



Wrocław, 01.09.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Macieja Studziana pod tytułem
"Specyficzność substratowa, aktywność i lokalizacja subkomórkowa ludzkiego
białka oporności wielolekowej ABCG2" zrealizowanej w Katedrze Biologii
Nowotworów i Epigenetyki Uniwersytetu Łódzkiego
pod kierunkiem Promotora dr. hab. Łukasza Pułaskiego, prof. UŁ**

Już ponad trzydzieści lat temu białka z rodziny ABC zostały zidentyfikowane jako odpowiedzialne za zjawisko oporności wielolekowej (ang. multi-drug resistance, MDR), które znacznie utrudnia skuteczną chemioterapię nowotworów. Na przestrzeni badań zidentyfikowano kilkadziesiąt białek ABC, które pogrupowano w siedem podrodzin na podstawie różnic w ich strukturze molekularnej. Generalnie, są to białka błonowe, których aktywność w większości przypadków polega na aktywnym transporcie substancji, a tym samym na wspomaganiu i modulowaniu metabolizmu komórkowego. Występują one w błonach komórkowych i wewnątrzkomórkowych wszystkich istot żywych. W tym kontekście zjawisko oporności wielolekowej w oczywisty sposób nie może być traktowane jako czynnik ewolucyjny, który doprowadził do tak dużej dywersyfikacji tej rodziny białek. Jednym z reprezentantów wspomnianej rodziny transporterów u człowieka jest ABCG2, którego aktywność istotnie ma znaczenie w farmakokinetyce leków oraz w oddziaływaniach pomiędzy cząsteczkami leków i substancji odżywczych w kontekście tkanek barierowych. Jest on jednym z trzech transporterów, dla których postulowany jest udział w zjawisku oporności wielolekowej nowotworów, gdyż nadekspresja ABCG2 w komórkach zmienionych może odpowiadać za zniesienie ich wrażliwości na chemioterapeutyki, a w konsekwencji za brak skuteczności leczenia. Z drugiej strony, pomimo wieloletnich intensywnych badań nadal wiele ważnych substratów dla tego białka pozostaje niezidentyfikowanych, a sformułowanie reguł pozwalających przewidywać potencjalne oddziaływania związków drobnocząsteczkowych z ABCG2 nie jest na razie możliwe. Co więcej, niekompletność wiedzy nie pozwala na zbudowanie pełnego obrazu regulacji lokalizacji i aktywności tego transportera w komórce.



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad_cytobiochemii

Potrzeba zmiany tego stanu rzeczy stała się podstawą przedstawionej do recenzji dysertacji naukowej. Jej Autor podjął się niełatwego zadania polegającego na systematycznym i ilościowym badaniu specyficzności substratowej ABCG2 wobec dużej grupy związków reprezentujących flawonoidy. Swoją uwagę zwrócił on także na określenie aktywności badanego transportera oraz precyzyjne zdefiniowanie procesu oligomeryzacji i oddziaływań tego białka z jego substratami. Praca obejmuje także dążenia do poznania lokalizacji subkomórkowej ABCG2 warunkowanej stanem czynnościowym lub konformacyjnym białka. Doktorant trafnie zdiagnozował, że konieczne jest tworzenie nowych narzędzi pozwalających na efektywne kumulowanie danych na temat mechanizmów funkcjonowania transporterów z rodziny ABC. Takie podejście niesie ze sobą obietnicę wygenerowania wyników o dużej wartości poznawczej, ale także aplikacyjnej jeśli weźmie się pod uwagę zarówno potencjał terapeutyczny badanych związków polifenolowych jak i znaczenie badanego transportera we wspomnianym już zjawisku oporności wielolekowej nowotworów. W kontekście istniejących danych literaturowych Doktorant bardzo trafnie sformułował założenia i cele pracy, co w połączeniu z sumiennością i przenikliwością naukową pozwoliło mu uzyskać interesujące i wartościowe wyniki, które znacząco przyczyniają się do uzyskania pełnego obrazu wspomnianych procesów biologicznych na poziomie molekularnym.

Doktorant przedstawił meritum swojego projektu naukowego w postaci bardzo obszernego opracowania o klasycznym układzie rozprawy doktorskiej. Niemniej, godnym zaznaczenia jest fakt, iż znaczna część przedstawionej w nim wyników została już opublikowana na łamach międzynarodowych czasopism naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania (m.in. Studzian, M., Bartosz, G., Pułaski, L. Endocytosis of ABCG2 drug transporter caused by binding of 5D3 antibody: Trafficking mechanisms and intracellular fate. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 2015, 1853(8), pp. 1759–1771; Rozanski, M., Studzian, M., Pułaski, L. Direct measurement of kinetic parameters of ABCG2-dependent transport of natural flavonoids using a fluorogenic substrate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2019, 371(2), pp. 309–319), a własność intelektualną dotyczącą przedstawionej w pracy metodologii poddano międzynarodowej ochronie patentowej (Studzian i Pułaski, 2018, (European Union Patent Nr EP3117212B1). Te pozycje literaturowe stanowią jedynie wycinek bardzo bogatego (jak na ten etap kariery naukowej) dorobku Doktoranta, obejmującego co najmniej dwadzieścia pięć pozycji, wśród których aż w czterech jest on pierwszym autorem. Doniosłe znaczenie tego dorobku znajduje swoje odzwierciedlenie w tym, że



