



instytut biologii doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego PAN

Karolina Połosak

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

Praca doktorska wykonana w
Pracowni Procesów Transportu w Błonach
Biologicznych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:
Prof. dr hab. Katarzyna A. Nałęcz

WARSZAWA, 2024 r.

OŚWIADCZENIE

Ja, niżej podpisana, Karolina Połosak wyrażam zgodę na udostępnianie mojej pracy doktorskiej zatytułowanej „Oddziaływanie transportera aminokwasów SLC6A14/ATB⁰⁺ z białkami szoku cieplnego – rola w przeżywalności komórek raka piersi” przez Bibliotekę Instytutu Nenckiego, w czytelni oraz w ramach wypożyczeń międzybibliotecznych.

Warszawa, dnia

.....

(podpis)

Badania, których wyniki zostały opisane w niniejszej rozprawie były finansowane z projektu Narodowego Centrum Nauki:

OPUS 2015/19/B/NZ3/00049 dla prof. dr hab. Katarzyny Nałęcz



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Chciałabym podziękować poniższym osobom za udział w powstaniu niniejszej pracy:

Przede wszystkim mojej promotor, **Pani Profesor dr hab. Katarzynie Nałęcz** za ogromną wiedzę, opiekę naukową, cenne uwagi, nieocenione wsparcie oraz codzienną życzliwość.

Obecnym i poprzednim członkom **Pracowni Procesów Transportu przez Błony Biologiczne**, w szczególności **Vasylinie, Basi i Ani** za wspianiały czas spędzony w przyjacielskiej atmosferze, wsparcie i codzienne poranki przy wspólnej kawie.

Członkom **Pracowni Białek Wiążących Wapń**, w szczególności **Pani Profesor dr hab. Annie Filipek i dr Ewelinie Jurewicz** za życzliwe przyjęcie do Pracowni w ostatnim roku moich studiów doktoranckich, okazaną mi pomoc i motywację.

Pracownikom **Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych**, w szczególności **Gosi i Arturowi** za pomoc w obrazowaniu i obsłudze mikroskopów.

Moim przyjaciółkom: **Asi, Ani i Marcie** za ciągły zastrzyk pozytywnej energii, motywację i wsparcie.

Dziękuję też moim **Rodzicom, Rodzeństwu i Babci** za ogromną pomoc i wiarę we mnie w trakcie pisania tej rozprawy oraz w trakcie całego życia.

Mojemu synowi **Leonowi** za nadanie sensu mojemu życiu na nowo i bezwarunkową miłość.

Mojej drugiej połowie i największej miłości, mężowi **Cyprianowi** za zrozumienie, zaangażowanie, bezgraniczną miłość, motywację oraz nieocenioną pomoc i wsparcie każdego dnia.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	8
STRESZCZENIE.....	10
ABSTRACT	12
1. WSTĘP.....	14
1.1. Cechy charakterystyczne nowotworów	14
1.1.1. Utrzymywanie sygnalizacji proliferacyjnej.....	15
1.1.2. Unikanie supresorów wzrostu	16
1.1.3. Unikanie śmierci komórkowej.....	17
1.1.4. Nieśmiertelność replikacyjna.....	18
1.1.5. Indukcja angiogenezy.....	19
1.1.6. Aktywacja inwazji i przerzutowania	21
1.1.7. Nabywanie cech charakterystycznych.....	21
1.1.8. Przeprogramowany metabolizm komórkowy nowotworów	23
1.2. Transportery aminokwasów z rodziny SLC (ang. Solute Carrier Family) w chorobie nowotworowej.....	25
1.3. Rodzina transporterów SLC6	34
1.3.1. SLC6A14 – transporter o szerokiej specyficzności substratowej.....	41
1.4. Białka szoku cieplnego (HSP).....	44
1.4.1. Rodziny białek HSP	45
1.4.2. HSP90 – struktura, funkcje i rola w procesie nowotworzenia	48
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	52
3. MATERIAŁY I METODY	53
3.1. Materiały.....	53
3.1.1. Roztwory i bufory	53
3.1.2. Przeciwciała	54
3.1.3. Pochodzenie materiałów i odczynników	55
3.2. Hodowle komórkowe.....	57
3.2.1. Linia komórkowa HEK293.....	58
3.2.2. Linie nowotworowe raka piersi	58
3.2.3. Wybrane linie kontrolne.....	59
3.3. Stosowane plazmidy	60
3.4. Hodowle bakteryjne	61

3.4.1. Warunki hodowli.....	61
3.4.2. Izolacja plazmidowego DNA.....	61
3.5. Metody	61
3.5.1. Traktowanie komórek.....	61
3.5.2. Transfekcja komórek.....	62
3.5.2.1. Stabilna transfekcja komórek linii HEK293.....	62
3.5.2.2. Przejściowa transfekcja komórek linii HEK293.....	62
3.5.3. Przygotowywanie ekstraktów białkowych.....	63
3.5.3.1. Sporządzanie lizatów	63
3.5.3.2. Pomiar stężenia białka	63
3.5.4. Techniki elektroforetyczne.....	64
3.5.4.1. Elektroforeza jednokierunkowa (SDS-PAGE).....	64
3.5.4.2. Immunobloting (Western Blot).....	64
3.5.5. Immunoprecypitacja na złożu EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel	65
3.5.6. Biotynylacja białek powierzchniowych	66
3.5.7. Pomiar aktywności białka HSP90-beta.....	66
3.5.8. Termoforeza mikroskalowa – MST.....	67
3.5.9. Techniki mikroskopowe	68
3.5.9.1. Immunocytochemia	68
3.5.9.2. Test ligacji zbliżeniowej (ang. Proximity Ligation Assay, PLA)...	69
3.5.9.3. Analiza preparatów w mikroskopie konfokalnym	70
3.5.10. Badanie transportu radioaktywnej leucyny.....	70
3.5.11. Badanie przeżywalności komórek – analiza cytotoksyczności z użyciem zestawu CellTox™ Green	71
3.5.12. Analiza statystyczna.....	72
4. WYNIKI	73
4.1. Oddziaływanie SLC6A14 z białkami szoku cieplnego (HSP)	73
4.2. Kontrola procesu fałdowania SLC6A14 w siateczce śródplazmatycznej przez HSP90-beta i HSPA14	74
4.3. Wpływ inhibitorów białek HSP na ilość ATB ⁰⁺ /SLC6A14 w błonie komórkowej linii HEK293	79
4.4. Analiza poziomu białka ATB ⁰⁺ /SLC6A14 po zastosowaniu inhibitora proteasomu – bortezomibu	81
4.5. Oddziaływanie C – końca białka SLC6A14 z HSP90-beta	84

4.6. Oddziaływanie natywnej formy transportera ATB ^{0,+} /SLC6A14 z białkami HSP	89
4.7. Ekspresja ATB ^{0,+} /SLC6A14 oraz HSP90-beta w prawidłowych komórkach nabłonkowych i komórkach linii raka piersi.....	90
4.8. Bezpośrednia interakcja pomiędzy HSP90-beta a SLC6A14 in vivo	93
4.9. Wpływ HSP90-beta na lokalizację powierzchniową SLC6A14	95
4.10. Wpływ zahamowania HSP90-beta na akumulację L-Leucyny	97
4.11. Wpływ radicicolu i α -metylotryptofanu na przeżywalność linii nowotworowych raka piersi	98
5. DYSKUSJA	101
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	111
BIBLIOGRAFIA.....	112
SPIS PUBLIKACJI	141

WYKAZ SKRÓTÓW

- AA** – aminokwasy
- ATP** – adenozyno-5'-trifosforan, ang. *adenosine triphosphate*
- AKT** – kinaza białkowa, inaczej zwana kinazą białkową B ang. *PKB, protein kinase B*
- α-MT** – α-metylo-L-tryptofan, ang. *α-methyl-L-tryptophan*
- ATB^{0,+}** – transporter aminokwasów obojętnych i zasadowych, zależny od jonów sodu i chloru, ang. *Amino Acid Transporter B^{0,+}*
- ATCC** – ang. *American Type Culture Collection*
- ADHD** – zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi, ang. *attention deficit hyperactivity disorder*
- BSA** – surowicza albumina wołowa, ang. *bovine serum albumin*
- CMV** – cytomegalowirus, ang. *cytomegalovirus*
- COPII** – kompleks białek płaszczka II, ang. *coatomer, coat protein complex II*
- CoA** – koenzym A, ang. *coenzyme A*
- CPT1** – palmitoilotransferaza karnityny 1, ang. *carnitine palmitoyltransferase*
- DAPI** – 4',6-diamidyno-2-fenyloindol
- DAT** – transporter dopaminy, ang. *dopamine transporter*
- DMEM** – pożywka, ang. *Dulbecco's Modified Essential Medium*
- DMSO** – dimetylosulfotlenek
- EDTA** – kwas etylenodiaminotetraoctowy
- EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu, ang. *epidermal growth factor*
- ER-α** – receptor estrogenu α, ang. *estrogen receptor alpha*
- ERAD** – degradacja związana z siateczką śródplazmatyczną, ang. *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*
- FAO** – utlenianie kwasów tłuszczowych, ang. *fatty acid oxidation*
- FBS** – płodowa surowica bydlęca, ang. *fetal bovine serum*
- GABA** – kwas gamma-aminomasłowy, ang. *gamma-aminobutyric acid*
- GAT** – transporter GABA
- HER2** – ludzki naskórkowy czynnik wzrostu typu 2, ang. *human epidermal growth factor receptor 2*

- HSP** – białko szoku cieplnego, ang. *Heat Shock Protein*
- IgG** – immunoglobulina G, ang. *immunoglobulin G*
- LeuT** – bakteryjny homolog, transporter leucyny, ang. *bacterial homologue LeuT (bacterial Leucine Transporter)*
- mRNA** – matrycowy kwas rybonukleinowy, ang. *messenger ribonucleic acid*
- mTOR** – kinaza mTOR, ang. *mammalian target of rapamycin*
- OCD** – zaburzenia obsesyjno-kompulsywne, ang. *obsessive compulsive disorder*
- OCTN2** – transporter karnityny, ang. *organic cation/carnitine transporter novel 2*
- PAGE** – elektroforeza w żelu poliakryloamidowym, ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*
- PBS** – sól fizjologiczna w buforze fosforanowym, pH 7,4, ang. *phosphate buffered saline*
- PMSF** – fluorek fenylometylosulfonowy
- PKC** – białkowa kinaza C, ang. *protein kinase C*
- PLA** – test ligacji zbliżeniowej, ang. *Proximity Ligation Assay*
- RIPA** – roztwór do izolacji białek, ang. *Radioimmunoprecipitation Assay*
- SB** – roztwór do obciążania i denaturacji próbek białkowych, ang. *sample buffer*
- SDS** – dodecylosiarczan sodu, detergent
- SERT** – transporter serotoniny, ang. *serotonin transporter*
- SLC** – grupa białek transportujących substancje rozpuszczalne, ang. *Solute Carrier*
- TBS** – sól fizjologiczna buforowana przy pomocy Tris pH 7,4, ang. *Tris-buffered saline*
- TBS-T** – sól fizjologiczna buforowana przy pomocy Tris, pH 7,4 wzbogacona o 0,2% Tween® 20
- TCA** – cykl kwasów trikarboksylowych, ang. *tricarboxylic acid cycle*
- TEMED** – N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina
- TM** – domena transmembranowa
- VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, ang. *vascular endothelial growth factor*

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, szczególnie w guzach litych, 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 wiele prekursorów leków oraz leki pochodzenia aminokwasowego, takie jak walacyklowir i walgancyklowir.

Wcześniejsza analiza proteomu *SLC6A14* z zastosowaniem spektroskopii mas 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.

Interakcja transportera, po nadekspresji w komórkach HEK293, z białkami szoku cieplnego została potwierdzona w eksperymentach immunoprecypitacji i immunofluorescencji a bezpośrednie oddziaływanie tych białek wykazano w teście ligacji zbliżeniowej. Lokalizację transportera na powierzchni komórki potwierdzono stosując biotynylację białek powierzchniowych wraz z analizą metodą immunoblotingu. 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*. Aktywność HSP mierzono w obecności poszczególnych peptydów, stanowiących fragmenty wybrane z N- i C-końca transportera i 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 też 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. Wychwył 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. Radicol 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 radicolem (HSP90), podawanymi osobno a skojarzenie tych związków istotnie wzmocniło ten efekt.

Obserwacja, że α -metylotryptofan i radicol 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, especially solid tumors, 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 using mass spectroscopy 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 together with immunoblotting analysis. 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.

