

Gdańsk, 20 sierpnia 2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Połosak pt. „Oddziaływanie transportera aminokwasów SLC6A14/ATB^{0,+} z białkami szoku cieplnego – rola w przeżywalności komórek raka piersi

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani Karoliny Połosak została zrealizowana w Pracowni Procesów Transportu w Błonach Biologicznych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Nałęcz.

Nowotwory złośliwe są poważnym, globalnym problemem współczesnej medycyny. Pomimo stosowania zaawansowanych technik terapeutycznych z dziedziny chemioterapii, radioterapii i chirurgii onkologicznej, leczenie chorób nowotworowych wciąż stanowi ogromne wyzwanie dla współczesnej nauki. Dlatego poszukiwanie nowych, bezpiecznych i skutecznych rozwiązań terapeutycznych jest konieczne i rzeczywiście znajduje się w centrum zainteresowań wielu lekarzy i naukowców różnej specjalności na całym świecie.

Duży postęp w poznaniu biologii komórek nowotworowych przyczynił się do rozwoju wielu nowych i obiecujących nurtów w terapii nowotworów, wśród których należy wymienić immunoterapię oraz spersonalizowaną terapię celującą w metabolizm komórek nowotworowych. Istotnymi cechami komórek nowotworowych - które mogą zarazem stanowić inspirację do zaprojektowania skutecznej terapii, jest np. unikanie nadzoru immunologicznego lub ich odmienny metabolizm. Wspomniane cechy przyczyniają się do niekontrolowanej proliferacji, wzrostu i przerzutowania komórek nowotworowych. Ta ostatnia cecha komórek nowotworowych, wynikająca m.in. ze wzrostu ekspresji transporterów substancji odżywczych do komórki, zarówno w ujęciu poznawczym jak i aplikacyjnym, od wielu lat leży w centrum zainteresowań naukowych zespołu Pani prof. Katarzyny Nałęcz i Pani mgr Karoliny Połosak – autorki ocenianej

dysertacji. Uważam, że problematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę jest jak najbardziej zasadna i wypisuje się w ogólnoswiatowe trendy w dziedzinie biologii molekularnej i biologii medycznej zmierzające do opracowania skutecznych terapii chorób nowotworowych.

Zasadniczym celem rozprawy doktorskiej Pani Połosak było określenie roli cytoplazmatycznych białek szoku termicznego (Hsp) Hsp90-beta i HSPA14, należących odpowiednio do rodziny Hsp90 oraz Hsp70, w transporcie z siateczki śródplazmatycznej do błony komórkowej jednego z istotnych w kontekście żywotności i proliferacji komórek nowotworach błonowego transportera większości aminokwasów - SLC6A14 (ATB^{0,+}). Kolejnym celem jaki postawiła sobie Doktorantka było określenie roli białka Hsp90-beta oraz transportera SLC6A14 w rozwoju raka piersi, z wykorzystaniem inhibitorów wspomnianych białek i odpowiednich linii komórkowych.

Układ redakcyjny tej tradycyjnie przygotowanej rozprawy doktorskiej jest typowy. Praca podzielona jest na sześć głównych rozdziałów (Wstęp, Założenia i Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski). Na początku pracy zostało umieszczone Streszczenie/Abstrakt, które w wyczerpującym zakresie informuje czytelnika o istotnych aspektach rozprawy, szczegółowo rozwiniętych w kolejnych rozdziałach.

W obszernym Wstępie (liczącym 40 stron), Doktorantka w interesujący i wyczerpujący sposób wprowadza czytelnika w tematykę pracy omawiając istotne dla zrozumienia dalszych rozdziałów pracy zagadnienia, skupiając się m.in. na cechach charakterystycznych nowotworów i omawia typy transporterów aminokwasów z rodziny SLC, skupiając się szczególnie na roli transportera SLC6A14. Następnie w pracy została umieszczona aktualna klasyfikacja i rola białek Hsp w funkcjonowaniu komórki eukariotycznej, ze szczególnym uwzględnieniem rodziny Hsp90 w kancerogenezie. Ponadto Autorka prezentuje najnowsze osiągnięcia na temat udziału transporterów z rodziny SLC w procesie wzrostu i przeżywalności komórek nowotworowych oraz dane zmierzające do opracowania nowych strategii terapeutycznych, polegających m.in. na zastosowaniu inhibitorów błonowych transporterów aminokwasów. Wspomina również

o potencjalnej roli omawianych transporterów w przenikaniu leków do komórek nowotworowych.

Moja drobna uwaga do tego rozdziału dotyczy rozbieżności w charakteryzowanych przez Autorkę białek z rodziny Hsp90 w zwijaniu polipeptydów. Na str. 45, w Tabeli 1.4. Autorka opisując funkcje Hsp90 jako; „Foldazy dla białek syntetyzowanych de novo...”, a następnie na stronie 48 sugeruje, że rodzina tych białek nie bierze udziału w fałdowaniu nowopowstałych białek. Jaki jest zatem aktualny stan wiedzy w tym temacie?

Z uwagi na metodyczny charakter pracy doktorskiej, Autorka precyzyjnie przedstawia materiały oraz szczegółowo opisuje wykorzystane w pracy techniki badawcze dotyczące hodowli komórkowych, charakteryzuje wykorzystane w pracy linie komórkowe, i opisuje systemy ekspresyjne do nadprodukcji transportera SLC6A14 w transferowanych komórkach. Następnie przedstawia zaawansowane techniki zmierzające do weryfikacji hipotezy badawczej związanej m.in. z funkcjonalną interakcją białek Hsp z transporterem SLC6A14. Na koniec, Doktorantka prezentuje metodykę dotyczącą analizy toksyczności stosowanych inhibitorów Hsp oraz SLC6A14 na wybrane nowotworowe linie komórkowe. W omawianym rozdziale, Doktorantka przedstawia również metodę dot. pomiarów aktywności chaperonowej Hsp90-beta. Nie mogę jednak odnaleźć informacji w jaki sposób pozyskano rekombinowane białko Hsp90-beta do analiz. W pracy zabrakło również w mojej ocenie informacji dotyczącej wykorzystywanej techniki do analizy proteomu wykazującej interakcję SLC6A14 z białkami Hsp. Proszę zatem Doktorantkę o ustosunkowanie się do powyższych uwag.