został on już zauważony w środowisku naukowym, o czym świadczy sumaryczna ilość cytowań wynosząca 292 (bez autocytowań, wg bazy Scopus na dzień sporządzenia recenzji).

Rozprawa doktorska przygotowana jest w języku polskim, a jej treść obejmująca ponad 200 stron została podzielona na sześć głównych rozdziałów. Całość opatrzona jest także streszczeniem w języku polskim i angielskim, listą skrótów, aneksem prezentującym podstawowe informacje o oferowanych komercyjnie flawonoidach jak również bibliografią obejmującą w sumie aż 496 pozycji. Generalnie, całość jest ułożona w logiczny i konsekwentny sposób. Pierwszą z głównych części dysertacji stanowi wstęp literaturowy stanowiący przykład skrupulatnie i rzeczowo napisanego podsumowania zdeponowanej dotychczas wiedzy o białku ABCG2 potrzebnej do zrozumienia wartości prezentowanych w dalszych częściach wyników i umiejscowienia ich w odpowiednim kontekście. Właściwym posunięciem było rozdzielenie tego fragmentu na pięć podrozdziałów, w których kolejno przedstawione są zagadnienia dotyczące m.in. charakterystyki genu kodującego białko ABCG2, struktury molekularnej tego transportera, jego ekspresji w komórkach oraz specyficzności substratowej. Warto podkreślić, że wstęp jest przygotowany w sposób atrakcyjny dla czytelnika, a wrażenie takie potęgowane jest odpowiednim doбором rycin. Kilka bardzo drobnych nieścisłości w podpisach rycin (np. brak wyjaśnienia kodu kolorystycznego stosowanego na rycinach 6 i 11 czy też brak podkreślenia, że projekcje strukturalne dotyczą dimeru ABCG2 na rycinach 6 i 9) bądź sformułowań w tekście (np. „...stanowią mikroRNA. Miejsca wiązania dla kilku takich cząsteczek są zlokalizowane w części 3'-UTR genu.”) nie ma charakteru błędu merytorycznego, a tym samym nie wpływa znacząco na bardzo pozytywny odbiór tej części pracy.

Kolejnych ponad trzydzieści stron zawiera opis użytych do realizacji zadań badawczych materiałów i metod. Na ogół ta część pracy przygotowana jest w sposób klarowny i logiczny, przy czym uwagę zwraca dbałość o zachowanie szczegółowości niezbędnej do zagwarantowania całkowitej odtwarzalności opisywanych eksperymentów. Podobnie jak we wstępie bardzo pomocne w tym kontekście są starannie przygotowane ryciny. Jedynie kilka elementów wymagałoby dodatkowych uściśleń. Brakuje danych dotyczących sprzętu wykorzystywanego do pomiaru stężenia białka (r. 3.2.3) i do przeprowadzania reakcji PCR (r. 3.2.5.2). Czy produkty reakcji PCR były sprawdzane elektroforetycznie? Czy procedura Western Blot (r. 3.2.13.2) obejmowała płukania pomiędzy poszczególnymi etapami inkubacji? Jaki obiekt był stosowany w testach HCS (r. 3.2.14.1)? W jakim zakresie



intensywności sygnału obrazowano czasy życia fluorescencji? Ilość fotonów przypadających na jeden piksel obrazu może mieć kapitalne znaczenie dla prawidłowości dalszej analizy danych uzyskanych w trybie TCSPC.