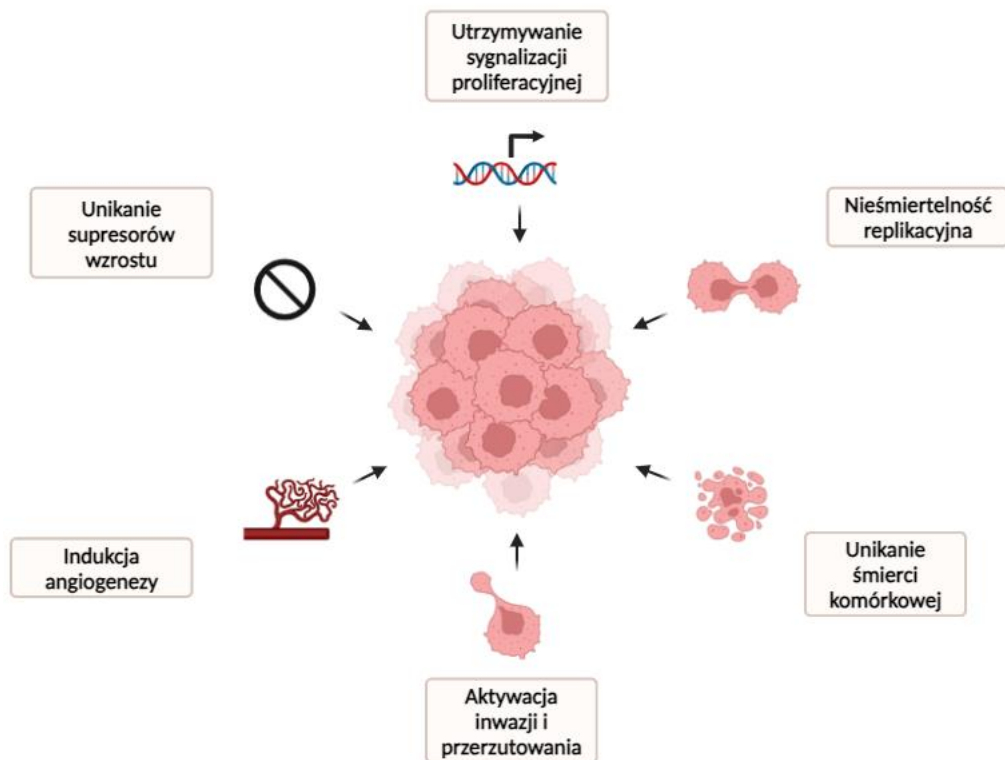
The observation that α -methyltryptophan and radicicol at low concentrations cause a synergistic cytotoxic effect in malignant breast cancer cell lines appears to be a potential strategy for combination therapy.

1. WSTĘP

1.1. Cechy charakterystyczne nowotworów

Liczne doniesienia naukowe wykazują, że nowotworzenie u ludzi jest procesem wieloetapowym a etapy te odzwierciedlają zmiany genetyczne, które prowadzą do stopniowej transformacji prawidłowych komórek ludzkich w ich wysoce złośliwe pochodne (Renan, 1993). Analizy histopatologiczne wielu narządów ujawniły obecność zmian, które wydają się reprezentować etapy pośrednie w procesie, w którym komórki ewoluują stopniowo od stanu prawidłowego poprzez szereg stanów przednowotworowych do nowotworów inwazyjnych (Foulds, 1954).

Cechy charakterystyczne nowotworów obejmują sześć właściwości biologicznych nabytych podczas wieloetapowego rozwoju guzów występujących u ludzi. Właściwości te stanowią podstawę do wyjaśnienia złożoności choroby nowotworowej. Zawierają one zdolność do utrzymywania sygnalizacji proliferacyjnej, unikania supresorów wzrostu, unikania śmierci komórkowej, osiągnięcia nieśmiertelności replikacyjnej, indukcji angiogenezy oraz aktywacji inwazji i przerzutowania (Ryc.1.1.). U podstaw tych charakterystycznych właściwości leży niestabilność genomu, z której wynika różnorodność genetyczna przyspieszająca ich nabywanie, oraz stan zapalny, który sprzyja rozwojowi szeregu takich właściwości (Hanahan i Weinberg, 2000). Na przestrzeni ostatnich lat do powyższej listy dodano między innymi dwie nowe cechy charakterystyczne - przeprogramowanie metabolizmu energetycznego i unikanie odpowiedzi immunologicznej (Hanahan i Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).



Ryc. 1.1. Cechy charakterystyczne komórek nowotworowych. Schemat zmodyfikowany na podstawie Hanahan i Weinberg, 2000.

1.1.1. Utrzymywanie sygnalizacji proliferacyjnej

Prawdopodobnie najbardziej fundamentalną cechą komórek nowotworowych jest ich zdolność do podtrzymywania długotrwałej proliferacji. Prawidłowe tkanki starannie kontrolują produkcję i uwalnianie sygnałów stymulujących wzrost, które inicjują wejście i dalszy progres w cyklu komórkowym, zapewniając w ten sposób homeostazę liczby komórek, a tym samym utrzymanie prawidłowej struktury i funkcji tkanek. Sygnały te są w dużej mierze przekazywane przez czynniki wzrostu, które wiążą się z odpowiednim receptorem na powierzchni komórek, zazwyczaj zawierające wewnątrzkomórkowe domeny kinazy tyrozynowej. Te ostatnie emitują sygnały poprzez rozgałęzione wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, które regulują postęp w cyklu komórkowym, a także wzrost komórek. Dodatkowo bardzo często sygnały te wpływają na inne właściwości biologiczne komórek, takie jak ich przeżywalność i metabolizm energetyczny. Co ciekawe, dokładna tożsamość i źródła sygnałów proliferacyjnych działających w prawidłowych tkankach są słabo poznane. Co więcej, wiadomo również stosunkowo niewiele na temat mechanizmów kontrolujących uwalnianie tych sygnałów mitogennych (Perona, 2006).

Z kolei sygnalizacja mitogenna w komórkach nowotworowych jest lepiej poznana. Komórki nowotworowe mogą nabyć zdolność do podtrzymywania

sygnalizacji proliferacyjnej na wiele alternatywnych sposobów (Hynes i MacDonald, 2009). Mogą na przykład samodzielnie wytwarzać ligandy receptorów czynników wzrostu, na które odpowiadają poprzez ekspresję odpowiednich receptorów, co skutkuje autokrynną stymulacją proliferacji. Ponadto, komórki rakowe mogą wysyłać sygnały stymulujące prawidłowe komórki w zrębie otaczającym guz, które odwzajemniają się poprzez dostarczanie im różnych czynników wzrostowych (Cheng i wsp., 2008). Dodatkowo, sygnalizacja receptorowa może zostać rozregulowana poprzez podniesienie poziomu białek receptorowych prezentowanych na powierzchni komórek nowotworowych, czyniąc takie komórki hiperreaktywnymi na ligand, którego ilość w otoczeniu jest ograniczona (Bhowmick i wsp., 2004). Na zmianę w sygnalizacji mogą również wpływać modyfikacje strukturalne w obrębie części receptorów, które umożliwiają aktywację proliferacji niezależnie od liganda. Uniezależnienie od czynników wzrostu można również osiągnąć poprzez ciągłą aktywację poszczególnych składników szlaków sygnałowych zależnych od tych receptorów, co eliminuje potrzebę stymulacji ścieżek poprzez aktywację receptora za pośrednictwem liganda (Witsch i wsp., 2010).

1.1.2. Unikanie supresorów wzrostu

Oprócz charakterystycznej zdolności do indukowania i podtrzymywania pozytywnie działających sygnałów stymulujących wzrost, komórki nowotworowe muszą również omijać złożone systemy, które negatywnie regulują proliferację komórek. Wiele z tych procesów zależy od działania genów supresorowych (Deshpande i wsp., 2005). Na przestrzeni lat, poznano dziesiątki genów supresorowych dla nowotworów, które działają na różne sposoby w celu ograniczenia wzrostu i proliferacji komórek poprzez ich charakterystyczną inaktywację. Dwa główne supresory to białka kodowane przez geny *RB* (związany z retinoblastomą) i *TP53* (Chen i wsp., 2020). Działają one jako centralne ośrodki kontrolne w dwóch kluczowych, uzupełniających się systemach regulacji komórkowej, które kontrolują proces proliferacji komórek lub, alternatywnie, aktywują programy starzenia i apoptozy (Sherr i McCormick, 2002).

Białko *RB* integruje sygnały z różnych zewnętrznych i wewnątrzkomórkowych źródeł, co decyduje, czy komórka powinna wejść w cykl komórkowy. Komórki nowotworowe z defektami na poziomie szlaku z udziałem białka *RB* nie mogą korzystać z jego kluczowej funkcji - regulatora progresji cyklu komórkowego, ponieważ brak tego białka pozwala na trwałą proliferację komórek (Burkhardt i Sage, 2008; Burkhardt i wsp., 2019). Podczas gdy *RB* przekazuje sygnały hamujące wzrost, które pochodzą głównie spoza komórki, białko *p53* otrzymuje bodźce pochodzące z wewnątrzkomórkowych czujników stresu i innych nieprawidłowości. Białko *p53* potocznie nazywane jest „strażnikiem genomu”, gdyż pełni kluczową funkcję w procesie regulacji naprawy uszkodzonego DNA oraz w trakcie podziałów komórkowych. Jeśli

stopień uszkodzenia genomu jest nadmierny lub jeśli poziomy puli nukleotydów, sygnałów stymulujących wzrost, glukozy lub natlenienia są nieoptymalne, p53 może zahamować postęp cyklu komórkowego, dopóki warunki te nie zostaną ustabilizowane. Alternatywnie, w obliczu sygnałów alarmowych wskazujących na nadmierne lub nieodwracalne uszkodzenia systemów komórkowych, p53 może zainicjować proces apoptozy (Hassin i Oren, 2023). W wyniku mutacji w genie *TP53* może dojść do utraty kontroli nad podziałami komórkowymi oraz zahamowania mechanizmów inicjujących proces apoptozy w przypadku dużych uszkodzeń DNA. Konsekwencją takich mutacji mogą być transformacje nowotworowe spowodowane gromadzącymi się uszkodzeniami DNA w komórkach (Machado-Silva i wsp., 2010).

1.1.3. Unikanie śmierci komórkowej

Koncepcja, zgodnie z którą zaprogramowana śmierć komórki w wyniku apoptozy służy jako naturalna bariera dla rozwoju nowotworu, została ugruntowana w badaniach funkcjonalnych przeprowadzonych w ciągu ostatnich trzech dekad (Evan i Littlewood, 1998; Pistritto i wsp., 2016). Wyjaśnienie mechanizmów sygnałowych regulujących proces apoptozy ujawniło, w jaki sposób apoptoza jest inicjowana w odpowiedzi na różne czynniki stresowe, których doświadczają komórki nowotworowe w trakcie procesu nowotworzenia lub w wyniku terapii przeciwnowotworowej. Wśród czynników indukujących apoptozę na uwagę zasługują zaburzenia równowagi sygnalizacyjnej wynikające z podwyższonego poziomu ekspresji onkogenów oraz uszkodzenia DNA związane z nadmierną proliferacją. Kolejne badania ujawniły, w jaki sposób apoptoza jest tłumiona w nowotworach, którym udaje się osiągnąć wysoki stopień złośliwości i oporność na terapię (Lowe i wsp., 2004; Mohammad i wsp., 2015).

Maszyneria apoptotyczna składa się zarówno z podjednostek regulatorowych, jak i efektorowych. Regulatory dzielą się na dwa główne układy, z których jeden odbiera i przetwarza zewnątrzkomórkowe sygnały indukujące śmierć (zewnętrzny pochodny program apoptotyczny, obejmujący na przykład ligand Fas/receptor Fas), a drugi wykrywa i integruje różnorodne sygnały pochodzenia wewnątrzkomórkowego (program wewnętrzny pochodny). Aktywator apoptozy, który przekazuje sygnały między regulatorami i efektorami, jest kontrolowany przez równoważących się pro- i antyapoptotycznych członków z rodziny białek regulatorowych Bcl-2 (Adams i Cory, 2007). Najwcześniej poznane z tej rodziny, Bcl-2, wraz z najbliższymi spokrewnionymi (Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) są inhibitorami apoptozy, działając w dużej mierze poprzez wiązanie i tym samym hamowanie dwóch proapoptotycznych białek inicjujących (Bax i Bak) (Ashkenazi i wsp., 2017). Po uwolnieniu od inhibicji przez białka antyapoptotyczne - Bax i Bak, naruszają integralność zewnętrznej błony mitochondrialnej, powodując uwolnienie proapoptotycznych białek sygnałowych, z których najważniejszym jest cytochrom c. Uwolniony cytochrom c aktywuje z kolei kaskadę kaspaz, które

działają poprzez swoją aktywność proteolityczną w celu wywołania wielu zmian komórkowych, w wyniku których komórka jest stopniowo rozkładana a następnie trawiona. Bax i Bak mają wspólne domeny interakcji białko-białko, zwane motywami BH3, z antyapoptotycznymi białkami podobnymi do Bcl-2. Aktywność podrodziny białek BH3-only, z których każde zawiera pojedynczy motyw BH3, jest sprzężona z różnymi detektorami nieprawidłowości komórkowych. Obecnie, wewnątrzpochodny proces apoptozy jest coraz częściej uważany za barierę w patogenezie nowotworów (Willis i Adams, 2005; Goldar i wsp., 2015).

