, w mojej opinii prawidłowo dobranej literatury. Doktorantka podsumowuje uzyskane wyniki na Ryc. 5.1 oraz na str. 101. W końcowej części pracy znajduje się również ciekawy rozdział: *Perspektywy na przyszłość*, w którym Doktorantka opisuje możliwe, dalsze kierunki badań. Do tych rozdziałów mam również kilka pytań i uwag:

4. Duża część pracy poświęcona jest wyjaśnieniu w jaki sposób, w wyniku wyciszenia ESCRT-I, dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych MiT-TFE. Na str. 92, w rozdziale Dyskusja, Doktorantka omawia ten mechanizm i wnioskuje, że w komórkach z obniżoną ekspresją ESCRT-I dochodzi do częściowego zablokowania funkcji lizosomów, niedoboru aminokwasów, a co za tym idzie do zablokowania GTPazy RagC. W konsekwencji powoduje to zahamowanie fosforylacji czynników transkrypcyjnych MiT-TFE przez mTORC1, translokacji jądrowej i aktywacji ekspresji regulowanych przez nie genów. Czy taki jest proponowany mechanizm i czy wszystkie wymienione etapy zostały zbadane w pracy doktorskiej? Zabrakło mi bardziej szczegółowego schematu, który by to zobrazował. Mógłby on dodatkowo wskazywać etapy, które wymagają dalszych badań.

5. Czy zmiana aktywności czynników transkrypcyjnych MiT-TFE po zablokowaniu ESCRT-I lub zadziałaniu innych czynników, które blokują mTORC1, hamują

„autophagic flux" lub proteazy lizosomalne, była wcześniej pokazana w innych modelach? Jak wyniki Doktorantki odnoszą się do tych badań, jakie są podobieństwa/ różnice?

6. Czy były wykonane badania RNAseq po wyciszeniu/ zablokowaniu ESCRT-I w innych modelach? Jak wyniki Doktorantki odnoszą się do tych badań, jakie są podobieństwa/ różnice?

7. Jakie są efekty zablokowania ESCRT-I w badanych liniach komórkowych w dłuższym czasie? Czy genomowa delecja podjednostek kompleksu ESCRT-I prowadzi do zmiany żywotności komórek? Czy zwiększona biogeneza lizosomów i autofagia, które nastąpią w wyniku aktywacji czynników MiT-TFE, zrekompensują niedobór ESCRT-I i doprowadzą do homeostazy komórki?

Wniosek końcowy

Na koniec chciałabym podkreślić, że pomimo moich uwag i pytań, jakie zadałam w recenzji, uważam, że wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej są ciekawe i znacząco poszerzają wiedzę na temat roli kompleksu ESCRT-I w homeostazie lizosomów i sygnalizacji lizosomalnej. Rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim 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). Wnioskuję zatem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Marty Wróbel do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Gratuluję Doktorantce i Promotorom!

……
dr hab. n med. Małgorzata Firczuk