Centralnym punktem rozprawy jest obszerna część zatytułowana „Wyniki”. Badania, które przeprowadził mgr Maciej Studzian w ramach realizacji projektu doktorskiego nie tylko zaowocowały wygenerowaniem danych o dużej wartości poznawczej, ale są także bardzo dobrym przykładem właściwie ukierunkowanych prac dążących do rozwoju metodologii badań. Bardzo interesująco przedstawia się pomysł przystosowania metody derywatywacji flawonoidów w reakcji z estrem 2-aminoetylowym kwasu difenyloborinowego (DPBA) do systemu opartego o hodowle komórek ssaczych *in vitro*. Jego realizacja pozwoliła na efektywne badanie aktywności transportowej białka ABCG2 i w konsekwencji na identyfikację kilkudziesięciu związków z grupy flawonoidów jako nowych substratów badanego transportera białkowego, w tym luteolinę jako nowo zidentyfikowany substrat modelowy przydatny w badaniu aktywności i inhibicji transportera. Z kolei technikę mikroskopowego obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) w połączeniu z dekonwolucją czasowo-rozdzielczą Doktorant wykorzystał do badania pewnych aspektów aktywności białka ABCG2. Technika ta w powiązaniu z pomiarami Försterowskiego rezonansowego transferu energii (FLIM-FRET) pozwoliła z kolei śledzić wzajemne oddziaływania monomerów ABCG2 oraz określić powinowactwo substratów do białka transportowego w komórkach żywych. Podczas realizacji projektu doktorskiego bardzo intensywnie wykorzystywano różnorodne techniki zaawansowanej mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej. Owocem tego jest także odkrycie i scharakteryzowanie stymulowanej wiązaniem przeciwciała monoklonalnego internalizacji białka ABCG2. Doktorant postuluje, że blokada konformacyjna transportera po związaniu przeciwciała skutkuje zależną częściowo od klatryny i cholesterolu endocytozą powstałego kompleksu, a jego dalsze losy związane są częściowo z recyklingiem, a częściowo z degradacją lizosomalną. Wszystkie te wnioski są bardzo dobrze podbudowane prezentowanymi w pracy wynikami, których jakość oraz sposób opracowania nie wzbudzają większych wątpliwości. Zaproponowane i zrealizowane przez Doktoranta eksperymenty kontrolne pozwalają zachować ufność względem obranej kierunkowości interpretacji. Niemniej, w kilku przypadkach wciąż istnieje pole do zwiększenia przejrzystości wyników i dodatkowego wzmocnienia siły ich przekazu. W kilku przypadkach dla zachowania większej klarowności ryciny prezentujące obrazy mikroskopowe mogłyby uwzględniać pojedyncze kanały fluorescencyjne na poszczególnych panelach (np. rycina



42). Czy z całkowitą pewnością można założyć, że procedura utrwalania komórek za pomocą formaldehydu (r. 4.1.7) nie wpływa na zachowanie się (np. dyfuzję na zewnątrz komórki) lub fotostabilność flawonoidów i ich pochodnych? Szacowanie poziomu/iłości białka TagGFP2-ABCG2 jedynie na podstawie zdjęć konfokalnych (np. ryciny 45, 59) może być obarczone dużym błędem, gdyż obrazowaniu nie podlegają całe komórki, a jedynie te ich elementy, które są objęte warstwą konfokalną. Dlatego tego typu podejściu powinny towarzyszyć analizy metodą Western Blot (podobnie jak zrealizowano to na rycinie 78). Z tekstu dysertacji nie do końca jasno wynika, czy we wszystkich eksperymentach FLIM i FLIM-FRET uwzględniano sygnał fluorescencyjny tylko z rejonów błony plazmatycznej czy z całego przekroju komórki. W ostatnim z wymienionych scenariuszy spora część sygnału może pochodzić od białek potencjalnie niesfałdowanych, zagregowanych bądź częściowo zdegradowanych. Takie efekty często obserwuje się jako rezultat nadprodukcji w komórkach białek zawierających w swej strukturze dodatkowe elementy strukturalne jak metki lub białka fuzyjne, podobnie jak na rycinie 51A (szczególnie przy porównaniu lokalizacji TagGFP2-ABCG2 oraz TagRFP-ABCG2).

Zaproponowane przez mgr Macieja Studziana podejście eksperymentalne oraz wygenerowany przez niego zestaw danych miał przede wszystkim posłużyć do poszerzenia wiedzy na temat aktywności transportera ABCG2 i lokalizacji tego białka w komórce. W rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” Doktorant skutecznie przekonuje, że jego cel został osiągnięty. Na przestrzeni dwudziestu pięciu stron konsekwentnie udowadnia on, że uzyskał znaczący, jakościowy postęp w stosunku do dotychczas stosowanych podejść w tej tematyce. Rzeczywiście, dotychczas można było odczuć niedobór skalowalnych, wysokoprzepustowych i stosunkowo łatwych w implementacji metod badania aktywności transporterów z rodziny ABC, a osiągnięcia opisane w pracy z pewnością posiadają odpowiedni potencjał by odegrać ważną rolę w dalszej eksploracji tego obszaru badawczego, co też zostało zasugerowane przez Autora. Ta część dysertacji napisana została ciekawie i stanowi mocne podbudowanie całego prezentowanego osiągnięcia.