Pomimo że czynniki komórkowe indukujące apoptozę nie zostały jeszcze w pełni poznane, zidentyfikowano kilka detektorów anomalii, które odgrywają kluczową rolę w rozwoju nowotworów (Lowe i wsp., 2004). Na uwagę zasługuje sensor uszkodzeń DNA, który działa poprzez supresor nowotworowy białko p53, kodowane przez gen *TP53*. *TP53* indukuje apoptozę poprzez zwiększenie ekspresji dwóch białek BH3-only: Noxa i Puma, w odpowiedzi na wysoki poziom uszkodzeń DNA i innych nieprawidłowości chromosomalnych (Junttila i Evan, 2009). Komórki nowotworowe rozwijają różne strategie mające na celu zahamowanie lub uniknięcie apoptozy (Hassin i Oren, 2023). Najczęstszą z nich jest upośledzenie funkcji supresora nowotworowego p53, co eliminuje kluczowy czujnik uszkodzeń DNA z układu indukującego apoptozę. Ponadto nowotwory mogą osiągnąć podobny efekt poprzez zwiększenie ekspresji regulatorów antyapoptotycznych (Bcl-2, Bcl-xL) lub sygnałów przetrwania (Igf1/2), poprzez zmniejszenie poziomu czynników proapoptotycznych (Bax, Bim, Puma). Mnogość mechanizmów unikania apoptozy odzwierciedla zróżnicowanie sygnałów indukujących apoptozę, z którymi populacje komórek nowotworowych stykają się podczas ewolucji do stanu złośliwego (Lowe i wsp., 2004; Hassin i Oren, 2023).

1.1.4. Nieśmiertelność replikacyjna

Do 2000 roku uważano, że komórki nowotworowe wymagają nieograniczonego potencjału replikacyjnego w celu tworzenia makroskopowych guzów. Zdolność ta stanowi wyraźny kontrast w stosunku do zachowania większości prawidłowych komórek w organizmie, które są w stanie przejść tylko przez ograniczoną liczbę kolejnych cykli wzrostu i podziału komórek. Ograniczenie to wiąże się z dwiema różnymi barierami dla proliferacji: starzeniem się, czyli nieodwracalnym wejściem w nieproliferacyjny, aczkolwiek nadal żywy stan, oraz etapem krytycznym, który wiąże się ze śmiercią komórki. W związku z tym, gdy komórki są namnażane w hodowli, powtarzające się cykle podziału komórek prowadzą najpierw do indukcji starzenia się, a następnie, w przypadku tych komórek, którym uda się ominąć tę barierę, do fazy kryzysu, czyli apoptozy, w której umiera zdecydowana większość komórek w populacji. Czasami komórki wydostają się z populacji w fazie kryzysu i wykazują nieograniczony potencjał replikacyjny. To przejście, nazwane immortalizacją jest cechą, którą wykazuje większość ustalonych linii

komórkowych ze względu na ich zdolność do proliferacji w hodowli bez oznak starzenia się lub kryzysu (Shay i Wright, 2000). Wiele dowodów wskazuje na to, że telomery, chroniące zakończenia chromosomów przed degradacją i fuzją, mają zasadniczy wpływ na zdolność do nieograniczonej proliferacji. Badania nad telomerami i telomerazą (Blackburn i wsp., 2015) zostały nagrodzone w 2009 r. Nagrodą Nobla dla Elizabeth Blackburn. W prawidłowych komórkach, telomery, czyli powtarzające się sekwencje nukleotydowe, stopniowo się skracają, tracąc ostatecznie zdolność do ochrony końców chromosomalnego DNA, co prowadzi do śmierci komórkowej. Jest to jeden z wielu mechanizmów inicjujących proces apoptozy i naturalny efekt starzenia się komórek. W związku z tym długość telomerowego DNA w komórce decyduje o tym, przez ile kolejnych generacji komórek może przejść jej potomstwo, zanim telomery ulegną znacznej degradacji i w konsekwencji stracą swoje funkcje ochronne, powodując wejście w fazę kryzysu (Blasco, 2005).

Telomeraza, wyspecjalizowana polimeraza DNA, która dodaje powtórzone sekwencje nukleotydowe na końcach telomerowego DNA, jest prawie nieobecna w nieuniesmiertelnionych komórkach, ale ulega ekspresji na funkcjonalnie istotnym poziomie w zdecydowanej większości (~90%) spontanicznie uniesmiertelnionych komórek, w tym w ludzkich komórkach nowotworowych (Judasz i wsp., 2022). Wydłużając telomerowe DNA, telomeraza jest w stanie przeciwdziałać postępującej erozji telomerów, która wystąpiłaby w przypadku jej braku (Zhang i wsp., 2004). Aktywność telomerazy, zarówno w spontanicznie uniesmiertelnionych komórkach, jak i w przypadku komórek zmodyfikowanych w celu ekspresji tego enzymu, jest skorelowana z opornością na indukcję starzenia oraz kryzysu/apoptozy (Bernardes de Jesus i Blasco, 2013). Ostateczne uniesmiertelnienie komórek, tworzących nowotwory, przypisuje się ich zdolności do utrzymywania długości telomerowego DNA na poziomie wystarczającym do uniknięcia starzenia się lub apoptozy (Donati i Ciarrocchi, 2019). W związku z tym skracanie telomerów zaczęto postrzegać jako mechanizm zegarowy, który określa ograniczony potencjał replikacyjny normalnych komórek, a tym samym taki, który musi zostać przewyciężony przez komórki nowotworowe (Sherr i DePinho, 2000).

1.1.5. Indukcja angiogenezy

Podobnie jak tkanki prawidłowe, nowotwory wymagają dostarczenia składników odżywczych i tlenu, a także zdolności do usuwania odpadów metabolicznych i dwutlenku węgla. Neowaskularyzacja towarzysząca powstawaniu nowotworu, zachodząca w procesie angiogenezy, zaspokaja te potrzeby. Podczas embriogenezy rozwój układu naczyniowego obejmuje tworzenie nowych komórek śródbłonna i łączenie ich w rurki (waskulogeneza), a także tworzenie nowych naczyń krwionośnych z już istniejących (angiogeneza). Po tej morfogenezie normalne naczynia krwionośne przechodzą w stan spoczynku. U osób dorosłych, w ramach procesów fizjologicznych, takich jak gojenie się ran czy cykle menstruacyjne u kobiet,

angiogeneza jest włączona, ale tylko przejściowo. W przeciwieństwie do tego, podczas progresji nowotworu "przełącznik angiogeny" jest niemal zawsze aktywowany i pozostaje włączony, powodując, że normalnie uśpione naczynia krwionośne nieustannie powodują wyrastanie nowych naczyń, które pomagają utrzymać rozszerzający się wzrost nowotworowy (Hanahan i Folkman, 1996). Wiele dowodów wskazuje na to, że proces angiogenezy jest regulowany przez równoważące się czynniki indukujące lub hamujące angiogenezę (Bergers i Benjamin, 2003). Wśród czynników regulujących angiogenezę znajdują się białka sygnałowe, które wiążą się ze stymulatorowymi lub hamującymi receptorami znajdującymi się na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego. Do dobrze znanych aktywatorów i inhibitorów angiogenezy należą odpowiednio czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego-A (VEGF-A) i trombospondyna-1 (TSP-1) (Baeriswyl i Christofori, 2009).

Gen *VEGF-A* koduje ligandy zaangażowane w organizowanie wzrostu nowych naczyń krwionośnych podczas rozwoju embrionalnego i postnatalnego, a następnie w homeostazę komórek śródbłonka, a także w sytuacjach fizjologicznych i patologicznych u dorosłych (Melincovici i wsp., 2018). Sygnalizacja VEGF za pośrednictwem trzech receptorowych kinaz tyrozynowych (VEGFR-1-3) jest regulowana na wielu poziomach. Tak więc ekspresja genu *VEGF* może być regulowana zarówno przez hipoksję, jak i przez sygnalizację onkogenów (Carmeliet, 2005). Ponadto ligandy VEGF wiążą się do macierzy zewnątrzkomórkowej w postaciach utajonych, które mogą być uwalniane i aktywowane przez proteazy degradujące macierz zewnątrzkomórkową (np. MMP-9) (Kessenbrock i wsp., 2010). Dodatkowo, inne sygnały proangiogenne, na przykład członkowie rodziny czynników wzrostu fibroblastów (FGF), są zaangażowane w podtrzymywanie angiogenezy nowotworowej, jeżeli ich ekspresja jest chronicznie podwyższona (Baeriswyl i Christofori, 2009; Ruan i wsp., 2023). TSP-1, który stanowi kluczowy czynnik równoważący w procesie angiogenezy, również wiąże się z receptorami transbłonowymi na komórkach śródbłonka i w ten sposób generuje sygnały hamujące, które mogą przeciwdziałać bodźcom proangiogenym (Kazerounian i wsp., 2008; Gutierrez i Gutierrez, 2021).

Naczynia krwionośne powstające w nowotworach w wyniku przewlekłe aktywowanej angiogenezy i zachwianej równowagi sygnałów proangiogenych są zazwyczaj nieprawidłowe: neowaskularyzacja guza charakteryzuje się przedwczesnym wyrastaniem naczyń włosowatych, krętymi i zbyt rozgałęzionymi naczyniami, nieregularnym przepływem krwi, mikrokrwotokami, nieszczelnością oraz nieprawidłowymi wskaźnikami proliferacji i apoptozy komórek śródbłonka (Baluk i wsp., 2005). Angiogeneza jest indukowana zaskakująco wcześnie podczas wieloetapowego rozwoju nowotworów inwazyjnych zarówno w modelach zwierzęcych, jak i u ludzi (Hanahan i Folkman, 1996). Proces ten wspiera proliferację komórek nowotworowych a w konsekwencji rozrost struktury nowotworu. Wykazano też, że angiogeneza jest bezpośrednio związana ze zwiększeniem przerzutowania, gdyż umożliwia migrację komórek raka przez naczynia krwionośne (Raica i wsp., 2009; Al-Ostoot i wsp., 2021).

1.1.6. Aktywacja inwazji i przerzutowania

Do 2000 roku mechanizmy leżące u podstaw inwazji i powstawania przerzutów były w dużej mierze zagadką. Było jasne, że w miarę progresji nowotworów wywodzących się z tkanek nabłonkowych do wyższych patologicznych stopni złośliwości, objawiających się miejscową inwazją i odległymi przerzutami, w powiązanych z nimi komórkach nowotworowych zazwyczaj dochodziło do zmian w ich kształcie, a także w sposobie przyłączania się do innych komórek i macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Najlepiej opisaną zmianą jest utrata przez komórki nowotworowe E-kadheryny, kluczowej cząsteczki adhezyjnej między komórkami. Tworząc połączenia adhezyjne z sąsiadującymi komórkami nabłonkowymi, E-kadheryna pomaga łączyć warstwy komórek nabłonkowych i utrzymywać stabilność komórek w tych warstwach. Zwiększona ekspresja E-kadheryny została uznana za antagonistę inwazji i przerzutów, podczas gdy zmniejszenie jej ekspresji nasila te fenotypy (Berx i Roy, 2009).