Pierwszym etapem pracy eksperymentalnej było potwierdzenie faktycznego oddziaływania wybranych białek Hsp z nadprodukowanym w komórkach linii HEK293 transporterem SLC6A14 z wykorzystaniem immunoprecypitacji, mikroskopii immunofluorescencyjnej, czy testu ligacji zbliżeniowej. Na podstawie ww. rzetelnie przeprowadzonych analiz, Doktorantka udowodniła istnienie takiej interakcji. Dalej wykazała, że ta interakcja jest zależna od aktywności chaperonowej Hsp70 oraz Hsp90 stosując odpowiednio inhibitor VER155008 oraz radicicol. W pracy Autorka wykazała również, że stosowane inhibitory w sposób istotny wpływają na ilość oraz transport

SLC6A14 do błony komórkowej. Ponadto udowodniła, że zahamowanie aktywności opiekuńczej omawianych białek Hsp prowadzi do proteasomalnej degradacji SLC6A14. Doktorantka w swojej pracy podjęła się również trudnego zadania polegającego na określeniu stopnia modyfikacji aktywności Hsp90-beta w interakcji z SLC6A14. W tym celu wykorzystano kilka fragmentów peptydów homologicznych do wybranych sekwencji aa. SLC6A14. Na podstawie analiz wykazano, że zlokalizowane w C-terminalnej domenie fragmenty białka SLC6A14 mogą pozytywnie lub negatywnie modulować aktywność Hsp90-beta. Omawiana interakcja została również potwierdzona z wykorzystaniem termoforezy mikroskalowej. W analogiczny sposób, z wykorzystaniem technik mikroskopii immunofluorescencyjnej, Doktorantka wykazała interakcję SLC6A14 z białkami Hsp w nieco bardziej fizjologicznych warunkach, tj. bez nadprodukcji tego pierwszego.

W drugiej części pracy, Autorka postanowiła zweryfikować hipotezę dotyczącą udziału białek Hsp lub białka SLC6A14 w przeżywalności komórek nowotworowych. Pierwszym etapem było potwierdzenie podwyższonej ekspresji białka Hsp90-beta w analizowanych liniach nowotworowych, z wykorzystaniem immunoblotingu. Autorka potwierdzała również interakcję pomiędzy Hsp90-beta a białkiem SLC6A14 w układzie *in vivo* w komórkach nowotworowych (ER-alpha+) z wykorzystaniem testu ligacji zbliżeniowej. Co ciekawe zahamowanie aktywności Hsp90-beta przerywało tę interakcję i prowadziło do spadku ilości SLC6A14 na powierzchni traktowanych komórek oraz jego aktywności.

Ostatnim etapem prac była analiza wpływu inhibitorów Hsp90, SLC6A14 oraz ich kombinacji na przeżywalności komórek nowotworowych. Analiza z wykorzystaniem testu CellTox Green wykazała, że kombinacja inhibitorów Hsp90 i SLC6A14 działa synergistycznie na żywotność analizowanych komórek. W tym miejscu należy zaznaczyć, że toksyczność analizowanych inhibitorów była również obserwowana w wariacie kontrolnym, tj. w hodowli linii komórek prawidłowych (MCF 10A). Zatem mam pytanie do Doktorantki, czy istnieją niższe, ale wciąż toksyczne wobec linii komórek nowotworowych, stężenia analizowanych inhibitorów, które nie są toksyczne dla linii

prawidłowej? Ponadto pragnę zauważyć, że o ile Autorka korzystając z bardzo bogatego warsztatu badawczego udowodniła fizyczne oraz funkcjonalne oddziaływanie białka Hsp90-beta z SLC6A14 w układzie *in vitro* oraz *in vivo*, to zastosowanie inhibitora radicicol, może nie dawać pełnego (w ostatnim układzie doświadczalnym) obrazu dot. roli Hsp90-beta jako celu terapeutycznego. Jest on bowiem inhibitorem, który hamuje aktywność wszystkich czterech homologów Hsp90, a nie tylko Hsp90-beta. Poza tym, dlaczego Doktorantka nie zdecydowała się na analogiczne doświadczenia z wykorzystaniem inhibitora Hsp70?

W rozdziale Dyskusja, Doktorantka w sposób wyczerpujący konfrontuje wyniki uzyskane w trakcie swojej pracy eksperymentalnej z opublikowanymi danymi z ostatnich lat. Autorka w tym rozdziale skupia się głównie na istocie podjętego problemu badawczego dotyczącego udziału białek szoku termicznego w kontroli jakości transporterów błonowych z rodziny SLC oraz modyfikacji aktywności Hsps i wspomnianych transporterów w kontekście terapii chorób nowotworowych. Uważam za niezwykle cenne i w pełni uprawnione zaprezentowanie graficznych schematów i umieszczenie ich w rozdziale Dyskusja (Ryc. 5.1 oraz 5.), które dotyczą (i) współdziałania białek Hsp90 i Hsp70 w transporcie SLC6A14 z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego lub (ii) wskazują na synergistyczne działanie inhibitora Hsp90 oraz SLC6A14 na przeżywalność komórek nowotworowych. Na końcu, pracy Autorka przedstawia osiem uprawnionych wniosków klarownie sformułowanych w oparciu o uzyskane wyniki badań, załącza pokazną, bowiem liczącą aż 333 pozycji literaturowych bibliografię oraz wskazuje na dwie pozycje własne, w których opublikowano wyniki szczegółowo przedstawione w ocenianej dysertacji.

