

Karolina Połosak

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

Streszczenie

ATB^{0,+} to transporter aminokwasów błony plazmatycznej, kodowany przez gen *SLC6A14*. Charakteryzuje się szeroką specyficznością substratową obejmującą wszystkie obojętne (indeks „0”) i zasadowe (indeks „+”) aminokwasy. Jego aktywność zależy od gradientu stężeń Na⁺ i Cl⁻. Poziom ATB^{0,+} (SLC6A14) jest podniesiony w wielu nowotworach, w tym w raku piersi, w których jego aktywność jest istotna dla wzrostu oraz nieograniczonej proliferacji komórek. SLC6A14 jest idealnym kandydatem w celowanych terapiach nowotworowych, ponieważ, oprócz wymienionych aminokwasów, transportuje prekursory leków i leki pochodzenia aminokwasowego, takie jak walacyklowir i walgancyklowir. Wcześniejsza analiza proteomu SLC6A14 wykryła m. in. kilka białek szoku cieplnego, w tym HSP70 (HSPA14) i HSP90-beta. W niniejszej rozprawie skupiono się na weryfikacji oddziaływania między transporterem a białkami HSP w procesie wychodzenia SLC6A14 z siateczki śródplazmatycznej. Interakcję transportera, po nadekspresji w komórkach HEK293, z białkami szoku cieplnego potwierdzono w eksperymentach immunoprecypitacji i immunofluorescencji a bezpośrednie oddziaływanie tych białek wykazano w teście ligacji zbliżeniowej. Lokalizację transportera na powierzchni komórki pokazano stosując biotynylację białek powierzchniowych. Traktowanie komórek inhibitorami HSP90 i HSP70 – odpowiednio radicolem oraz VER155008, spowodowało drastyczny spadek obecności SLC6A14 w błonie plazmatycznej, co wynikało z obniżenia całkowitej ilości transportera w komórce. Możliwość interakcji między SLC6A14 a HSP90 badano mierząc aktywność ATPazy oczyszczonego, rekombinowanego białka HSP90-beta, w układzie *in vitro*, w obecności poszczególnych peptydów, stanowiących fragmenty wybrane z N- i C-końca transportera. Wykazano, że tylko dwa peptydy, odpowiadające fragmentom z C-końca zlokalizowanym bliżej 12 domeny transbłonowej SLC6A14, wpływały na tę aktywność chociaż w przeciwny sposób. Wyniki wskazują na zaangażowanie C-końcowego fragmentu, który jest istotny dla wychodzenia SLC6A14 z siateczki śródplazmatycznej poprzez wiązanie SEC24C, także w zmianę aktywności HSP90-beta, co sugeruje że ten sam fragment transportera wiąże zarówno HSP90-beta jak i SEC24C i jest odpowiedzialny za prawidłowe fałdowanie SLC6A14 i jego dalszy transport do błony plazmatycznej. Z uwagi na to, że wysoką ekspresję zarówno SLC6A14, jak i HSP90-beta zaobserwowano w różnych typach nowotworów postanowiono sprawdzić, czy HSP90-beta mógłby pełnić rolę regulatora aktywności endogennego SLC6A14 w liniach komórkowych raka piersi. Badania przeprowadzono na liniach nowotworowych z obecnym receptorem estrogenowym oraz kontrolnej linii nabłonkowej. Bezpośrednie oddziaływanie SLC6A14 z HSP90-beta potwierdzono w teście ligacji zbliżeniowej we wszystkich wybranych liniach, jednak na znacznie wyższym poziomie w liniach nowotworowych, w porównaniu z kontrolną. Wychwyty radioaktywnej leucyny, substratu SLC6A14 o wysokim powinowactwie, był wyraźnie zmniejszony po traktowaniu inhibitorem HSP90-beta, w komórkach raka piersi z obecnym receptorem estrogenowym (ER- α^+). W nienowotworowej linii komórkowej MCF 10A nie obserwowano wpływu inhibitora HSP90 na akumulację leucyny, w obecności jonów chloru, a akumulacja leucyny była znacznie niższa niż w liniach raka piersi. Radicolol istotnie zmniejszał jednak interakcję między SLC6A14 i HSP90-beta, co sugeruje, że synteza