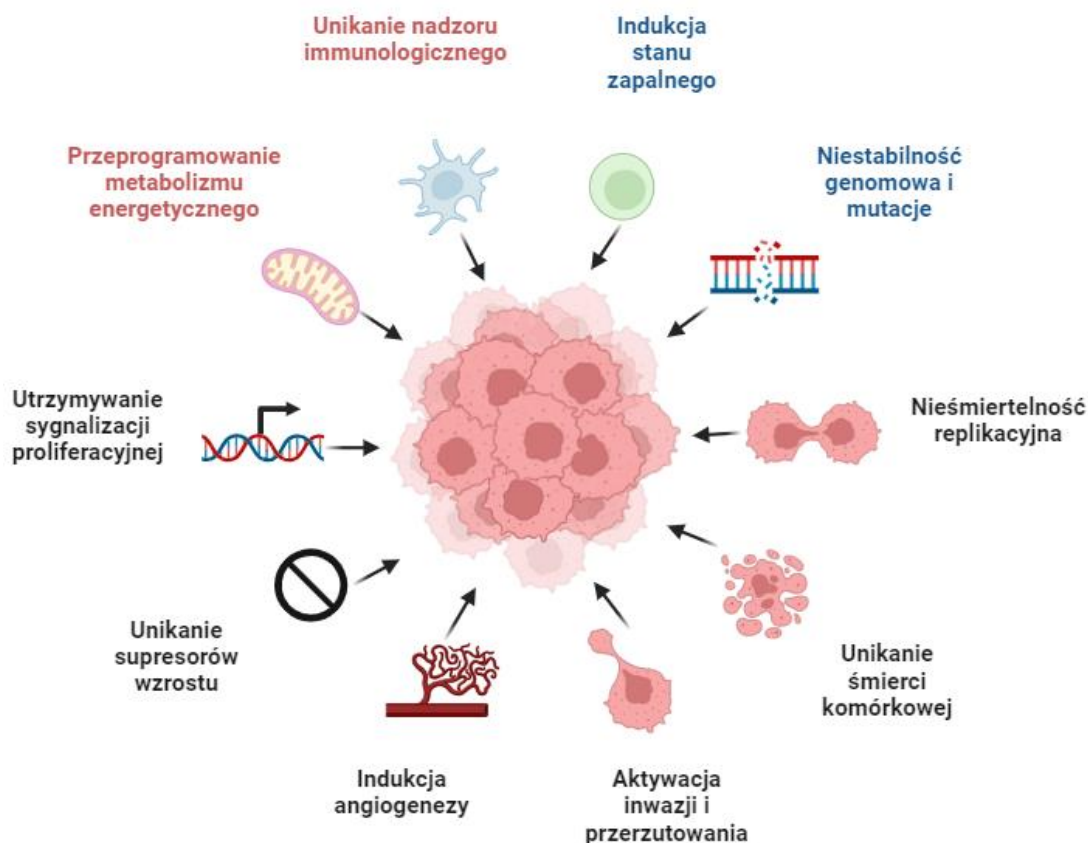
Wieloetapowy proces inwazji i przerzutowania został przedstawiony jako sekwencja odrębnych etapów, często określanych jako kaskada inwazji i przerzutów (Fidler, 2003; Talmadge i Fidler, 2010). Obniżona ekspresja E-kadheryny, skutkuje osłabieniem połączeń międzykomórkowych co prowadzi do odłączania komórek od głównej masy nowotworu (Mendonsa i wsp., 2018). Dochodzi do lokalnej migracji komórek do otaczającej je macierzy zewnątrzkomórkowej, następnie inwazji komórek nowotworowych do pobliskich naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz przejścia przez układ limfatyczny i krwiotwórczy. W kolejnym etapie dochodzi do uwolnienia komórek nowotworowych ze światła takich naczyń do mięszu odległych tkanek (wynaczynienie), tworzenia małych guzków komórek nowotworowych (mikroprzeruty) oraz rozrostu zmian mikroprzerutowych do makroskopowych guzów, przy czym ten ostatni etap określa się mianem "kolonizacji" (Rubtsova i wsp., 2022).

1.1.7. Nabywanie cech charakterystycznych

Opisane powyżej cechy charakterystyczne nowotworów to nabyte zdolności funkcjonalne, które pozwalają komórkom nowotworowym przetrwać, rozmnażać się i rozprzestrzeniać. Funkcje te są nabywane w różnych typach nowotworów poprzez różne mechanizmy i na różnych etapach w trakcie złożonego procesu nowotworzenia. Proces ten jest możliwy dzięki dwóm właściwościom (Ryc.1.2.). Najważniejszą z nich jest powstawanie niestabilności genomowej w komórkach nowotworowych, która generuje przypadkowe mutacje, w tym rearanżacje chromosomalne, wśród których znajdują się rzadkie zmiany genetyczne, umożliwiające rozwinięcie

charakterystycznych cech (Negrini i wsp., 2010; Mehrotra i Mittra, 2020). Drugą charakterystyczną właściwością, dla procesu nowotworzenia, jest indukowanie stanu zapalnego zmian przednowotworowych i złośliwych (Mantovani i wsp., 2008). Proces ten stymulują niektóre komórki układu odpornościowego odpowiedzialne za pobudzanie progresji nowotworu za pomocą różnych mechanizmów (Piotrowski i wsp., 2020).

Dodatkowo, na przestrzeni ostatnich lat, wykazano obecność kolejnych cech komórek nowotworowych, funkcjonalnie ważnych dla rozwoju raka (Ryc.1.2.). Szczególnie interesujące okazały się dwie z nich. Pierwsza polega na gruntownym przeprogramowaniu metabolizmu energetycznego w celu wspierania ciągłego wzrostu i proliferacji komórek, zastępując tym samym proces metaboliczny, który działa w większości normalnych tkanek i wspiera fizjologiczne funkcjonowanie powiązanych z nimi komórek (Jones i Thompson, 2009). Druga obejmuje aktywne unikanie przez komórki nowotworowe nadzoru immunologicznego, czyli eliminacji komórek rakowych przez komórki układu odpornościowego, w szczególności przez limfocyty T i B, makrofagi oraz komórki NK (Ferrari i wsp., 2019). Zdolność ta podkreśla dychotomiczną rolę układu odpornościowego, który zarówno hamuje, jak i wspomaga rozwój i progresję nowotworu (Kim, 2007). Obecnie obie z powyższych cech uważa się za równie fundamentalne jak sześć głównych opisanych w powyższych podrozdziałach (Hanahan i Weinberg, 2011).



Ryc. 1.2. Cechy charakterystyczne komórek nowotworowych. Schemat uzupełniono o właściwości odpowiedzialne za nabywanie cech charakterystycznych – niebieska czcionka oraz dwie nowe cechy – czerwona czcionka. Schemat zmodyfikowany na podstawie Hanahan i Weinberg, 2011.

1.1.8. Przeprogramowany metabolizm komórkowy nowotworów

Przewlekła i często niekontrolowana proliferacja komórek, która stanowi istotę choroby nowotworowej, obejmuje nie tylko rozregulowaną kontrolę proliferacji, ale także odpowiednie dostosowanie metabolizmu energetycznego w celu napędzania wzrostu i podziału komórek. Aby zaspokoić zapotrzebowanie na zwiększoną ilość składników odżywczych, w komórkach nowotworowych zaobserwowano wzrost poziomu kilku transporterów składników odżywczych z rodzin SLC (ang. Solute Carriers), takich jak transportery glukozy (Yu i wsp., 2017) i aminokwasów (Bhutia i wsp., 2015; Nałęcz, 2020).

Glukoza jest głównym źródłem węgla używanym przez komórki ssaków. Katabolizm glukozy poprzez glikolizę i cykl Krebsa nie tylko napędza wytwarzanie ATP, ale także dostarcza półprodukty węglowe wspierające biosyntezę makrocząsteczek, zapewniając w ten sposób selektywną przewagę komórkom nowotworowym przy zmniejszonej podaży składników odżywczych. Zgromadzone dane wskazują również, że wewnątrzkomórkowy ATP jest krytycznym czynnikiem determinującym chemiooporność (Ganapathy-

Kanniappan i Geschwind, 2013). W warunkach tlenowych prawidłowe komórki przekształcają glukozę, najpierw do pirogronianu poprzez glikolizę w cytozolu, a następnie do dwutlenku węgla w mitochondriach. W warunkach beztlenowych preferowana jest glikoliza, a stosunkowo niewielka ilość pirogronianu jest wysyłana do mitochondriów zużywających tlen. Otto Warburg po raz pierwszy zaobserwował anomalną cechę metabolizmu energetycznego komórek nowotworowych (Warburg, 1956). Wykazał, że nawet w obecności tlenu komórki nowotworowe mogą przeprogramować swój metabolizm glukozy, a tym samym produkcję energii, ograniczając metabolizm energetyczny głównie do glikolizy, co prowadzi do stanu, który został nazwany "glikolizą tlenową". Istnienie tego metabolicznego przełącznika w komórkach nowotworowych zostało potwierdzone w kolejnych dziesięcioleciach (Vaupel i wsp., 2019). Takie przeprogramowanie metabolizmu energetycznego jest pozornie nielogiczne, ponieważ komórki nowotworowe muszą zrekompensować ~18-krotnie niższą wydajność produkcji ATP zapewnianą przez glikolizę w stosunku do mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej. Jest to możliwe dzięki nadekspresji transporterów glukozy, w szczególności SLC2A1 (GLUT1), co znacznie zwiększa import glukozy do cytoplazmy a tym samym glikolizę (DeBerardinis i wsp., 2008; Hsu i Sabatini, 2008; Du i wsp., 2022).

Wykazano, że przeprogramowanie glikolityczne jest związane z aktywowanymi onkogenami (np. *RAS*, *MYC*) i zmutowanymi supresorami nowotworów (np. *TP53*) (DeBerardinis i wsp., 2008; Senga i Grose, 2021), których mutacje w komórkach nowotworowych są istotne głównie ze względu na ich korzyści w nadawaniu charakterystycznych zdolności proliferacji komórek, unikania kontroli cytotatyków i tłumienia apoptozy (Hanahan i Weinberg, 2011; Pavlova i wsp., 2022). Zależność od glikolizy jest dodatkowo ważna w warunkach niedotlenienia, które ma miejsce w wielu nowotworach (Zhang i wsp., 2018). System odpowiedzi na niedotlenienie działa plejotropowo w celu zwiększenia regulacji transporterów glukozy i wielu enzymów szlaku glikolitycznego (DeBerardinis i wsp., 2008; Jones i Thompson, 2009; Lee i wsp., 2021). Tak więc, zarówno białko onkogenne Ras, jak i niedotlenienie mogą niezależnie zwiększać poziom czynników transkrypcyjnych HIF1 α i HIF2 α , które z kolei regulują glikolizę (Semenza, 2010; Infantino i wsp., 2021; Toledo i wsp., 2023).

Procesy anaboliczne wymagają przede wszystkim dostarczania energii w postaci ATP, ale również nukleotydów redukujących, takich jak NADH, NADPH i FADH₂, które mogą powstawać w wyniku utleniania kwasów tłuszczowych, procesu przez wiele lat pomijanego w chorobach nowotworowych. Chociaż β -oksydacja kwasów tłuszczowych (FAO – ang. fatty acid β -oxidation) jest jednym z głównych źródeł produkcji ATP, większość wcześniejszych badań bioenergetyki nowotworów koncentrowała się na efekcie Warburga (Vander Heiden i wsp., 2009; Cairns i wsp., 2011). Istnieje coraz więcej doniesień na temat znaczenia utleniania kwasów tłuszczowych w komórkach nowotworowych (Carracedo i wsp., 2013), a proces ten zaobserwowano w raku prostaty (Schlaepfer i wsp., 2014), białaczce (Samudio

i wsp., 2010), glejakach (Juraszek i wsp., 2021) i raku piersi (Camarda i wsp., 2016). Wiele komórek nowotworowych wykorzystuje FAO w kontekście proliferacji, przeżycia, oporności na leki lub przerzutów. Kluczowe enzymy lub regulatory FAO stały się zatem obiecującymi celami terapii przeciwnowotworowej (Ma i wsp., 2018).

β -Oksydacja kwasów tłuszczowych to wieloetapowy proces kataboliczny, który pozwala na mitochondrialną konwersję długołańcuchowych kwasów tłuszczowych do acetylo-CoA, który zostanie w pełni utleniony poprzez cykl kwasów trikarboksylowych (TCA, ang. tricarboxylic acid cycle) i łańcuch oddechowy (ETC, ang. electron transport chain) w celu wytworzenia ATP. Utlenianie kwasów tłuszczowych zachodzi w peroksysomach (kwasy tłuszczowe o bardzo długich łańcuchach i kwasy tłuszczowe o rozgałęzionych łańcuchach) oraz w mitochondriach (kwasy tłuszczowe o długich i średnich łańcuchach). Kwasy tłuszczowe dostają się do komórek ssaków poprzez białka transportujące kwasy tłuszczowe, takie jak CD36 i białka wiążące kwasy tłuszczowe, które ułatwiają przenoszenie kwasów tłuszczowych między błonami zewnątrz- i wewnątrzkomórkowymi (Schwenk i wsp., 2010). Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe nie są w stanie przekraczać błon mitochondrialnych, dlatego przed przemieszczeniem do mitochondrium w celu utlenienia, są aktywowane do acylo-CoA przez syntetazę acylo-CoA w zewnętrznej błonie mitochondrialnej kosztem hydrolizy ATP (Nakamura i wsp., 2014). Aby przekroczyć wewnętrzną błonę mitochondrialną, acylo-CoA jest przekształcany w acylo-karnitynę w reakcji z L-karnityną, proces katalizowany przez palmitoilotransferazę karnityny 1 (CPT1), enzym ulegający podwyższonej ekspresji w komórkach raka piersi ER- α^+ (Monaco, 2017). Acylo-karnityny są transportowane do macierzy mitochondrialnej przez transporter karnityny SLC25A20 (CAC/CACT) w reakcji wymiany z wolną karnityną (Juraszek i wsp., Nałęcz 2021; Papierniak-Wyglądała i wsp., 2023). U ludzi L-karnityna może być syntetyzowana w wątrobie i nerkach, jednak większość (około 75%) pochodzi z diety (Steiber i wsp., 2004). W związku z tym, L-karnityna, niezbędna w procesie β -oksydacji, musi być dostarczana do komórek, w tym nowotworowych. Wykazano, że kilka transporterów, takich jak SLC22A16 (CT2/FLIP2), SLC6A14 (ATB^{0,+}) i SLC22A5 (OCTN2) jest zdolnych do przenoszenia karnityny przez błonę plazmatyczną w komórkach ludzkich (Juraszek i Nałęcz, 2020).