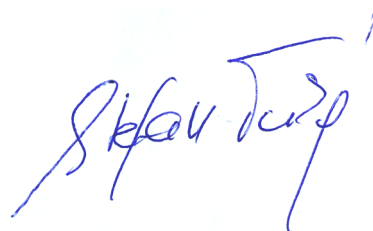
Nie mam do pracy doktorskiej uwag natury edytorskiej. Praca napisana jest klarownym stylistycznie i poprawnym naukowo językiem. Eksperymenty zostały logicznie zaplanowane i starannie przeprowadzone, a zaprezentowane i przedyskutowane wyniki potwierdzają wysoki poziom specjalistycznej wiedzy Pani mgr Połosak. Rozprawa doktorska niewątpliwie wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia badań przez Doktorantkę i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu

naukowego. Uważam, że praca doktorska jest źródłem wiedzy, która w niedalekiej przyszłości może zostać wykorzystana w praktyce.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z póź. zm). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr Karoliny Połosak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie z uwagi na ogrom starannie wykonanej pracy doświadczalnej i uzyskanie wyników o wysokich walorach naukowych oraz silnym potencjale aplikacyjnym, jak również ze względu na wiodący udział Doktorantki w powstaniu artykułów prezentujących te wyniki - opublikowanych w wysoko notowanych czasopismach naukowych, wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o stosowane wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Połosak.

Prof. Stefan Tukaj



Rada Naukowa
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Karoliny Połosak

pt. „Oddziaływanie transportera aminokwasów SLC6A14/ATB^{0,+} z białkami szoku cieplnego –
rola w przeżywalności komórek raka piersi.”

OCENA FORMALNA I MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Połosak została wykonana w Pracowni Procesów Transportu w Błonach Biologicznych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Funkcję promotora rozprawy powierzono Pani prof. dr hab. Katarzynie Nałęcz.

Celem przedłożonej do recenzji rozprawy było wykazanie interakcji między transporterem aminokwasów SLC6A14/ATB^{0,+} i białkami szoku cieplnego oraz zweryfikowanie ich roli w regulacji aktywności transportera SLC6A14 w wybranych liniach komórkowych raka piersi.

Podjęta tematyka jest naturalną konsekwencją badań prowadzonych przez Panią prof. Nałęcz i wpływa z wieloletnich zainteresowań naukowych Pani Promotor, skupiających się konsekwentnie na molekularnych mechanizmach regulacji transporterów błony plazmatycznej i transportu. Wybór tematu rozprawy jest aktualny, oryginalny i ważny poznawczo, a podjęte przez Doktorantkę zagadnienia uzasadnione. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią istotny element poznawczy w danym obszarze nauki.

Wyniki badań będących podstawą pracy doktorskiej mgr Połosak zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach realizacji projektu nr 2015/19/B/NZ3/00049 pozyskanego przez Panią Promotor w konkursie OPUS 15.

Rozprawa doktorska posiada klasyczny układ, typowy dla prac doktorskich składanych w postaci tradycyjnej monografii; poszczególne części rozprawy tj.: strona tytułowa, spis treści, informacja o źródle finansowania badań, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cel pracy, opis stosowanych metod, omówienie wyników, dyskusja, podsumowanie i wnioski, bibliografia oraz lista publikacji, w których zostały opublikowane wyniki, zostały przedstawione na 141 stronach maszynopisu. Tytuł pracy odzwierciedla jej treść. Wszystkie części rozprawy zostały poprawnie przygotowane, pewne zastrzeżenia mam do sekcji Wyniki i do tej części rozprawy bardziej szczegółowo odniosę się w dalszej części recenzji. Piśmiennictwo, bardzo obszerne, liczące 333 pozycje, zostało prawidłowo dobrane, również z uwzględnieniem aktualnych pozycji literaturowych.

Podział treści pomiędzy poszczególne rozdziały nie jest równomierny. Wstęp, liczący 37 stron jest wyjątkowo obszerny, i obejmuje szczegółowe informacje wprowadzające i charakteryzujące m.in. proces nowotworzenia, charakterystykę transporterów aminokwasowych związanych z nowotworami, w tym: szczegółową charakterystykę rodziny transporterów SLC6 i obiekt zainteresowań Doktorantki: białko SLC6A14/ ATB^{0,+}. Sekcja ta zawiera również opis i charakterystykę rodzin białek szoku cieplnego, ze zwróceniem uwagi na białka rodziny HSP90,

i ich rolę w procesie nowotworzenia. Ten długi i szczegółowy tekst został wzbogacony zapożyczonymi, nieco zmodyfikowanymi ilustracjami; natomiast część informacji została przedstawiona w formie tabelarycznej, co częściowo ułatwiło przekaz i przyswojenie informacji.

W tym miejscu mam komentarz, który nasunął się w trakcie czytania. Zastąpienie obszernej, a w kontekście tematu rozprawy, raczej niewiele wnoszącej Tabeli 1.2., dotyczącej opisanych w literaturze korelacji między poszczególnymi transporterami należącymi do rodziny SLC6, a różnymi chorobami występującymi u ludzi, tabelą zawierającą wybrane informacje dotyczące związku między badanym transporterem SLC6A14 i chorobami występującymi u ludzi, w szczególności zaś, z nowotworami, byłoby bardziej wartościowe i pomocne w szybszej weryfikacji treści. Dodatkowo, w pracy kilkakrotnie przewija się informacja, że zwiększona ilość transportera SLC6A14 nie występuje we wszystkich typach nowotworów, co dodatkowo wzbudza zainteresowanie czytającego mechanizmem indukcji i ogólnego znaczenia transportera dla przebiegu procesu nowotworowego.

