



nencki institute
of experimental biology

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY
EU Centre of Excellence in Neurobiology, *BRAINS*

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland
Phone: (48-22) 589 22 07; Fax: (48-22) 822 53 42
E-mail: sekretariat@nencki.edu.pl; <http://www.nencki.gov.pl>

Prof. dr hab. Mariusz R. Więckowski,
Pracownia Biologii Mitochondriów i Metabolizmu
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
im. M. Nenckiego w Warszawie

Warszawa, 15 lutego 2024 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr **Wiolety Banaszuk**
**p.t.: "Regulacja metabolizmu aminokwasów poprzez
aktywność aparatu Golgiego"**

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Tchórzewskiego

Tematyka rozprawy doktorskiej związana jest z funkcją jaką pełni aparat Golgiego w procesie adaptacji komórki do warunków stresowych, w tym przypadku stresu hiperosmotycznego. Doktorantka postawiła sobie trzy główne cele badawcze. Pierwszym z nich było zbadanie jakie znaczenie dla funkcjonowania błonowego transportera aminokwasowego SNAT2 ma jego N-glikozylacja zachodząca w aparacie Golgiego. W związku z tym, iż transporter aminokwasowy SNAT2 pełni kluczową rolę w adaptacji komórek do warunków stresu hiperosmotycznego, Doktorantka postanowiła także zbadać mechanizmy adaptacyjne uruchamiane w komórce w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny. Trzecim głównym celem badawczym Doktorantki było zbadanie znaczenia osmoadaptacyjnej akumulacji aminokwasów w regulacji szlaku sygnałowego kinazy ERK1/2, który indukowany jest w odpowiedzi komórki na stres hiperosmotyczny. Zagadnienie, nad którym pracowała doktorantka, uważam za niezmiernie ważne, a wyniki przez nią przedstawione za istotne i prowadzące do poszerzenia naszej wiedzy na temat roli transportera SNAT2 i aparatu Golgiego w regulowaniu poziomu aminokwasów w komórce podczas adaptacji komórek do warunków stresu hiperosmotycznego. Jednocześnie jej badania pokazały, że akumulacja

aminokwasów w komórkach w warunkach stresu hiperosmotycznego, nie tylko pozwala na przywrócenie homeostazy, ale także służy jako modulator aktywności kinazy ERK1/2.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca liczy 175 stron, zawiera 68 rycin i 2 tabele. Układ recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej mgr Wiolety Banaszuk jest typowy. Rozprawa doktorska składa się z dwunastu części/rozdziałów: (I) Informacji wprowadzających zawierających informacje o finansowaniu badań, (II) Spisu treści, (III) Wykazu stosowanych skrótów, (IV i V) streszczeń w języku polskim i angielskim, (VI) Wstępu, (VII) Cele i założenia pracy, (VIII) Części opisujących materiały i metody wykorzystane w niniejszej pracy, (IX) Wyników badań, (X) Dyskusji, (XI) Podsumowania oraz (XII) Spisu literatury.

Każda z trzech części opisujących wyniki uzyskane przez Doktorantkę zakończona jest krótkim podsumowaniem tej części rozprawy. Do rozprawy doktorskiej załączono także opis najważniejszych osiągnięć Doktorantki.

Badania przeprowadzone przez doktorantkę finansowane były z Grantu pt.: „Udział kompartmentu trans-Golgi w regulacji aktywności transporterów aminokwasów” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w formie projektu SONATA-BIS (UMO-2018/30/E/NZ1/00605), którego kierownikiem jest dr Dawid Krokowski.

Ocena poszczególnych rozdziałów pracy

Wstęp zawarty w rozprawie doktorskiej został napisany w bardzo interesujący i przemyślany sposób. Stanowi doskonałe źródło informacji dotyczących udziału szlaków mTORC1 i kinazy GCN2 w regulacji poziomu aminokwasów w komórkach. Dużo uwagi Doktorantka poświęciła także procesowi N-glikozylacji w kontekście postranslacyjnej modyfikacji błonowych transporterów aminokwasów. Doktorantka bardzo dobrze opisała mechanizmy adaptacji komórek do stresu hiperosmotycznego, oraz rolę jaką może pełnić transporter SNAT2 w tym procesie. Dodatkowo, we wstępie Doktorantka zamieściła informacje dotyczące regulacji formowania się kondensatów biomolekularnych w warunkach stresu hiperosmotycznego. We wstępie odnajdziemy szereg klarownych rycin bardzo dobrze obrazujących omawiane zagadnienie. Nie pochodzą one z dostępnych prac innych autorów (nie są przekopiuwane), ale praktycznie wszystkie są dziełem własnym Doktorantki (na podstawie literatury), wykonanym z wykorzystaniem programu BioRender.com. Wstęp został

napisany przez Doktorantkę praktycznie bezbłędnie. Pozwolę sobie tylko na drobne komentarze:

- 1) Na stronie 28. Doktorantka pisze: „Już w 1995 r. Blommaart [35] doniósł, że aminokwasy, szczególnie leucyna i arginina, aktywują p70S6K (substrat kinazy mTORC1).” Mam nadzieję, że doktorantce chodziło o to, że Blommaart wykazał...
- 2) Na stronie 46 Doktorantka pisze: „Nadmiar RFT prowadzi do utleniania białek, powodując modyfikację ich struktury i zaburzenie funkcji. Ponadto, hipertoniczność wywołuje rearanżację cytoszkieletu, może prowadzić do uszkodzenia DNA, zahamowania procesu replikacji, transkrypcji i translacji, depolaryzacji mitochondriów i zatrzymania cyklu komórkowego, tym samym czyniąc komórki podatnymi na apoptozę” Do tego fragmentu mam pytanie dotyczące uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i DNA? Czy było to badane w kontekście stresu hiperosmotycznego?

Materiały i Metody zostały opracowane przez Doktorantkę bardzo starannie. Podczas lektury tej części pracy nasunęły mi się jednak pewne uwagi i komentarze:

- 1) Doktorantka w swoich badaniach wykorzystywała między innymi komórki HepG2. W jakiej liczbie na szalkę/płytkę były wysiewane komórki? Czy hodowla w trakcie indukcji stresu hiperosmotycznego była konfluentna czy nie? Pytam o to, bo komórki HepG2 po osiągnięciu konfluencji tworzą sferoidy. Jak było w przypadku tej hodowli? Czy było to brane pod uwagę?
- 2) Na stronie 72, pkt. 5. Przygotowanie pełnych lizatów komórkowych; Czy aby na pewno pełnych? Czy zastosowany bufor RIPA umożliwia także ekstrakcję białek z raft lipidowych?
- 3) Na stronie 72, pkt. 5 Przygotowanie pełnych lizatów komórkowych; Doktorantka pisze: „Po zakończonym eksperymencie, z szalek usunięto podłoże hodowlane.” Do tego stwierdzenia mam pytanie w kontekście komórek HepG2. Komórki te co prawda są adherentne, jednakże w hodowli część komórek HepG2 znajduje się w medium. Procent komórek odklejonych wzrasta w przypadku warunków stresowych. Jak było w tym przypadku? Czy uwzględniano komórki znajdujące się w medium? Dodam, że nie są to komórki martwe.
- 4) Strona 74. pkt. 7. Co Doktorantka rozumie przez określenie „klarowany supernatant”?
- 5) Strona 76. pkt. 10. Barwienie immunofluorescencyjne; Doktorantka pisze: „Komórki permabilizowano w 0,05 % saponinie w PBS przez 20 min w temperaturze pokojowej.” Bardziej trafne było by sformułowanie „uprzepuszczalniano”.

W części **Wyniki** mgr Wioleta Banaszuk w sposób bardzo profesjonalny przedstawiła wyniki swoich badań co wskazuje na jej dojrzałość naukową. Zastosowane podejście eksperymentalne zasługuje na wyróżnienie. Na podstawie tej części pracy nie mam wątpliwości, że cele pracy przedstawione przez Doktorantkę zostały w pełni osiągnięte.

Do tej części pracy mam kilka komentarzy:

- 1) Strona 81. Doktorantka pisze: „Obecność cytoplazmatycznego białka α -tubuliny w WCL i brak we frakcji PM, świadczy o poprawności przeprowadzenia procedury izolacji. Poziom białka odniesiono do poziomu ATP1A1 (ang.: *ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit alpha 1*) jako białka referencyjnego błon komórkowych.”. Zastanawiający jest kompletny brak sygnału dla tubuliny we frakcji błony plazmatycznej. Tubulina generalnie jest w niewielkim stopniu zasocjowana z błoną plazmatyczną [J. Wolff, Plasma membrane tubulin, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1788, Issue 7, 2009, Pages 1415-1433]. Co mogło wpłynąć na taki obraz? Chciałbym poznać opinie Doktorantki w tej kwestii.
- 2) Strona 83. Doktorantka pisze: „Należy podkreślić, że jedynie łagodny (500 mOsm), ale nie wysoki (600, 700 mOsm), stres hiperosmotyczny prowadzi do wzrostu poziomu białka SNAT2 w komórkach MEF WT.” Czy mógłbym poznać opinię Doktorantki, dlaczego tak się dzieje?
- 3) Strona 83. Doktorantka pisze: „Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami, wskazującymi, że osmolarność zewnątrzkomórkowa powyżej 560 mOsm uniemożliwia adaptację, poprzez całkowitą blokadę syntezy białek [163, 180]”. Czy mogę prosić o wyjaśnienie czy to stwierdzenie jest poprawne, także dla komórek rdzenia nerki gdzie osmotyczność waha się pomiędzy 800 a 1200 mosm/L?
- 4) Strona 85. Doktorantka pisze: „Co więcej, pomimo wysokiego stężenia zewnątrzkomórkowego Gly w podłożu suplementowanym NEAA, wzrost poziomu tego aminokwasu był porównywalny do tego w podstawowym podłożu hodowlanym”. Czy można mówić o tym że stężenie 0,5mM Gly jest wysokie w porównaniu ze stężeniem 0,4 mM tego aminokwasu w medium nie suplementowanym NEAA?
- 5) Strona 85. Doktorantka pisze: „Co istotne, w podłożu suplementowanym NEAA po 6 h stresu odnotowano aż 5-krotny wzrost stężenia Gln, w porównaniu do 1,2-krotnego w podłożu DMEM (Ryc. 26). Przypuszcza się, że tak gwałtowny wzrost Gln w podłożu z dodatkiem NEAA może wynikać z aminacji Glu (Ryc. 27), reakcji prowadzącej do powstania Gln.” Ten opis trochę wprowadza w błąd. Wyniki na rycinach pokazują