1.2. Transportery aminokwasów z rodziny SLC (ang. Solute Carrier Family) w chorobie nowotworowej

Jedną z wyżej wymienionych cech charakterystycznych komórek nowotworowych jest ich zdolność do szybkiego wzrostu i proliferacji (Hanahan i Weinberg, 2011), która opiera się na dostarczaniu energii i aktywnych procesach anabolicznych, a to z kolei wymaga dostarczenia czynników odżywczych. Związki polarne i/lub hydrofilne nie przechodzą przez dwuwarstwą lipidową i wymagają aktywności układów transportowych.

Początkowo układy te klasyfikowano ze względu na specyficzność substratową, obecna klasyfikacja opiera się na podobieństwie genów tworzących rodziny *SLC* z odpowiednią numeracją rodzin i kolejnych genów (Hediger i wsp., 2013). W ciągu ostatnich lat tradycyjne nazwy transporterów kodowanych przez geny *SLC* z 66 rodzin zastąpiono numeracją *SLC* zastosowaną także do białek.

Szereg transporterów *SLC* ulega zwiększonej ekspresji w nowotworach, jak transporter glukozy *SLC2A1* – *GLUT1* (Yamamoto i wsp., 1990; Yu i wsp., 2017), czy transportery nukleozydów z rodzin *SLC28* i *SLC29* (Young, 2016). Ważną klasą głównych składników odżywczych niezbędnych do przetrwania każdej komórki są aminokwasy. Wszystkie komórki ssaków, niezależnie od tego, czy są nowotworowe, czy nie, muszą pozyskiwać niezbędne aminokwasy (Thr, Met, Phe, Trp, Val, Ile, Leu i Lys) ze źródeł zewnętrznych, ponieważ nie są w stanie ich syntetyzować. Nieistotne aminokwasy mogą być syntetyzowane endogennie we wszystkich komórkach ssaków, ale jeśli tempo proliferacji jest szybkie, tak jak ma to miejsce w przypadku komórek nowotworowych, nawet te aminokwasy muszą być pozyskiwane ze źródeł zewnętrznych, ponieważ zdolność syntezy endogennej nie spełnia zwiększonego zapotrzebowania silnie proliferujących komórek. Chociaż podstawową funkcją aminokwasów jest służyć jako budulec do syntezy białek, niektóre aminokwasy mają określone funkcje biologiczne (Bhutia i wsp., 2015). Glutamina, glicyna i asparaginian są potrzebne do biosyntezy nukleotydów, procesu krytycznego dla proliferacji komórek nowotworowych (Wise i Thompson, 2010). Seryna odgrywa ważną rolę jako źródło jednowęglowe istotne w syntezie nukleotydów i metylacji DNA (Locasale, 2013). Leucyna, glutamina i arginina służą jako cząsteczki sygnałowe i aktywują *mTOR*, kinazę białkową kluczową w metabolizmie komórkowym (Pizzagalli i wsp., 2021). Badania wykazały, że komórki nowotworowe mają zmienione szlaki metaboliczne obejmujące aminokwasy glutaminę, serynę, treoninę i prolinę (Phang i wsp., 2015).

Szczególne znaczenie dla etiologii raka ma rozregulowanie metabolizmu leucyny i/lub glutaminy. Leucyna służy jako główny mechanizm regulacyjny *mTOR* w wielu tkankach. Komórki nowotworowe często wykazują nadekspresję transporterów leucyny, co prowadzi do wyższych wewnątrzkomórkowych stężeń leucyny, aktywacji *mTOR* i w konsekwencji do proliferacji komórek nowotworowych (Avruch i wsp., 2009). Z drugiej strony glutamina pełni w komórkach wiele różnych ról: jako nośnik amoniaku w tkankach, regulator równowagi kwasowo-zasadowej w komórkach nerek czy prekursor związków takich jak glutation, glutaminian i GABA (Bhutia i Ganapathy, 2016). Aminokwas ten jest istotny w syntezie *de novo* nukleotydów i jest prekursorem innych aminokwasów, stanowi źródło α -ketoglutaranu w cyklu TCA i pomaga regulować równowagę redoks w komórkach. Role te sprawiają, że glutamina jest krytycznym metabolitem komórek nowotworowych (Cha i wsp., 2018). Wszystkie aminokwasy są hydrofilowe dlatego nie mogą przejść przez błonę plazmatyczną bez pomocy selektywnych białek transportowych. W komórkach ssaków występuje wiele transporterów aminokwasów, które ulegają ekspresji w sposób specyficzny dla tkanki i rozwoju. Większość

transporterów rozpoznaje więcej niż jeden aminokwas jako substrat. Ponieważ szybko proliferujące komórki nowotworowe mają wysokie zapotrzebowanie na aminokwasy, logicznym jest że muszą podnosić poziom niektórych selektywnych transporterów, aby zaspokoić to zapotrzebowanie. Szlaki sygnałowe odpowiedzialne za inicjację i rozprzestrzenianie się nowotworu różnią się znacznie w zależności od jego typu, tak więc różne nowotwory polegają na innym zestawie transporterów aminokwasów (Ganapathy i wsp., 2003).

Wykazano, że cztery transportery aminokwasów ulegają nadekspresji w nowotworach: SLC7A5 (LAT1), SLC7A11 (xCT), SLC1A5 (ASCT2) oraz SLC6A14 (ATB^{0,+}) (Tabela 1.1.). Ich indukcja zachodzi w sposób specyficzny dla typu nowotworu, z bezpośrednim lub pośrednim udziałem onkogenego czynnika transkrypcyjnego c-Myc (Hayashi i wsp., 2012). Dodatkowo, transportery są funkcjonalnie sprzężone, co maksymalizuje ich funkcje takie jak zdolność do proliferacji i chemiooporności komórek nowotworowych. Na przestrzeni ostatnich lat poczyniono postępy w badaniach przedklinicznych, w których wykorzystano transportery jako cele leków w terapii nowotworów. Okazały się również obiecującym celem w zakresie opracowywania sond do obrazowania nowotworów i specyficznego dla danego typu nowotworu dostarczania odpowiednio zaprojektowanych chemioterapeutyków (Bhutia i wsp., 2015).

Tabela 1.1. Transportery ulegające nadekspresji w nowotworach.

Transporter (nazwa)	Przenoszone substraty	Mechanizm transportu	Inhibitor(y)
<i>SLC1A5/ASCT2</i>	Ala, Ser, Cys, Thr, Gln	Obowiązkowa wymiana: Na ⁺ /AA za Na ⁺ /AA Elektroneutralny	O-benzyloseryna γ-glutamyl-p-nitroanilid
<i>SLC7A5/LAT1</i>	Duże aminokwasy obojętne	Obowiązkowa wymiana: AA za AA Elektroneutralny	BCH JPH203
<i>SLC7A11/xCT</i>	Cystyna, glutaminian	Obowiązkowa wymiana: AA za AA Elektroneutralny	Sulfasalazyna Erastyna Sorafenib
<i>SLC6A14/ATB</i> ^{0,+}	Aminokwasy dodatnie i obojętne	Jednokierunkowy AA w symporcie z 2 Na ⁺ / 1 Cl ⁻ Elektrogeny	α-metylo-L-tryptofan

AA – aminokwas; BCH – kwas bicyklo[2.2.1]heptan{3}}karboksylowy; JPH203 - Kwas (S)-2-amino-3-(4-((5-amino-2-fenylbenzo[d]oksazol-7-yl)metoksy)3,5-dichlorofenyl)propionowy (Bhutia i wsp., 2015).

SLC7A5 reprezentuje jeden z transporterów aminokwasów systemu L (preferujących leucynę – substrat) (Fotiadis i wsp., 2013), znany również jako LAT1 (ang. L-Amino acid Transporter 1). LAT1 wykazuje wysokie powinowactwo do transportu rozgałęzionych aminokwasów (Val, Ile i Leu), a także dużych aminokwasów (Phe, Tyr, Trp, Gln, Asn i Met). Nie wchodzi w interakcje z aminokwasami anionowymi lub kationowymi. Jego aktywność nie jest sprzężona z żadnymi gradientami jonów, bowiem jest to transporter działający na zasadzie wymiany, co oznacza, że napływ jednego substratu aminokwasowego do komórek za pośrednictwem tego transportera jest sprzężony z wypływem innego substratu aminokwasowego. SLC7A5 ulega silnej ekspresji w większości nowotworów, co zwiększa prawdopodobieństwo, że transporter ten uczestniczy w utrzymywaniu odżywiania aminokwasowego komórek nowotworowych (Kaira i wsp., 2008). Ostatnie badania wykazały, że indukowany hipoksją czynnik HIF2α zwiększa ekspresję *SLC7A5*. Ponieważ niedotlenienie odgrywa kluczową rolę we wzroście i progresji nowotworu, kontrola ekspresji *SLC7A5* przez HIF2α stanowi molekularny mechanizm odpowiadający za wysoką ekspresję tego transportera w nowotworach (Elorza i wsp., 2012). Promotor *SLC7A5* ma również kanoniczne miejsca wiązania onkogenu c-Myc, a nadekspresja tego onkogenu powoduje zwiększoną ekspresję *SLC7A5* (Gao i wsp., 2009). Oprócz związku między *SLC7A5* a

prokancerogennymi czynnikami transkrypcyjnymi HIF2 α i c-Myc, jego zdolność do koordynowania wychwytu leucyny z wysokim powinowactwem wzbudziła zainteresowanie tym transporterem w kontekście raka. Leucyna jest dobrze znanym aktywatorem szlaku sygnalizacyjnego mTOR, a farmakologiczne hamowanie funkcji transportowej SLC7A5 hamuje ten szlak oraz rozwój nowotworów w wielu układach modelowych (Taylor, 2014). Udowodniono, że SLC7A5 nie działa samodzielnie w aktywacji mTOR, jest funkcjonalnie sprzężony z SLC1A5, innym transporterem aminokwasów (Nicklin i wsp., 2009). **SLC1A5**, którego historyczna nazwa ASCT2 pochodzi od alaniny, seryny i cysteiny, odpowiada za transport Ala, Val, Met do komórki i dwukierunkowy transport Ser, Thr, Asn i Gln. Cysteina natomiast uruchamia proces wypływu, chociaż sama nie podlega transportowi (Scalise i wsp., 2015). Pomimo, że transport jest elektroujemny, jest on sprzężony z Na⁺ w obu kierunkach. W funkcjonalnym sprzężeniu między SLC7A5 i SLC1A5, glutamina napływa do komórek nowotworowych przez SLC1A5 w reakcji wymiany, a wypływ glutaminy z komórek jest katalizowany przez SLC7A5 w wymianie z leucyną wchodzącą do komórek (Scalise i wsp., 2016). W związku z tym utrata SLC1A5 lub farmakologiczne zahamowanie SLC1A5 prowadzi do niezdolności SLC7A5 do aktywacji mTOR w komórkach nowotworowych. Co ciekawe, SLC1A5 jest również celem dla c-Myc, co oznacza, że oba transportery są indukowane w komórkach nowotworowych w sposób skoordynowany, aby zoptymalizować ich funkcjonowanie w promowaniu wzrostu guza (Wise i wsp., 2008).

SLC7A11 jest transporterem zewnątrzkomórkowej cystyny (Cys-S-S-Cys) sprzężonym z wypływem wewnątrzkomórkowego glutaminianu, reprezentuje system transportu aminokwasów x_c i jest znany również jako xCT (podjednostka katalityczna systemu transportu aminokwasów x_c) (Fotiadis i wsp., 2013). SLC7A11 jest wymiennikiem obowiązkowym niezależnym od jonów Na⁺, co oznacza, że wchodzenie cystyny do komórek jest zawsze sprzężone z wypływem glutaminianu z komórek (Lyons i wsp., 2007). Poziom SLC7A11 wzrasta w różnych nowotworach, w których wspomagana przez transporter synteza glutationu zmniejsza uszkodzenia oksydacyjne i chroni komórki nowotworowe przed apoptozą (Lewerenz i wsp., 2013). Równie ważne jest znaczenie pozakomórkowego glutaminianu dla wzrostu nowotworów. Glutaminian oddziałuje z selektywnymi metabotropowymi receptorami glutaminianu (mGluRs) i jonotropowymi receptorami glutaminianu (iGluRs) na komórkach nowotworowych i wzmacnia sygnalizację onkogenną (Stepulak i wsp., 2014). Znaczenie SLC7A11 jako promotora wzrostu nowotworu jest oczywiste z uwagi na fakt, że transporter jest stabilizowany w błonie plazmatycznej przez specyficzny wariant białka CD44 powiązany z chorobą nowotworową (Ishimoto i wsp., 2011) oraz że ekspresja transportera jest indukowana bezpośrednio przez c-Myc (Kim i wsp., 2008), a także przez proto-onkogen Ets-1 (Verschoor i Singh, 2013). Potwierdzają to również wyniki kilku badań, w których wykazano hamujące działanie inhibitorów SLC7A11 na nowotwory (Lewerenz i wsp., 2013). Oprócz promowania wzrostu guza poprzez procesy obejmujące mechanizmy antyoksydacyjne zarówno wewnątrz, jak i na

zewnątrz komórek oraz autokrynną sygnalizację glutaminianu, SLC7A11 indukuje również chemiooporność na selektywne leki (Huang i wsp., 2005).