Sekcja Materiały i Metody zawiera niezbędne informacje, które umożliwiają zapoznanie się z zastosowanymi technikami i pozwalają na powtórzenie doświadczeń. W tej części rozprawy Doktorantka wyczerpująco opisała wykorzystane modele badawcze (hodowla linii komórek HEK 293; linie komórek raka piersi, jak również odpowiednie linie kontrolne) oraz stosowane techniki i procedury badawcze, którymi się posługiwała. Zamieszczono informację o pochodzeniu linii nowotworowych i potwierdzeniu ich tożsamości (ATTC® grudzień 2019 rok). W formie tabelarycznej skrupulatnie przedstawiono wykorzystane materiały zużywalne, odczynniki, przejrzyste dzieląc i opisując skład roztworów, buforów, czy listę przeciwciał, z uwzględnieniem ich pochodzenia.

Rozdział wyniki podzielono na jedenaście podrozdziałów i jest to obszerna dokumentacja badań, poparta szesnastoma złożonymi rycinami. Zamieszczone ryciny, tabele i zdjęcia są odpowiedniej jakości i rozdzielczości nie budzącej zastrzeżeń. Autorka stosuje w tej sekcji język dość opisowy, dodatkowo wyjaśniając cel każdego przeprowadzonego eksperymentu, wprowadza fragmenty teoretyczne, jak również odnoszące się bezpośrednio do zastosowanej metodyki (np.: str. 73, pierwszy akapit; str. 77, linia 24-25; str. 81). Przyjęta forma jest oczywiście dopuszczalna, chociaż momentami sprawia wrażenie przekazu dość uogólnionego.

Do najważniejszych osiągnięć uzyskanych przez Doktorantkę zamieszczonych w dysertacji należy zaliczyć:

1. Zweryfikowanie oddziaływania białka ATB^{0,+} z białkami szoku cieplnego HSP90-beta i HSPA14 w komórkach HEK293 poddanych stabilnej transfekcji wektorami p3xFLAG-CMV14 lub p3xFLAG-CMV14/B⁰⁺ (z wykazaniem bezpośredniego oddziaływania C-końca białka SLC6A14 z HSP90-beta) oraz w liniach komórkowych z ekspresją receptora estrogenowego alfa (ER⁺): MCF7 (metoda immunofluorescencji i test ligacji zbliżeniowej) oraz BT-474 i T-47D (test ligacji zbliżeniowej) (Połosak i wsp., 2022).
2. Wykazanie, że zastosowanie inhibitorów HSP zmniejszyło ilość SLC6A14 w błonie komórkowej komórek HEK293 w warunkach nad-ekspresji białka oraz w liniach komórkowych ER⁺: MCF7 (inhibitory: radicicol i VER155008) oraz T-47D, BT-474 (radicicol) (Rogala-Koziarska i wsp., 2019).
3. Wykazanie, że w procesie kontroli łańcuchowania białka SLC6A14 w komórkach HEK293 w warunkach nad-ekspresji badanego białka, biorą udział HSP, kierując nieprawidłowo sfałdowane białka na szlak degradacji (Rogala-Koziarska i wsp., 2019).

4. Wykazanie silnego cytotoksycznego efektu synergistycznego działania inhibitorów transportera SLC6A14 i HSP90-beta w komórkach wszystkich badanych linii (Połosak i wsp., 2022).

Wyniki odnoszą się do postawionych w założeniach dysertacji celów, które jak już wspomniano, stanowiły podstawę do opublikowania dwóch prac oryginalnych: Rogala-Koziarska i wsp., (2019) *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866(10):1544-1555 oraz Połosak i wsp., (2022) *Biochem Biophys Res Commun* 614:41-46. W obu wymienionych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem; w jednej pracy pełni równolegle z pozostałymi autorami rolę autora do korespondencji. Warto nadmienić, iż w przypadku zadań badawczych wykonanych przez innych autorów, odpowiednia informacja znalazła się również w tekście.

W dyskusji, objętościowo skromniejszej, mieszczącej się na 10 stronach, Autorka odnosi wyniki swoich badań do wiedzy literaturowej, w tym zarówno wcześniejszych badań zespołu, jak i prac badawczych innych zespołów, w większości aktualnych. Do drobnych niedociągnięć w tej części należy zaliczyć powtarzanie pewnych informacji i interpretacji. Bibliografia jak wspomniałam jest bardzo obszerna, sugeruje, że Doktorantka swobodnie porusza się w swojej tematyce i śledzi najnowsze doniesienia literaturowe. Pomocna dla podsumowania wyników pracy jest rycina przedstawiająca schematycznie udział białek HSP w regulacji transportera SLC6A14 pochodząca z publikacji Rogala-Koziarska i wsp., (2019), która stanowi dobrą ilustrację omawianych procesów.

Mam komentarz do sekcji 6 (Podsumowanie i wnioski), której w mojej opinii Doktorantka nie poświęciła wystarczającej uwagi. W sekcji nie ma całościowego podsumowania, a niektóre punkty są sformułowane zbyt ogólnikowo. Wyszczególnione 8 punktów nie tworzą harmonijnego przekazu i całościowego wniosku podkreślającego i odpowiadającemu wykonanej pracy i konkludującego realizację postawionych założeń. W punkcie pierwszym czytamy: cyt.: *Proteom transportera aminokwasów SLC6A14 zawiera białka szoku cieplnego (HSP)*. Zadanie to w świetle zawartych w dysertacji informacji nie został wykonany przez Kandydatkę. Tabela 1.3. wykrytych w proteomie SLC6A14 białek HSP została przedstawiona na stronie 44 Wstępu, a co wynika z podpisu pod Tabelą, analiza proteomiczna została wykonana przez dr Łukasza Samluka. Pomimo faktu, iż wyniki te stanowią część pracy oryginalnej autorstwa Rogala-Koziarska i wsp., (2019), nie widzę podstaw do umieszczenia tego punktu jako wniosku płynącego z zamieszczonych w dysertacji wyników. Brak precyzji odnajduję w punkcie piątym i siódmym: cyt. odpowiednio: *Proces fałdowania białek błony plazmatycznej może być kontrolowany nie tylko przez chaperony siateczki śródplazmatycznej, ale także te zlokalizowane w cytoplazmie; Synteza transportera jest niższa w kontrolnych liniach nienowotworowych, a znacznie wyższa w nowotworowych liniach ER- α^+* . Wniosek pierwszy można z powodzeniem przypisać innym tego typu pracom, zaś w odniesieniu do punktu siódmego, skoro Doktorantka nie analizowała syntezy białka, może o tym wnioskować jedynie pośrednio.