wewnątrzkomórkowe stężenia aminokwasów, natomiast z opisu można wnioskować, że Doktorantka mówi o stężeniu aminokwasów w pożywce hodowlanej.

- 6) Strona 91. Rycina 40, Czy warianty z inhibitorem SNAT2 i inhibitorem LAT1 także dotyczą stresu hiperosmotycznego?
- 7) Strona 95. Doktorantka pisze: „Niemniej jednak, po 6 h synteza białek w komórkach MEF WT (Ryc. 35 A) oraz MEF S51A (Ryc. 35 B) powróciła do poziomu wyjściowego, a w komórkach HepG2 WT (Ryc. 42 A) osiągnęła około 50 % poziomu podstawowego...” Czy mogę poznać opinię Doktorantki jaki może być tego mechanizm/przyczyna że w komórkach HepG2 synteza białek nie powróciła do pierwotnego poziomu?
- 8) Komentarz ogólny – było by bardzo pomocne jakby Doktorantka np. na Rycinie 38 zaznaczyła gwiazdkami położenie omawianych białek na żelu, tak jak to zrobiła na Rycinie 36 (po lewej stronie).
- 9) Strona 112. Doktorantka pisze: „Wykonane analizy wskazały, że zaburzenie sieci mikrotubul wywiera negatywny wpływ na strukturę aparatu Golgiego, co w konsekwencji może prowadzić do zaburzeń czynnościowych tego organellum komórkowego”. Mam pytanie czy przypadkiem zaburzenie sieci mikrotubul nie będzie miało negatywnego wpływu nie tylko na aparat Golgiego, ale także inne organella i funkcjonowanie całej komórki?
- 10) Strona 134. Wnioski. Doktorantka pisze: „W warunkach adaptacyjnych aktywacja kinazy ERK1/2 ma charakter przejściowy. Przekroczenie progu osmoadaptacyjnego (560 mOsm), powoduje trwałą aktywację kinazy ERK1/2.” Czy to stwierdzenie dotyczy wszystkich komórek także w rdzeniu nerki?

Dyskusja napisana jest z dużą znajomością przedmiotu. Czytelnik zapoznaje się z przemyślaną analizą uzyskanych wyników i osiągnięć wynikających z przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Doktorantka w bardzo elegancki sposób konfrontuje uzyskane przez nią wyniki z dostępną literaturą w tej tematyce. Do tej części mam tylko jedno pytanie. Doktorantka w podsumowaniu przedstawiła model metaboliczny opisujący funkcję aparatu Golgiego w procesie adaptacji komórki do warunków stresu hiperosmotycznego. Czy doktorantka ma jakieś przypuszczenia jak to wygląda w przypadku stresu hipoosmotycznego? Albo jak wygląda powrót z warunków hiperosmotycznych do izotonicznych? Czy są jakieś dane na ten temat?

Po wnikliwym zapoznaniu się z zaprezentowanymi wynikami badań oraz dyskusją w pełni zgadzam się z wnioskami przedstawionymi przez Doktorantkę w podsumowaniu jej rozprawy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska jest napisana bardzo dobrze i przedstawia nowe odkrycia badawcze. Przedstawione przeze mnie komentarze oraz uwagi dotyczące rozprawy mgr Wiolety Banaszuk w większości mają charakter drugorzędny i w żadnym stopniu nie obniżają wartości merytorycznej przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej. Uważam, że wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań zostały przez Autorkę właściwie uzasadnione. Chciałbym dodatkowo podkreślić, że Doktorantka jest współautorem publikacji w renomowanym czasopiśmie *Cell Reports* o tematyce związanej z jej pracą badawczą. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę i przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej nie zostały jeszcze opublikowane, jednakże jestem przekonany, iż będą one podstawą bardzo dobrej pracy w czasopiśmie naukowym o międzynarodowym zasięgu. Dlatego też, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Wiolety Banaszuk spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie pani mgr Wiolety Banaszuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, biorąc pod uwagę wartość naukową wyników, zwracam się wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Wiolety Banaszuk.



Mariusz R. Więckowski