Do pełnienia swojej funkcji SLC7A5 i SLC7A11 potrzebują **SLC3A2** (znanego również jako 4F2hc lub CD98hc) jako chaperonu umożliwiającego ich transport do błony plazmatycznej. Oba transportery istnieją w błonie plazmatycznej w postaci heterodimerów w kompleksie z SLC3A2. Sam chaperon nie pełni żadnej funkcji transportowej, ale jego ekspresja jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania SLC7A5 i SLC7A11 (Fotiadis i wsp., 2013). Dodatkowo, SLC3A2 również stanowi cel dla c-Myc i podobnie jak SLC7A5 i SLC7A11, ulega nadekspresji w nowotworach (Kim i wsp., 2008).

SLC6A14 jest unikalny wśród transporterów aminokwasów i bardzo różni się od SLC1A5, SLC7A5 i SLC7A11 tym, że jego funkcja transportowa jest sprzężona z gradientami Na^+ i Cl^- oraz potencjałem błonowym, może więc transportować aminokwas wbrew gradientowi jego stężeń. Gen *SLC6A14* koduje transporter błony komórkowej zwany systemem $\text{B}^{0,+}$ (transporter aminokwasów $\text{ATB}^{0,+}$), którego specyficzność substratowa jest szeroka i obejmuje wszystkie obojętne (indeks „0”) oraz dodatnie (indeks „+”) aminokwasy (Ganapathy i Ganapathy, 2005). W odróżnieniu od wspomnianych wyżej wymienników aminokwasów, transportuje on jedną cząsteczkę aminokwasu w symporcie z 2 Na^+ i 1 Cl^- , wykorzystując także potencjał transbłonowy (Sloan i Mager, 1999). Substraty SLC6A14 obejmują wszystkie niezbędne aminokwasy, w tym glutaminę. W przeciwieństwie do SLC1A5, SLC7A5 i SLC7A11, nie działa jak wymiennik i katalizuje jednokierunkowy napływ swoich substratów do komórek. Ekspresja genu *SLC6A14* jest istotnie zwiększona w kilku ludzkich liniach komórek nowotworowych, a także w próbkach pobranych od pacjentów, w szczególności z guzów litych. Wyjątkowa zdolność SLC6A14 do gromadzenia glutaminy w komórkach nowotworowych prowadzi do funkcjonalnego sprzężenia tego transportera z SLC7A5 i SLC7A11 (Bhutia i wsp., 2015).

SLC6A14 ulega ekspresji w płucach, tchawicy, gruczole ślinowym, a także w żołądku, gruczole sutkowym i hipokampie (Sloan i Mager, 1999). Obecność transportera wykryto ponadto w błonie apikalnej komórek śródbłonna naczyń włosowatych mózgu tworzących barierę krew-mózg (Michalec i wsp., 2014), w astrocytach (Samluk i wsp., 2010) oraz w nabłonku rogówki królika (Jain-Vakkalagadda i wsp., 2004). SLC6A14 wykazuje najwyższe powinowactwo do niepolarnych aminokwasów: izoleucyny, leucyny, metioniny, waliny i seryny, jednak wśród jego substratów znajdują się również glutamina i arginina (Sloan i Mager, 1999), przy czym warto wspomnieć, że glutamina, arginina i leucyna są szczególnie ważne dla wzrostu komórek nowotworowych (Bhutia i wsp., 2015). Poza transportem wszystkich oprócz kwaśnych L-aminokwasów, SLC6A14 transportuje D-serynę, D-alaninę, D-metioninę, D-leucynę i D-tryptofan (Hatanaka i wsp., 2002). Może to wyjaśniać ważną fizjologiczną rolę tego transportera, obecnego w okrzężnicy, we wchłanianiu aminokwasów (Ugawa i wsp., 2001), w tym D-aminokwasów pochodzących z bakterii, w szczególności D-seryny, o której wiadomo, że jest ważnym modulatorem receptorów N-metylo-D-asparaginowych (NMDA) w

mózgu (Matsui i wsp., 1995). Chociaż D-seryna jest syntetyzowana przez komórki glejowe (Wolosker i wsp., 1999), dodatkowy transport tego aminokwasu przez SLC6A14, który jest obecny w barierze krew-mózg, (Michalec i wsp., 2014) może prowadzić do zwiększenia jego poziomu w mózgu. Co więcej, udowodniono również, że SLC6A14 jest transporterem L-karnityny (Nakanishi i wsp., 2001) i, mimo iż transportuje karnitynę z bardzo niskim powinowactwem, w porównaniu z transportem karnityny przez SLC22A5 (OCTN2) - transporter o wysokim powinowactwie, to może częściowo ratować pobieranie karnityny w przypadku mutacji *SLC22A5* (Kido i wsp., 2001).

Wszystkie wyżej wymienione cechy funkcjonalne SLC6A14 sprawiają, że transporter jest obecnie uznawany za marker nowotworowy oraz kluczowy element terapii przeciwnowotworowej. Analiza bazy danych Cancer Genome Atlas (ACGA) wykazała zwiększoną ekspresję genu *SLC6A14* w 12 różnych nowotworach, z najwyższą ekspresją w raku trzustki (Penheiter i wsp., 2015), szyjki macicy (Gupta i wsp., 2006) i jelita grubego (Gupta i wsp., 2005). Nadekspresja tego transportera nie jest jednak powszechna we wszystkich rodzajach nowotworów, SLC6A14 nie ulega nadekspresji w raku piersi, w którym nie dochodzi do ekspresji receptora estrogenowego-ER⁺ (Karunakaran i wsp., 2011).

Sekwencjonowanie RNA zastosowane do analizy ekspresji genów wykryło *SLC6A14*, jako jeden z genów ulegających nadekspresji w tkankach pobranych od pacjentek z rakiem płaskonabłonkowym szyjki macicy o niskim i wysokim stopniu złośliwości (Royse i wsp., 2014). Dowiedziono też, że transporter kolokalizuje z indukowalną syntazą tlenu azotu (iNOS), której poziom również wzrasta w raku szyjki macicy (Eggen i wsp., 2011). Ponieważ wysoki poziom tlenu azotu (NO) prowadzi do apoptozy i jest związany z działaniem protumorogennym, SLC6A14 zdolny do transportu inhibitorów NOS może stać się celem terapeutycznym poprzez zmniejszenie powstawania NO (Nałęcz, 2020). Wzrost iNOS wykryto również w próbkach pochodzących od pacjentów z rakiem jelita grubego (Gupta i wsp., 2005). Co ciekawe, w ciągu ostatnich lat, odnotowano także znaczny wzrost poziomu SLC6A14 w większości linii komórkowych ludzkiego raka okrężnicy oraz w większości ksenograftów pochodzących od pacjentów (Sikder i wsp., 2020). Dowiedziono, że delecja *Slc6a14* chroniła myszy przed rozwojem raka jelita grubego, podczas gdy jego wyciszenie lub hamowanie za pomocą specyficznego blokera - α -metylotryptofanu (α -MT) prowadziło do zmniejszenia wzrostu guza i zahamowania proliferacji w wyniku aktywacji procesów autofagii i apoptozy (Karunakaran i wsp., 2008).

Zwiększenie poziomu SLC6A14 wykryto w tkankach raka piersi, w których ulega ekspresji receptor estrogenowy (ER- α ⁺, ang. estrogen receptor alpha positive) i liniach komórkowych raka piersi. Karunakaran i współpracownicy znaleźli kilka domniemanych miejsc wiążących receptor estrogenowy w promotorze *SLC6A14* i potwierdzili aktywność tego promotora po traktowaniu estradiolem za pomocą lucyferazy jako reportera. Traktowanie estradiolem zwiększyło ekspresję SLC6A14 w linii komórkowej ER- α ⁺, podczas gdy tamoksyfen odwrócił ten efekt (Karunakaran et al., 2011). Traktowanie linii

MCF7 (ER- α^+) selektywnym blokerem SLC6A14 - α -MT (Karunakaran i wsp., 2008) wywołało deficyt aminokwasów i indukcję autofagii, natomiast równoczesne traktowanie inhibitorem autofagii doprowadziło do apoptozy i śmierci komórki. Co więcej, w badaniach na mysich ksenograftach podanie α -MT zmniejszyło objętość guza w komórkach nowotworowych ER- α^+ (Karunakaran et al., 2011). Kiedy myszy *Slc6a14* KO krzyżowano z modelowymi liniami myszy tworzącymi spontanicznie guzy raka piersi, rozwój guza był znacznie opóźniony, a jego wzrost zmniejszony. Delecja *Slc6a14* skutkuje deficytem aminokwasów, co prowadzi do zmniejszenia fosforylacji mTOR i osłabienia ekspresji genów regulowanych przez sygnalizację HIF1 α (Babu i in., 2015). Efekty te nie zostały wykryte w liniach komórkowych ER α^+ . Należy dodać, że w nowotworach piersi opornych na terapię hormonalną obniżenie poziomu SLC6A14 koreluje ze zwiększoną ekspresją jednej z cząsteczek mikro RNA - miR-23b-3p (Bacci i in., 2019). Wiadomo, że te małe, niekodujące RNA działają jako onkogeny lub supresory nowotworów, przez co są bezpośrednio zaangażowane w onkogenezę (Budakoti i wsp., 2021). Ekspresja miR-23b-3p jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny GATA2, o którym donoszono, że promuje progresję raka piersi (Wang i in., 2012).

Również w guzach trzustki wykazano wzrost ekspresji *SLC6A14*, a wzrost ten okazał się znacznie wyższy niż innych transporterów aminokwasów: SLC1A5, SLC7A5, SLC7A11 (Coothankandaswamy i wsp., 2016). Co ciekawe, transporter został wykryty głównie w cytoplazmie. Okazało się, że rokowanie przeżycia w przypadku pacjentów z wysoką ekspresją SLC6A14 jest niekorzystne. *SLC6A14* znalazł się wśród potencjalnych genów diagnostycznych i prognostycznych, wraz z *AHNAK2*, *CDH3*, *IFI27*, *ITGA2*, *LAMB3* i *TMPRSS4*. Geny o podwyższonej ekspresji zostały przypisane do takich procesów, jak proliferacja komórek, czy apoptoza (Yang i wsp., 2020). Wspomniana zwiększona ekspresja SLC6A14 w raku trzustki sprawia, że jest on nie tylko dobrym kandydatem na marker, ale może również stanowić cel dla leków. Eksperymenty przeprowadzone na komórkach raka trzustki charakteryzujących się różnym poziomem ekspresji transportera wykazały, że traktowanie komórek, z nadekspresją SLC6A14, blokerem α -MT prowadziło do głodu aminokwasowego. Nie zaobserwowano tego w normalnych liniach komórkowych pochodzących z trzustki. Co więcej, zablokowanie transportera w komórkach z jego wysoką ekspresją sprzyjało tworzeniu autofagosomów, tłumieniu aktywności kompleksu 1 kinazy mTOR (mTORC1) oraz zmniejszeniu migracji i właściwości inwazyjnych. Traktowanie α -MT zmniejszyło również poziom czynnika indukowanego hipoksją 1 α (HIF-1 α), który zwykle ulega nadekspresji w warunkach niedotlenienia guza (Coothankandaswamy i wsp., 2016). Warto zaznaczyć, że α -MT jest blokerem SLC6A14, podczas gdy 1-Metylotryptofan jest substratem, który może być przez niego transportowany (Karunakaran i wsp., 2008). 1-Metylotryptofan działa jako aktywator odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym dzięki jego zdolności do hamowania 2,3 dioksygenazy indolaminy (IDO) (Cady i Sono, 1991). IDO to enzym cytozolowy, który jest syntetyzowany przez komórki nowotworowe z uwagi na jego zdolność do hamowania odpowiedzi

immunologicznej w obrębie zmiany nowotworowej oraz wspomaganie rozwoju tolerancji immunologicznej na antygeny nowotworowe (Hou i wsp., 2007). Tym samym SLC6A14 może być punktem docelowym w celowanej terapii nowotworowej poprzez blokowanie transportera za pomocą α -MT, co powoduje zatrzymanie komórek w fazie G1/G0, utratę aminokwasów i autofagię, albo poprzez wpływ na komórki układu odpornościowego związane z nowotworem (Karunakaran i wsp., 2011).