W omawianej części dotyczącej podsumowania i wniosków badań, wydaje się, że właściwszą byłaby sprawdzona formuła edytorska bezpośrednio odnosząca się do postawionych w formie punktów Celów badań. Dodatkowo, Doktorantka unika jakiegokolwiek chronologii w przedstawieniu wniosków, chociażby zbieżnej z kolejnością zamieszczonych w dysertacji wyników, jak również pomija szczegóły dotyczące warunków doświadczenia (np. nad-ekspresja w HEK293 czy linie komórkowe raka piersi). Sposób przedstawienia tej sekcji dalece utrudnia potraktowanie wyników całościowo i konkluzywnie.

Nasuujące się uwagi i komentarze:

1. Wstęp (str. 27), proszę o doprecyzowanie i wyjaśnienie informacji dotyczącej „sprzężenia transporterów” - w szczególności sprzężenia transporterów xCT oraz badanego ATB^{0,+} - w zdaniu: cyt.: *Dodatkowo, transportery (chodzi tu o transportery LAT1, xCT, ASCT2, ATB^{0,+}) są funkcjonalnie sprzężone, co maksymalizuje ich funkcje takie jak zdolność do proliferacji i chemiooporności komórek nowotworowych.* Doktorantka stworzyła czytającemu pewną niekonsekwencję w odniesieniu do akapitu zamieszczonego powyżej cyt. ...*tak więc różne nowotwory polegają na innym zestawie transporterów aminokwasów.*

2. Wstęp (str. 29); podwyższoną ekspresja transportera xCT obserwuje się w różnego typu komórkach nowotworowych, co ułatwia syntezę GSH, równolegle biorąc udział w mechanizmie oporności komórek na stosowaną farmakoterapię. Ponieważ zahamowanie aktywności xCT powoduje w komórkach nowotworowych zmiany metaboliczne oraz indukcję stresu oksydacyjnego, istotna jest ocena potencjału stosowanej ingerencji wiedząc, że komórki nowotworowe posiadają możliwości adaptacyjne do warunków stresowych, prowadząc do pojawienia się bardziej złośliwego fenotypu. Prosiłabym o ewentualne rozwinięcie tematu odnosząc się do zdobytego doświadczenia i wiedzy w zakresie znaczenia obserwacji dotyczących białka xCT.

3. Skoro wzrost poziomu transportera SLC6A14 nie jest zjawiskiem powszechnym i nie występuje we wszystkich nowotworach, a obserwowany jest w przypadku kilku nowotworów pochodzenia nabłonkowego (tj.: raku okrężnicy, raku szyjki macicy, niektórych podtypach raka piersi, raku trzustki) prosiłabym o komentarz i odniesienie się do kwestii co dodatkowo może determinować tę obserwację.

4. Oddziaływanie między HSP90-beta i SLC6A14 Autorka wykazała również w nienowotworowych komórkach kontrolnych linii MCF10A, wraz z hamującym efektem 40 μ M radicicolu. Istotnie, znormalizowana do liczby jąder intensywność fluorescencji sygnału PLA linii MCF10A jest na poziomie ~40, zaś w liniach T-47D i BT-474 na poziomie ~60-70 (Ryc. 4.13). Skoro różnicujący efekt radicicolu w odniesieniu do ilości białka SLC6A14 na powierzchni komórek obserwowano przy 40 μ M stężeniu inhibitora (komórki kontrolne nie reagowały, komórki nowotworowe reagowały, natomiast w stężeniu 60 μ M reagowały wszystkie typy komórek; Ryc. 4.14), prosiłabym o rozwinięcie i wyjaśnienie znaczenia obserwowanego efektu w komórkach kontrolnych linii MCF10A.

5. Doktorantka wnioskuje, że cyt.: *interakcja HSP90-beta/SLC6A14 może odgrywać istotną rolę w transporcie L-leucyny w komórkach raka piersi* (str. 97, ostatnie zdanie), proszę o komentarz jakie może być znaczenie wykazanej w teście PLA interakcji tych białek (Ryc. 4.13) w komórkach kontrolnych MCF10A, w których nie obserwowano istotnie znamiennej akumulacji L-leucyny.

6. Uwagi redakcyjne i językowe:

-Kandydatka nie ustrzegła się kolokwializmów i stosowania mało precyzyjnego języka; informacje czasami przedstawione są bardzo ogólnie, a forma zawartych treści nie ma charakteru języka naukowego. Przykłady: str. 77: inhibitory nie wpływają na test sam w sobie; str. 77: stężenia odpowiednie do zahamowania HSP90 i HSPA14; str. 93: interakcję tę obserwowano na wyższym poziomie w liniach komórek nowotworowych; str. 51: złośliwe procesy; str. 88, 97: gwiazdki wskazują znaczącą zmianę; str. 101: język biologii raka; str. 107: badania ksenograficzne.

-Brakuje konsekwencji w stosowaniu skrótów.

-Nieprecyzyjny podpis Ryc. 4.4. „traktowano tam gdzie zaznaczono” – prawdopodobnie chodziło o „związkiem który zaznaczono”; również nieprecyzyjne stwierdzenie w podpisie Ryc. 4.5. „GAPDH stanowi kontrolę czystości frakcji biotynylowanej”; w zapisie liczbowym w języku polskim stosujemy przecinki, nie kropki.

-Tytuł podrozdziału 4.8. w sekcji Wyniki jest niewłaściwy; Doktorantka nie prowadziła badań *in vivo*.