Recenzowana praca doktorska zwięźczona jest syntetycznym przedstawieniem najważniejszych osiągnięć i wniosków wypływających z uzyskanych wyników. Ta część utwierdza w przekonaniu, że dokonania Doktoranta mają znaczący wpływ na rozwój reprezentowanej dziedziny naukowej i mogą być dobrym wyznacznikiem kierunku przyszłych badań. Podsumowując trzy ostatnie rozdziały pracy warto jeszcze raz podkreślić, że ich konstrukcja logiczna jest spójna i pozwala na bardzo dobrą ocenę wagi



poczynionych obserwacji, co w dużym stopniu jest zasługą nie tylko konsekwencji i rzeczowości wyводу naukowego, ale także prawidłowo przygotowanych ilustracji i tabel. Niemniej, pojawia się kilka opisanych poniżej kwestii, które w opinii recenzenta godne są bardziej dogłębnej dyskusji.

1. Z przedstawionych w pracy obrazów mikroskopowych wynika, że flawonoidy mają ograniczoną zdolność penetracji jądra komórkowego (np. rycina 43). Z kolei w literaturze nie brakuje doniesień o preferencyjnej akumulacji tych związków w jądrach komórek ssaczy (np. Mukai i wsp. 2009 Cytotechnology DOI: 10.1007/s10616-009-9206-z). Czy te rozbieżne obserwacje mogą mieć związek z wykorzystywaną metodą derywatywacji flawonoidów?

2. Czy na podstawie prezentowanych w pracy danych możliwe jest wnioskowanie na temat stopnia oligomeryzacji transportera ABCG2? Dotychczasowe doniesienia wskazują, że w błonach plazmatycznych dominująca forma jest złożona z czterech podjednostek, a dimer jest obecny jedynie w niewielkiej ilości (Wong i wsp. 2016 Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.10.002). Czy odległości między zewnętrznymi krańcami domeny NBD w dimerze oraz tetramerze są takie same? Kwestia ta może wpływać na interpretację wyników, która została przedstawiona na s. 135 i 137.

3. W odniesieniu do wyników wspomnianych w poprzednim punkcie, czy przy interpretacji danych FLIM-FRET uzyskanych dla układu białko-białko (r. 4.2.1.2) byłoby możliwe zastosowanie analizy składowych krzywej zaniku fluorescencji podobnie jak zrealizowano to dla układu białko substrat (r. 4.2.2.1)?

4. Na ile prawdopodobne jest, że fluorescencyjne białka fuzyjne w strukturach TagGFP2-ABCG2 oraz TagRFP-ABCG2 wpływają na procesy oligomeryzacji i agregacji, a także na wiązanie substratu i aktywność transportową? Na rycinie 51 widoczna jest większa akumulacja wewnątrzkomórkowa TagRFP-ABCG2 w stosunku do TagGFP2-ABCG2.

W ujęciu formalnym praca wywiera bardzo pozytywne wrażenie zarówno pod względem stylu wypowiedzi, poprawności gramatycznej i merytorycznej jak i formatowania oraz edycji tekstu, tabel oraz rycin. Ostatnie z wymienionych elementów pracy zasługują na szczególne uznanie ze względu na zachowanie przejrzystości układu i precyzji przekazu przy dużym ładunku treściowym. Błędy typograficzne i edytorskie są stosunkowo nieliczne. Chociaż niektóre z nich nieco utrudniają odbiór całości (np. zduplikowana numeracja rycin na s. 80-81 i 169-170, brak legendy na rycinie 73, użycie niosącej znamiona tautologii formuły „i/lub”, niedokończone zdanie na s. 188), nie ma potrzeby by

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**

ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad_cytobiochemii

szczegółowo opisywać je wszystkie w recenzji. Tym samym pragnę podkreślić, że wszelkie drobne niedociągnięcia nie mają większego wpływu na bardzo pozytywny odbiór pracy, która z pewnością stanowi bardzo dopracowane dzieło naukowe.

W moim przekonaniu przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Macieja Studziana spełnia wszystkie warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowy oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Rozprawa ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz poświadcza nabycie przez Doktoranta ogólnej wiedzy teoretycznej w reprezentowanej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Biorąc pod uwagę moją jednoznacznie pozytywną ocenę wnoszę o dopuszczenie mgr. Macieja Studziana do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Proponuję także wyróżnienie pracy doktorskiej ze względu na jej ponadprzeciętną wartość merytoryczną, nowatorstwo zastosowanych metod badawczych oraz walory poznawcze. Stanowi ona także świadectwo cennego wkładu Doktoranta w rozwój dziedziny naukowej osiągniętego w kontekście opublikowania wyników w czasopismach z listy JCR oraz uzyskania międzynarodowego patentu.

dr hab. Aleksander Czogalla, prof. UWr

Kierownik Zakładu Cytobiochemii,

tel. +48 71 375 63 56, e-mail: aleksander.czogalla@uwr.edu.pl