W dążeniu do zminimalizowania niepożądanych skutków ubocznych leków przeciwnowotworowych, specyficzne dla komórek nowotworowych dostarczanie środków chemioterapeutycznych jest nadal aktywnym obszarem badań. Większość farmakologicznie aktywnych związków dostaje się do komórek docelowych poprzez selektywne transportery w błonie plazmatycznej. Dlatego ukierunkowanie na transportery, które ulegają ekspresji na znacznie wyższym poziomie w komórkach nowotworowych niż w komórkach prawidłowych jest potencjalnie obiecującą strategią dostarczania leków specyficznych dla komórek nowotworowych. SLC6A14, ze względu na szeroką specyficzność substratową, jest doskonałym kandydatem do tego celu (Christensen, 1990). SLC6A14 transportuje wszystkie aminokwasy obojętne, jak również aminokwasy zasadowe. Jedynym ograniczeniem jego funkcji wydaje się być obecność ujemnego ładunku na łańcuchu bocznym, o czym świadczy brak interakcji transportera z aminokwasami anionowymi. Chemioterapeutyki mogą być sprzężone z łańcuchem bocznym poszczególnych obojętnych lub kationowych aminokwasów poprzez kowalencyjne wiązanie umożliwiające transport do komórek za pośrednictwem SLC6A14. Grupy hydroksylowe seryny, treoniny i tyrozyny, grupa sulfhydrylowa cysteiny oraz grupa aminowa lizyny oferują dogodne miejsca do sprzęgania z lekami. Nawet anionowe aminokwasy glutaminian i asparaginian mogą być wykorzystane do łączenia leków z grupą karboksylową obecną w łańcuchach bocznych tych aminokwasów. Dopóki powstały w ten sposób łańcuch boczny nie ma ładunków ujemnych, uzyskane koniugaty będą prawdopodobnie rozpoznawane przez SLC6A14. Skuteczność powyższego mechanizmu potwierdza udowodniona zdolność transportera do pośredniczenia w wychwycie komórkowym koniugatów krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych z seryną (Christensen i wsp., 1994) oraz koniugatów acyklowiru z glutaminianem i asparaginianem (Hatanaka i wsp., 2004). Co ciekawe, nawet leki sprzężone z aminokwasami, takie jak walacyklowir (Hatanaka i wsp., 2004) i walgancyklowir (Umapathy i wsp., 2004), których nukleozydy są estryfikowane grupą karboksylową przy węglu α aminokwasu waliny, są rozpoznawane przez SLC6A14 jako substraty.

Podobna strategia prawdopodobnie zadziała w przypadku leków przeciwnowotworowych, takich jak gemcytabina. Oporność na gemcytabinę jest rosnącym problemem i przeszkodą terapeutyczną w leczeniu raka trzustki ze względu na obniżoną ekspresję transporterów nukleozydów: ENT1 (SLC29A1) (Andersson i wsp., 2009) i CNT1 (SLC28A1) (Bhutia i wsp., 2011). Ponieważ poziom SLC6A14 ulega kilkukrotnemu podwyższeniu w tym nowotworze, formy prolekowe gemcytabiny na bazie aminokwasów mogą być

stosowane jako substraty dla SLC6A14 w celu przewyciężenia oporności na wolną gemcytabinę u pacjentów z rakiem trzustki. SLC6A14 jest również w stanie transportować szeroką gamę mimetyków aminokwasów, takich jak inhibitory syntazy tlenu azotu (Hatanaka i wsp., 2001), karnityna (Nakanishi i wsp., 2001) i estry karnityny z krótkołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi (Srinivas i wsp., 2007). Inną strategią wykorzystującą SLC6A14 do selektywnego dostarczania leków do komórek nowotworowych jest zastosowanie, powleczonych lekiem, nanocząstek z odpowiednią modyfikacją chemiczną na ich powierzchni. Metoda ta została z powodzeniem zastosowana do nanocząsteczkowego dostarczania leków z użyciem transporterów błony plazmatycznej SLC7A5 (Li i wsp., 2016), SLC2A1 (Jiang i wsp., 2014), SLC23A2 (Salmaso i wsp., 2009) i SLC22A5 (Kou i wsp., 2017). W ostatnim czasie, opracowano tę samą metodę dla SLC6A14 i wykazano potencjalne zastosowanie tego transportera do celowanego dostarczania leków chemioterapeutycznych do komórek nowotworowych. Powierzchnia nanocząstek jest chemicznie aktywowana lizyną za pomocą łącznika, tak aby zmodyfikowane nanocząstki były rozpoznawane przez SLC6A14. Powstałe nanocząstki sprzężone z lizyną są pobierane do komórek nowotworowych SLC6A14-dodatnich w sposób sprzężony z Na^+ i Cl^- . W nanocząsteczkach tych zamknięte są związki chemioterapeutyczne. Co ciekawe, proces wychwytu nie obejmuje normalnego transportu transbłonowego, ale zamiast tego zachodzi poprzez endocytozę wspomaganą przez transporter (Luo i wsp., 2016).

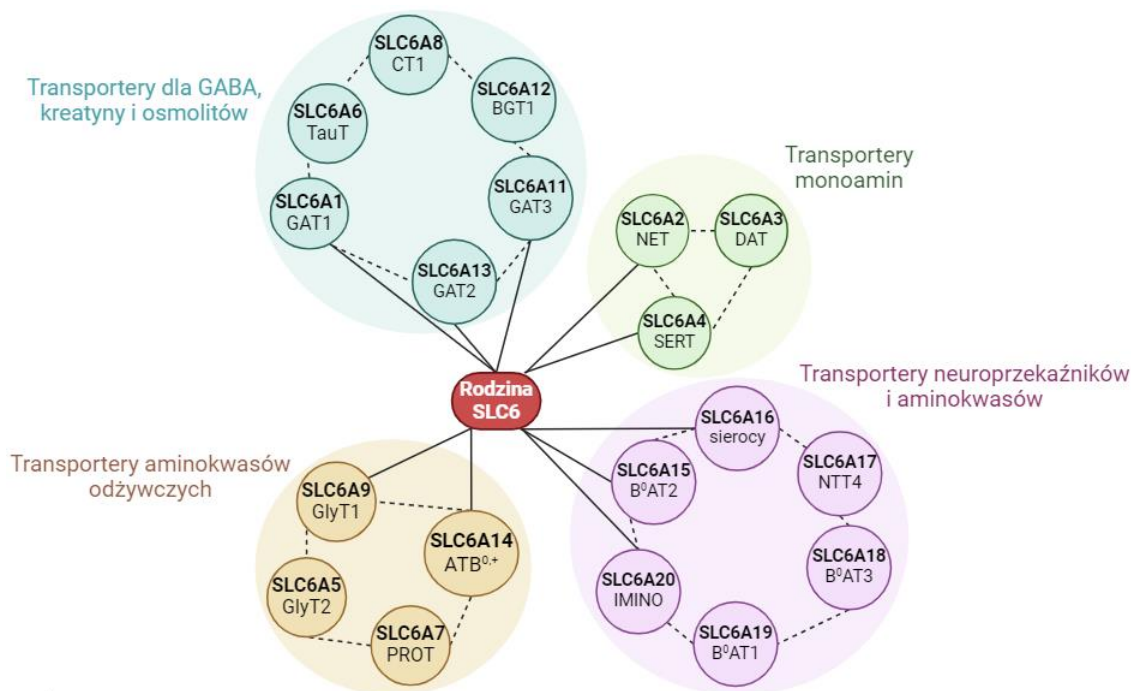
Warto również dodać, że SLC6A14 oraz inne wyżej wspomniane transportery można wykorzystać do obrazowania guzów *in vivo*. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) wykorzystującej odpowiednie sondy będące substratami dla transporterów (Sikder i wsp., 2017).

1.3. Rodzina transporterów SLC6

U ludzi, rodzina transporterów - SLC6 składa się z 19 członków (Bröer i wsp., 2006) i obejmuje transportery neurotransmiterów, aminokwasów białkowych, betainy, tauryny i kreatyny (Beuming i wsp., 2006). Na liście brakuje *SLC6A10* (pierwotnie oznaczonego jako transporter kreatyny-2), ponieważ jest pseudogenem. Podobieństwo sekwencji oraz specyficzność substratowa pozwoliły podzielić rodzinę SLC6 na cztery podrodziny (Ryc.1.3.) (Bröer i Gether, 2012; Freissmuth i wsp., 2018):

- I. *transportery monoamin*, tj. transportery dla noradrenaliny (NET, SLC6A2), dopaminy (DAT, SLC6A3) i serotoniny (SERT, SLC6A4)
- II. *transportery dla GABA, kreatyny i osmotów* (GAT1-3, odpowiednio SLC6A1, SLC6A13, SLC6A11 – transportery GABA; BGT1, SLC6A12 – transporter betainy/GABA; CT1, SLC6A8 – transporter kreatyny; TauT, SLC6A6 – transporter tauryny i β -alaniny)

- III. *transportery neuroprzekaźników i aminokwasów* - transportery dla glicyny (GlyT1, SLC6A9; GlyT2, SLC6A5), proliny (SLC6A7) oraz transporter aminokwasów dodatnich i obojętnych (SLC6A14/ATB^{0,+})
- IV. *transportery aminokwasów odżywczych* - SLC6A15 - SLC6A20, spośród których SLC6A16 jest transporterem sierocym



Ryc. 1.3. Klasyfikacja transporterów z Rodziny SLC6. Rycina zmodyfikowana na podstawie Bala i wsp., 2013.

Z wyjątkiem SLC6A17, który funkcjonuje jako transporter pęcherzykowy zależny od Na⁺ (Parra i wsp., 2008; Zaia i Reimer, 2009), większość transporterów SLC6 funkcjonuje jako transportery błonowe zależne od Na⁺/Cl⁻, wykorzystujące gradient Na⁺ do kierowania przenoszeniem substratu (Tabela 1.2.). Wyjątkami są SLC6A15, SLC6A17 i SLC6A19, które nie wykorzystują gradientu jonów chloru. U zwierząt przenośniki SLC6, zostały scharakteryzowane jako pełniące istotne, jeśli nie kluczowe, role w transporcie aminokwasów (Bröer i Palacín, 2011), homeostazie poziomu osmolitów, modulowaniu sygnalizacji neuroprzekaźników w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym (Kristensen i wsp., 2011) oraz spermatogenezie (Chatterjee i wsp., 2011). W nabłonku kosmków jelitowych i kanalików nerkowych transportery te są kluczowe w absorpcji i reabsorpcji, odpowiednio, aminokwasów i osmolitów, które są niezbędne dla szeregu procesów fizjologicznych. Z kolei w układzie nerwowym transportery SLC6 odgrywają kluczową rolę w terminacji przekazywania synaptycznego dla kilku neuroprzekaźników aminokwasowych i aminokwasopochodnych, a także w

dostarczaniu niezbędnych składników odżywczych i osmolitów do neuronów i komórek glejowych (Bala i wsp., 2013).

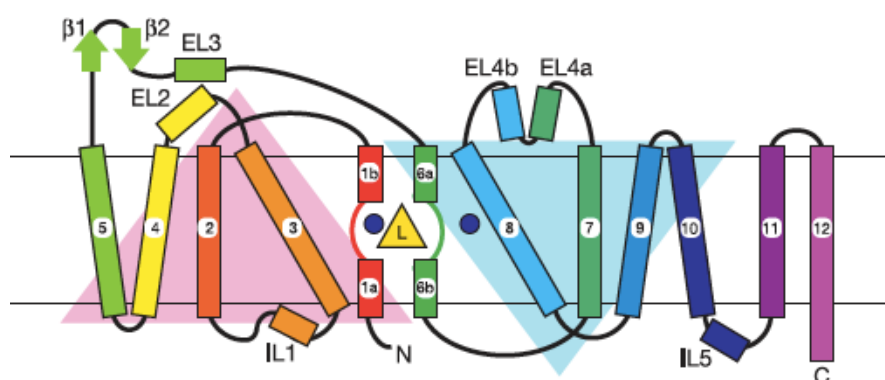
Tabela 1.2. Transportery z rodziny SLC6 i ich korelacje z chorobami występującymi u ludzi.