PODSUMOWANIE

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki biologiczne, i stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego poznawczo i wymagającego metodycznie problemu naukowego. Właściwie zaplanowane i rzetelnie przeprowadzone badania, z zastosowaniem złożonego warsztatu metodycznego i odpowiednich kontroli, pozwoliły na zweryfikowanie interakcji między transporterem SLC6A14 a białkami HSP w procesie eksportu białka z siateczki śródplazmatycznej oraz wskazania roli białka HSP90-beta w regulacji aktywności badanego transportera w wybranych liniach komórkowych raka piersi. Uzyskane wyniki mają nowatorski i oryginalny charakter o dużym potencjale poznawczym, wskazującym na możliwość ich terapeutycznego rozwinięcia w przyszłości.

Doktorantka sprawnie posługuje się różnymi technikami biologicznymi i wykorzystuje je do rozwiązywania stawianych problemów naukowych. Potrafi jasno przedstawić wyniki badań i interpretować ich znaczenie w odniesieniu do istniejącej literatury. Pani mgr Karolina Połosak wykazała się rozległą wiedzą, samodzielnością, a także zdolnością krytycznej analizy danych, co umożliwia podejmowanie wymagających wyzwań naukowych w przyszłości, a przedstawiona rozprawa doktorska dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska ma charakter oryginalnej pracy doświadczalnej, której jakość została potwierdzona opublikowaniem wyników w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Karoliny Połosak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Prof. dr hab. n. med. Magdalena Zielińska

Kraków, 31 sierpnia 2024



Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Połosak pt.
"Oddziaływanie transportera aminokwasów SLC6A14/ATB^{0,+} z białkami szoku cieplnego – rola w przeżywalności komórek raka piersi"

Uniwersytet Jagielloński
w Krakowie

Wydział Biochemii, Biofizyki
i Biotechnologii

prof. dr hab.
Jarosław Czyż

Choroba nowotworowa pozostaje i w najbliższej przyszłości pozostawać będzie istotnym problemem klinicznym i społecznym współczesnego świata. Na jej etiopatogenezę składa się wiele procesów, które prowadzą do długotrwałej mikroewolucji genetycznej i epigenetycznej komórek, i nabywania przez nie nowych cech ułatwiających ich ekspansję i kolonizację sąsiednich tkanek. Wśród nich na pierwszy plan wysuwa się zdolność do uporczywej proliferacji, która wymyka się klasycznym mechanizmom tkankowym regulującym ten proces w komórkach „zdrowych”. Proces ten wymaga jednak energii i budulca, a do tego z kolei jest niezbędne ukonstytuowanie wydajnych systemów transportujących aminokwasy, nukleotydy, cukry i kwasy tłuszczowe przez błony biologiczne, w szczególności błonę komórkową. Systemy tego typu są nadaktywne w wielu nowotworach, a jednym z ich kluczowych składników pozostaje białko ATB^{0,+}, które jest transbłonowym transporterem aminokwasów, kodowanym przez gen *SLC6A14*. Ponieważ transporter ten charakteryzuje się szeroką specyficznością substratową, jego aktywność wydaje się być kluczową dla rozwoju stanów wywołujących zwiększone zapotrzebowanie komórek na aminokwasy, w tym nowotworów. Rzeczywiście poziomy ATB^{0,+} (*SLC6A14*) są często podniesione w komórkach budujących nowotwory, w tym nowotwory piersi, co czyni to białko potencjalnie użytecznym przy opracowywaniu nowych strategii leczenia tego nowotworu, tym bardziej, że zaobserwowano również jego zaangażowanie w transbłonowy transport leków. Przedstawiona do oceny rozprawa wpisuje się w badania nad potencjałem tego transportera, ponieważ jej celem było określenie roli oddziaływań między transporterem ATB^{0,+} a białkami HSP w regulacji jego funkcji. W szczególności w jej ramach przeprowadzono identyfikację mechanizmów odpowiedzialnych za interakcje transportera ATB^{0,+} z białkami szoku cieplnego HSP70 i HSP90beta, analizy ich roli w regulacji funkcji tego transportera oraz ich znaczenia dla fizjologii komórek raka piersi. Powiązania między aktywnością transporterów błonowych a rozwojem nowotworów, a także mechanizmy regulacji ich funkcji i ich losów w komórce, oraz możliwości wykorzystania tych powiązań w terapii nowotworów stanowi nierozwiązany problem badawczy. Dlatego podjęcie tej tematyki uważam za w pełni uzasadnione. Wraz z faktem opublikowania części wyników zamieszczonych w rozprawie w czasopiśmie o uznanej międzynarodowej renomie (*Biochimica et Biophysica Acta (Mol. Cell. Res.)*, 2019 i *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, 2022), przełożyło się to na jednoznacznie pozytywną ocenę całej rozprawy, niezależnie od kilku uwag i pytań, które postawiłem w dalszej części recenzji.

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48(12) 664 6146
fax +48(12) 664 69 02
e-mail: jarek.czyz@uj.edu.pl

Rozprawa została skonstruowana w sposób typowy dla tego typu prac: składa się na nią obszerny Wstęp, rozdziały opisujące Materiały i Metody, oraz Wyniki, a także ich Dyskusja. Dobrze skompilowane streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim w syntetyczny sposób oddają jej treść i przesłanie, a lista skrótów ułatwia lekturę pracy (choć umieszczenie na niej niektórych z nich, np. BSA, DMEM czy PBS, wydało mi się „nadmiarowe”). Całość kończy Podsumowanie i bardzo obszerna bibliografia, która liczy ponad 330 pozycji (zarówno oryginalnych prac doświadczalnych, jak i artykułów przeglądowych). Objętość pracy pozostaje w dobrej proporcji do ilości opisanych danych: liczy ona 141 stron, 29 rycin, w tym 16 złożonych rycin ilustrujących uzyskane wyniki, oraz szereg tabel (które przede wszystkim wyszczególniają wykorzystane w pracy odczynniki i plazmidy). Pod względem edytorskim rozprawa została przygotowana poprawnie. W czasie jej lektury natknąłem się w prawdzie na niedociągnięcia stylistyczne i leksykalne; wpisane są one jednak w przygotowanie dużych monografii i pozostają bez wpływu na ogólną ocenę rozprawy.