transportera jest niższa w komórkach nienowotworowych i znacznie wyższa w komórkach nowotworowych, a to wskazuje na zaangażowanie HSP w regulację aktywności SLC6A14. Ponadto test przeżywalności wykazał zwiększoną śmiertelność komórek, po traktowaniu inhibitorami, α -metylotryptofanem (SLC6A14) i radicicolem (HSP90), podawanymi osobno a skojarzenie tych związków istotnie wzmocniło ten efekt. Obserwacja, że α -metylotryptofan i radicicol w niskim stężeniu wywołują synergistyczny efekt cytotoksyczny w liniach komórkowych raka piersi, może stanowić potencjalną strategię w terapii skojarzonej.

Abstract

ATB^{0,+} is a membrane amino acid transporter, encoded by the *SLC6A14* gene, with broad substrate specificity, transporting all neutral (index „0”) and basic (index „+”) amino acids in a sodium and chloride dependent way. ATB^{0,+} (SLC6A14) level is upregulated in many cancers, including breast cancer, in which its activity is important for growth and unlimited proliferation of transformed cells. SLC6A14 is an ideal candidate for targeting cancer therapies, as it also transports many drug precursors and amino acid-derived drugs such as valacyclovir and valgancyclovir. Previous analysis of the SLC6A14 proteome detected, among others, several heat shock proteins, including HSP70 (HSPA14) and HSP90-beta. This dissertation focuses on verifying the interaction between transporter and HSP proteins in the process of SLC6A14 exit from the endoplasmic reticulum. Interaction of the overexpressed transporter with heat shock proteins was confirmed in immunoprecipitation and immunofluorescence experiments, while direct interaction was shown in proximity ligation assay. Cell surface localization of the transporter was confirmed using biotinylation of cell surface proteins. Treatment with HSP90 and HSP70 inhibitors - radicicol or VER155008 respectively resulted in a dramatic decrease of SLC6A14 presence in the plasma membrane, an effect of the total transporter diminution. Possibility of interaction between SLC6A14 and HSP90 was tested by measuring ATPase activity of purified, recombinant HSP90-beta protein in an in vitro system. HSP activity was measured in the presence of particular peptides, representing fragments selected from the N- and C-terminus of the transporter, and it was shown that only two peptides, corresponding to C-terminal fragments located closer to the 12th transmembrane domain of SLC6A14, affected the activity although in opposite manner. The results indicate that the C-terminal fragment, which is essential for the exit of SLC6A14 from the endoplasmic reticulum via SEC24C binding, is also involved in altering the activity of HSP90-beta, suggesting that the same transporter fragment binds both HSP90-beta and SEC24C and is responsible for the proper folding of SLC6A14 and its further transport to the plasma membrane. Since high expression of both SLC6A14 and HSP90-beta has been observed in various types of cancer, we also decided to test whether HSP90-beta could act as a regulator of endogenous SLC6A14 activity in breast cancer cell lines. The study was performed on estrogen receptor-positive breast cancer cell lines and a control epithelial one. The direct interaction between SLC6A14 and HSP90-beta was confirmed by proximity ligation assay in all selected lines, but at a significantly higher level in the cancer lines, when compared to the control. The uptake of radioactive leucine, a high-affinity substrate of SLC6A14, was significantly reduced after treatment with the HSP90-beta inhibitor, in breast cancer cells with estrogen receptor (ER- α +) present. In the non-tumorigenic MCF 10A cell line, there was no effect of the HSP90 inhibitor on leucine accumulation, in the presence of chlorine ions, and leucine accumulation was much lower than in breast cancer lines. However, radicicol decreased interaction between SLC6A14 and HSP90-beta. This suggest that SLC6A14 synthesis is lower in non-tumorigenic cells, being much higher in cancer cells and this points to the involvement of HSP90-beta in regulation of

SLC6A14 activity. Moreover, a cell viability assay revealed increased cell death after treatment with inhibitors: α -methyltryptophan (SLC6A14) and radicicol (HSP90), when given separately and the combination of these inhibitors significantly increased this effect. The observation that α -methyltryptophan and radicicol at low concentrations cause a synergistic cytotoxic effect in malignant breast cancer cell lines appears to be a potential strategy for combination therapy.