Przedmiot badań opisanych w rozprawie został wszechstronnie omówiony w 38-stronnicowym Wstępie, gdzie Autorka po pierwsze w syntetyczny sposób skompilowała aktualny stan wiedzy na temat mechanistycznych podstaw rozwoju nowotworów, po czym na tym tle rozrysowała obraz wiedzy na temat transporterów błonowych i ich roli w rozwoju nowotworów. W oparciu o zestaw cech kluczowych dla tego procesu oryginalnie zdefiniowanych przez Hanahana i Weinberga (2000), kolejno omówiła ona systemy leżące u podstaw deregulacji proliferacji i apoptozy komórek nowotworowych, nabywania przez nie „nieśmiertelności” i niezależności od czynników wzrostowych, oraz rozwoju ich inwazyjności i plastyczności metabolicznej. W dalszej kolejności Autorka przeszła do opisu transporterów błonowych, ich znaczenia dla funkcjonowania komórek i regulacji ich funkcji. Ta część została spuentowana dogłębnym opisem właściwości transportera $ATB^{0,+}$, a w szczególności jego budowy i specyfiki, i mechanizmów warunkujących jego funkcje. Wreszcie Autorka skoncentrowała się na białkach chaperonowych i ich znaczeniu dla dobrostanu komórek. Choć zabrakło mi choćby krótkiego nawiązania do roli cytoszkieletu w wewnątrzkomórkowym transporcie i kompartmentacji transporterów i białek opiekuńczych, całość ma wymiar nieledwie epicki. Tę część rozprawy czyta się płynnie, a styl i rozłożenie akcentów wskazuje na dobrą orientację Autorki w tematyce związanej z rozprawą. Ilustracje wplecione w tekst Wstępu wspomagają percepcję jego treści, a całość po niewielkich w sumie korektach mogłaby stanowić podstawę poczytnego artykułu przeglądowego. Reasumując Wstęp prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Autorki, w tym wiedzę związaną z tematem rozprawy i dobrze wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy.

Również rozdział, w którym opisane zostały Cele pracy, został sformułowany w klarowny sposób. Uznano za nie: weryfikację roli interakcji między transporterem $ATB^{0,+}$ a HSP70 i HSP90beta w procesach eksportu tego transportera z siateczki śródplazmatycznej do błony komórkowej oraz roli białka HSP90beta w regulacji jego aktywności (w szczególności w komórkach nowotworowych). Choć brakuje explicite wyrażonej hipotezy roboczej, taki obraz celów pracy w spójny sposób ilustruje oryginalny problem naukowy i współgra z brzmieniem krótkiego podsumowania tła opisanych w rozprawie badań, również zawartym w tym rozdziale. Z obowiązku recenzenta muszę

jednak zwrócić uwagę na pewną nieścisłość w opisie powiązań między szybkością proliferacji komórek a lokalną podażą aminokwasów. Szybka proliferacja wzmaga popyt (!) komórek na aminokwasy, a dopiero to powoduje konieczność utrzymania ich wysokiej podaży w niszach nowotworowych.

Zarówno wachlarz jak i opis zastosowanych w pracy metod zasługuje na uznanie. W analizach interakcji transportera z białkami HSP90 i HSP70 wykorzystano model badawczy oparty na stabilnej transfekcji komórek linii HEK293 genem kodującym ometkowaną formę ATB^{0,+}, a doświadczenia dotyczące roli tego transportera w rozwoju nowotworów piersi przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu linii komórek tego nowotworu różniących się pochodzeniem i potencjałem inwazyjnym. Z kolei do analiz funkcjonalnych Autorka, oprócz technik edycji genomu, wykorzystywała zestaw zaawansowanych technik biologii molekularnej, w tym: ko-immunoprecypitację, analizy biotynylacji białek powierzchniowych, analizy aktywności ATPazy, termoforezę mikroskalową, immunocytochemię, technikę ligacji zbliżeniowej i analizy transportu znakowanej izotopowo leucyny. Wsparte one zostały technikami wizualizacji struktur sub-komórkowych z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej (w tym konfokalnej), a także techniką hybrydyzacji typu western i testem żywotności komórek. Zastosowane w pracy techniki doświadczalne są względem siebie komplementarne a ich opis jest w większości precyzyjny (być może z wyjątkiem opisu zasady testu ligacji zbliżeniowej) i stwarza możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń, oczywiście przez osobę dysponującą odpowiednią wiedzą i sprzętem.

Część doświadczalna recenzowanej pracy przedstawiona została w sposób z jednej strony zwięzły, a z drugiej przystępny: łatwo było uchwycić ciągi przyczynowo-skutkowe, którymi kierowała się Autorka wykonując kolejne doświadczenia. W pierwszej części pracy, zajęła się ona interakcjami receptora ATB^{0,+} z innymi białkami z wykorzystaniem modelu doświadczalnego opartego na indukcji ekspresji jego ometkowanej formy w komórkach HEK293. Interakcje receptora z białkami szoku cieplnego zostały wykazane z wykorzystaniem immunoprecypitacji i immunofluorescencji, a bezpośrednie oddziaływanie tych białek ostatecznie potwierdzono testem termoforezy mikroskalowej i ligacji zbliżeniowej. Z kolei technika biotynylacji białek powierzchniowych potwierdziła powierzchniową lokalizację transportera. Wreszcie zastosowanie chemicznych inhibitorów HSP90beta (radicolu) i HSP70 (VER155008) pozwoliło wykazać rolę obu tych białek w regulacji konformacji i transportu transportera. Prezentacja tej części wyników i ich wstępna interpretacja jest spójna i logiczna, a same wyniki nie wzbudzają wątpliwości.

W drugiej części pracy zanalizowano rolę interakcji między transporterem ATB^{0,+} a białkiem HSP90 w regulacji aktywności ATPazy podjednostki beta tego białka w układzie in vitro. Mierzono ją z wykorzystaniem złożonego modelu doświadczalnego opartego na pomiarach aktywności ATPazy HSP90beta w obecności wybranych fragmentów N- i C-końca transportera ATB^{0,+}. Na podstawie tych analiz wytypowano dwa fragmenty C-końca zlokalizowanego w okolicy 12 domeny transbłonowej transportera, które w przeciwstawnym sposobie modulowały tę aktywność. Uzyskane wyniki pokazały zaangażowanie C-końcowego fragmentu transportera w regulację aktywności HSP90beta. Na tej podstawie rzeczywiście można wnioskować o roli tego fragmentu nie tylko w transporcie białka do błony plazmatycznej, ale i w

prawidłowym fałdowaniu transportera $ATB^{0,+}$. Trudno jednak nie zapytać, czy również w natywnej cząsteczce $ATB^{0,+}$ oba fragmenty mogą zachować swoje przeciwstawne aktywności, a jeśli tak, to jakie mogłoby być znaczenie biologiczne takiego stanu rzeczy.

W ostatniej części swojej rozprawy, Autorka skoncentrowała się na biologicznych konsekwencjach interakcji między $ATB^{0,+}$ i HSP90beta w komórkach nowotworowych raka piersi różnych typów. Analizy te pozwoliły wykazać, że HSP90beta pełni rolę regulatora funkcji endogennego transportera $ATB^{0,+}$ w tych komórkach. Bezpośrednie oddziaływanie transportera z HSP90beta potwierdzone w teście ligacji zbliżeniowej pozostawało na znacznie wyższym poziomie w liniach nowotworowych. Również wychwytywanie radioaktywnej leucyny (substratu dla badanego transportera) spadał po traktowaniu inhibitorem HSP90beta w komórkach raka piersi z obecnym receptorem estrogenowym ($ER\alpha^+$). Radicol istotnie zmniejszał wydajność interakcji między transporterem $ATB^{0,+}$ i HSP90beta, co potwierdza zaangażowanie HSP90 w regulację aktywności tego transportera. Wysoka śmiertelność komórek po traktowaniu α -metylotryptofanem i radicolem, i synergia ich działania w niskim stężeniu z kolei potwierdza znaczenie biologiczne tych interakcji. Warto jednak zadać pytanie, dlaczego plastyczne ze swej natury komórki nowotworowe tak gwałtownie (wzrostem śmiertelności) reagują na deficyt leucyny.

Wyniki uzyskane w ramach rozprawy pozwoliły Autorce na postawienie kilku podstawowych wniosków. Po pierwsze, oddziaływania transportera $ATB^{0,+}$ z białkami HSP kontrolują poprawne fałdowanie i eksport transportera między przedziałami komórkowymi. W przypadku HSP90 oddziaływania te zależne są od C-końcowej domeny transportera, która reguluje aktywność ATPazy białka HSP90beta, a zahamowanie aktywności tego białka przekłada się na upośledzenie funkcji transporterowej $ATB^{0,+}$. Zjawisko to i jego skutki są szczególnie widoczne w komórkach nowotworowych, co może wynikać z ich większego zapotrzebowania na aminokwasy oraz wskazuje na możliwość wykorzystania tych interakcji przy opracowywaniu nowych strategii leczenia nowotworów. Omówienie tych kwestii znalazło się w dobrze ustrukturalizowanej Dyskusji uzyskanych wyników. Oparta ona została na aktualnie dostępnych danych literaturowych, w tym na wcześniejszych wynikach dotyczących tego i innych transporterów z rodziny SLC uzyskanych przez zespół prof. Katarzyny Nałęcz. Konkluzje wynikające z uzyskanych w ramach rozprawy danych są przekonujące a całość Dyskusji, wraz z wachlarzem metod wykorzystanych w pracy i uzyskanymi wynikami, potwierdza ogólną wiedzę Autorki i wykazuje jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przy lekturze tej części pracy, nasunęło mi się jednak kilka pytań:

- czy potencjał błonowy wpływa na działanie transportera $ATB^{0,+}$ w sposób niezależny od transbłonowych gradientów Na^+ i Cl^- ?
- jakie mogą być długofalowe konsekwencje hamowania aktywności $ATB^{0,+}$ i HSP90beta dla fenotypu komórek nowotworowych? Innymi słowy: czy można sobie wyobrazić mikroewolucję ich oporności na inhibitory tego białka i jaki ewentualnie mógłby być mechanizm, leżący u podstaw takiej oporności?
- o ile można przyjąć, że zapotrzebowanie na wydajny transport aminokwasów może zależeć od szybkości proliferacji komórek (przyrostu ich masy), to jak

wygląda ta zależność u komórek z wyciszoną proliferacją (np. komórek macierzystych)?

Niezależnie od tych pytań, wysoko oceniam wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Połosak. Praca opisuje mechanizm leżący u podstaw powiązań między transporterami aminokwasów (w tym przypadku ATB^{0,+}) a białkami opiekuńczymi (w szczególności HSP90beta), potencjalny ich udział w rozwoju nowotworów (w szczególności raka piersi) oraz ich potencjalne wykorzystanie przy opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych. Stanowi ona więc rozwiązanie oryginalnego problemu badawczego. Podsumowując, w mojej ocenie przedstawiona do oceny praca spełnia warunki określone w Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Karoliny Połosak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ze względu na wszechstronność wykorzystanych technik doświadczalnych, a także na potencjalne znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników i bogaty dorobek naukowy Doktorantki, wnoszę również o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



(Jarosław Czyż)