Nazwa transportera	Główny substrat/ko-transportowane jony	Choroby/Zaburzenia
SLC6A1/GAT1	GABA/2Na ⁺ , 1Cl ⁻	Padaczka, Schizofrenia, Stany lękowe, ADHD (Schousboe i wsp., 2004; 2017; Schousboe i Madsen, 2017)
SLC6A2/NET	Noradrenalina/1Na ⁺ , 1Cl ⁻	ADHD (Kim i wsp., 2006), Depresja (Hahn i Blakely, 2007), Hipotonia ortostatyczna (Shannon i wsp., 2000), Choroby układu krążenia (Halushka i wsp., 1999)
SLC6A3/DAT	Dopamina/2Na ⁺ , 1Cl ⁻	ADHD, Depresja, Choroba afektywna dwubiegunowa, Uzależnienia (Hahn i Blakely, 2007), Schizofrenia (Cordeiro i wsp., 2010), Choroba Parkinsona (Kurian i wsp., 2009), Zespół Tourett'a (Tarnok i wsp., 2007)
SLC6A4/SERT	Serotonina/1Na ⁺ , 1Cl ⁻ , 1K ⁺	Zaburzenia obsesyjno-kompulsywne (OCD) (Voyiaziakis i wsp., 2011), Schizofrenia (Bosia i wsp., 2010), Zaburzenia lękowe, Depresja, Otyłość (Hahn i Blakely, 2007), PTSD (Wang i wsp., 2011),

		Autyzm (Prasad i wsp., 2009)
SLC6A5/GlyT2	Glicyna/3Na ⁺ , 1Cl ⁻	Hiperekpleksja (Rees i wsp., 2006), Schizofrenia (Deng i wsp., 2008)
SLC6A6/TauT	Tauryna/2Na ⁺ , 1Cl ⁻	Dystrofia siatkówki (Preising i wsp., 2019)
SLC6A7/PROT	Prolina/2Na ⁺ , 1Cl ⁻	Zaburzenia neurorozwojowe (Reid i wsp., 2022), Astma (Kim i wsp., 2010)
SLC6A8/CT1	Kreatyna/2Na ⁺ , 1Cl ⁻	Choroba Parkinsona, Stwardnienie zanikowe boczne (Bender i Klopstock, 2016), Upośledzenie umysłowe (Hahn i Blakely, 2007)
SLC6A9/GlyT1	Glicyna/2Na ⁺ , 1Cl ⁻	Nadciśnienie tętnicze, Schizofrenia, Zaburzenia poznawcze (Aragón i López-Corcuera, 2005; Javitt, 2009)
SLC6A10/pseudogen	Nieznane	Brak korelacji
SLC6A11/GAT3	GABA/2Na ⁺ , 1Cl ⁻	Epilepsja (Bala i wsp., 2013)
SLC6A12/BGT1	Betaina, GABA/3Na ⁺ , 1Cl ⁻	Epilepsja (Bala i wsp., 2013)
SLC6A13/GAT2	GABA/2Na ⁺ , 1Cl ⁻	Epilepsja (Bala i wsp., 2013)
SLC6A14/ATB ^{0,+}	Aminokwasy obojętne i dodatnie aminokwasy/2Na ⁺ , 1Cl ⁻	Otyłość (Bhutia i wsp., 2022)
SLC6A15/B ⁰ AT2	Duże, obojętne aminokwasy/1Na ⁺	Ciężka depresja (Kohli i wsp., 2011)
SLC6A16/sierocy	Nieznane	Brak korelacji
SLC6A17/NTT4, XT1	Aminokwasy obojętne/1Na ⁺	Upośledzenie umysłowe, Autosomalna recesywna niepełnosprawność intelektualna (Iqbal i wsp., 2015)
SLC6A18/B ⁰ AT3, XT2	Aminokwasy obojętne/2Na ⁺ , 1Cl ⁻	Choroba wieńcowa (Matsumoto i wsp., 2011)
SLC6A19/B ⁰ AT1, HND	Aminokwasy obojętne/1Na ⁺	Zespół Hartnupa (Seow i wsp., 2004)

SLC6A20/IMINO, XT3	Prolina, pipekolan, sarkozyna/ 2Na^+ , 1Cl^-	Iminoglicynuria (Bröer i wsp., 2008), Choroba Hirschsprunga (Lee i wsp., 2016), Cukrzyca typu 2 (Ling i wsp., 2014)
--------------------	--	---

Przez wiele lat struktura transporterów dla neuroprzekaźników z rodziny SLC6 była intensywnie badana przy użyciu mutagenyzy celowanej, skaningu alaniny, dostępności cysteiny i szeregu innych metod (Kanner, 2006; Kristensen i wsp., 2011). Jednak dopiero pojawienie się struktury o wysokiej rozdzielczości dla bakteryjnego homologa transportera leucyny, LeuT, było krokiem milowym w zrozumieniu struktury przedstawicieli tej rodziny (Ryc. 1.4.) (Yamashita i wsp., 2005).



Ryc. 1.4. Struktura bakteryjnego transportera LeuT. Żółty trójkąt pokazuje pozycję leucyny, zaś dwa niebieskie kółka – pozycję dwóch jonów Na^+ (Yamashita i wsp., 2005).

Transportery SLC6 mają hydrofobowy rdzeń składający się z 12 domen transmembranowych (TM) z N- i C-końcami zlokalizowanymi po stronie wewnątrzkomórkowej oraz rozbudowanej glikozylowanej pętli zewnątrzkomórkowej znajdującej się pomiędzy domenami TM3 i 4. Spośród 12, głównie α -helikalnych, domen transbłonowych 10 stanowi rdzeń transportera a dwie dodatkowe mogą być zaangażowane w jego dimeryzację (Just i wsp., 2004). Pierwsze 10 helis jest ułożonych w sposób pseudosymetryczny, nazwany odwróconym powtórzeniem 5 + 5, w wyniku czego pierwsze pięć helis może zostać przekształconych w drugie pięć helis za pomocą prostej operacji symetrii (Abramson i Wright, 2009). Dodatkowo wykazano, że w przypadku eukariotów, wewnątrzkomórkowe końce N- i C- są znacznie dłuższe oraz pośredniczą w złożonych procesach regulacyjnych, takich jak transport białek, stechiometria i funkcja jonów (Kristensen i wsp.,

2011). Z kolei transportery prokariotyczne nie posiadają w swojej strukturze cech obecnych w eukariotycznych, takich jak: długie N- i C-końce, rozbudowana pętla zewnątrzkomórkowa, miejsca fosforylacji wewnątrzkomórkowej oraz modyfikacje potranslacyjne takie jak glikozylacja i palmitoilacja (Foster i Vaughan, 2011).

Funkcja transporterów jest związana z ich strukturą oraz rodzajem przenoszonych substratów. Ze względu na ich znaczenie fizjologiczne większość funkcjonalnych badań przeprowadzono na transporterach neurotransmiterów. Rodzina SLC6 stanowi jedną z najbardziej istotnych klinicznie grup białek powiązanych z wieloma chorobami i dysfunkcjami u ludzi (Tabela 1.2.).

Transportery monoamin, NET (SLC6A2), DAT (SLC6A3) i SERT (SLC6A4) są obecne głównie w mózgu. NET i SERT znajdują się ponadto w niektórych komórkach chromochłonnych nadnerczy, komórkach tucznych i płytkach krwi (Kristensen i wsp., 2011). Regulują one wiele funkcji ośrodkowego i współczulnego układu nerwowego, takich jak uczenie się, nastrój, uwaga, ruch, apetyt, sen i nagradzanie (Hahn i Blakely, 2007; Ramamoorthy i wsp., 2011). Oprócz przenoszenia endogennych substratów, transportery monoaminowe mogą przenosić pochodne amfetaminy oraz neurotoksyny, w tym MDMA (ecstasy) i 1-metylo-4-fenylpirydynę (MPP+). Selektywnymi inhibitorami transporterów monoamin są analogi kokainy, mazindol, benzatropina i leki przeciwdepresyjne, takie jak fluoksetyna (Prozac) (Bala i wsp., 2013). Hamowanie transporterów monoamin prowadzi do zahamowania wtórnego wychwytu przekaźników po ich uwolnieniu do szczeliny synaptycznej, co skutkuje bardziej intensywnym i długotrwałym sygnałem. Dodatkowo, niektóre leki mogą powodować niesynaptyczne uwalnianie neuroprzekaźników monoaminowych przez transporter (Bröer i Gether, 2012).

GAT1 (kodowany przez SLC6A1) jest głównym transporterem GABA w mózgu i dlatego odgrywa ważną rolę w regulacji sygnalizacji GABAergicznej. Jest zlokalizowany w neuronach GABAergicznych w neokorteksie, hipokampie, mózdku, jądrach podstawnych, pniu mózgu, rdzeniu kręgowym, opuszcze węchowej i siatkówce. GAT1 jest silnie hamowany przez leki przeciwpadaczkowe, takie jak tiagabina i kwas nipekotowy, które najprawdopodobniej działają poprzez podniesienie pozakomórkowego poziomu GABA (Madsen i wsp., 2010). GAT3 (SLC6A11) ulega ekspresji głównie w komórkach glejowych, a jego lokalizacja w synapsach GABAergicznych sugeruje udział w regulacji sygnalizacji GABA. GAT2 (SLC6A13), podobnie jak GAT3, jest w 52% homologiczny z GAT1, jednak jego ekspresja nie pokrywa się z markerami sygnalizacji GABAergicznej, chociaż występuje w mózgu i siatkówce, a także w wątrobie i nerkach. Podobnie jak GAT1, GAT3 jest celem dla leków przeciwdrgawkowych, które są pochodnymi kwasu nipekotowego (Bala i wsp., 2013). Zahamowanie aktywności transporterów GABA powoduje zwiększenie jego poziomu w szczelinie synaptycznej, a tym samym wzmacnia działanie synaps hamujących. W związku z tym leki działające na transporter GABA są stosowane nie tylko w leczeniu drgawek, ale także bólu i lęku (Clausen i wsp., 2006). Tauryna i betaina

są osmolitami (Lang, 2007), a transportery osmolitów (SLC6A6, SLC6A12) są uznawane za osmoregulatory w komórkach nabłonkowych i są regulowane przez zmiany osmolarności (Bala i wsp., 2013). Niedawno odkryto, że dysfunkcja SLC6A6 - transportera tauryny jest związana z dystrofią siatkówki (Preising i wsp., 2019). Z kolei kreatyna jest związkiem magazynującym wysokoenergetyczne wiązania fosforanowe w celu uzupełnienia ATP szczególnie w mięśniach i mózgu (Wallimann i wsp., 2011), odgrywającym rolę w metabolizmie mitochondriów, w związku z czym transporter kreatyny (SLC6A8) jest powiązany z chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak choroba Parkinsona i stwardnienie zanikowe boczne (Bender i Klopstock, 2016).

Gałąź trzecia obejmuje transportery glicyny, proliny i transporter o szerokiej specyficzności dla aminokwasów obojętnych (0) i kationowych (+). Glicyna jest nie tylko głównym neuroprzebieżnikiem hamującym w rdzeniu kręgowym, ale także moduluje przebieżnictwo glutaminianergiczne w korze mózgowej poprzez wiązanie się z receptorem NMDA. Transporter glicyny 2 (GlyT2) ulega silnej ekspresji w neuronach pnia mózgu, mózdzku i rdzenia kręgowego, a także w makrofagach i komórkach tucznych w tkankach obwodowych, podczas gdy GlyT1 występuje tylko w komórkach glejowych (Supplisson i Roux, 2002). U ludzi GlyT2 jest kodowany przez gen *SLC6A5*, a mutacje w tym genie są odpowiedzialne za presynaptyczną postać hiperekpleksji, choroby genetycznej powodującej przedłużony odruch zaskoczenia na niespodziewane bodźce. GlyT1 (SLC6A9) jest powiązany z nadciśnieniem tętniczym, a także podwyższeniem zewnątrzkomórkowego stężenia synaptycznej glicyny poprzez blokadę GlyT1, która ma na celu wzmocnienie funkcji receptora NMDA *in vivo* i stanowi podstawę do leczenia schizofrenii i zaburzeń poznawczych (Aragón i López-Corcuera, 2005; Javitt, 2009). Specyficzny dla mózgu transporter L-proliny, PROT (SLC6A7), ulega ekspresji przez subpopulacje rzekomych neuronów glutaminianergicznych, które są szczególnie bogate w to białko we frakcjach błon synaptycznych (Shafiqat i wsp., 1995). Ostatnio wykazano, że dysfunkcje SLC6A7 są prawdopodobnie związane z astmą (Kim i wsp., 2010) i zaburzeniami neurorozwojowymi z ciężką dystonią (Reid i wsp., 2022). B^{0,+}/ATB^{0,+} (SLC6A14) jest unikalnym transporterem aminokwasów dokładnie opisanym w kolejnych rozdziałach.

Gałąź transporterów aminokwasów odżywczych obejmuje transportery zaangażowane w przenoszenie aminokwasów w nabłonkach i mózgu, tj. SLC6A15 (B⁰AT2), SLC6A17 (NTT4/XT1), SLC6A18 (B⁰AT3, XT2), SLC6A19 (B⁰AT1, HND), SLC6A20 (system IMINO, XT3, Xtrp3) oraz SLC6A16 (transporter sierocy) (Bröer i Palacín, 2011). Większość z nich transportuje szereg obojętnych aminokwasów i dlatego są zaangażowane w ich homeostazę (Bröer, 2008). SLC6A17, SLC6A18, SLC6A19 i SLC6A20 znajdują się w błonie apikalnej komórek nabłonkowych, gdzie pośredniczą we wchłanianiu aminokwasów w jelitach oraz ich resorpcji z moczu pierwotnego w nerkach (Bröer i Palacín, 2011). SLC6A17/NTT4 jest związany z upośledzeniem umysłowym oraz autosomalną recesywną niepełnosprawnością intelektualną

(Iqbal i wsp., 2015). Transporter SLC6A19 wymaga do swojej aktywności ko-ekspresji kolektryny lub enzymu konwertującego angiotensynę 2 (ACE2) (Camargo i wsp., 2009). Mutacje w genie SLC6A19 kodującym B⁰AT1 są związane z Zespołem Hartnupa (Seow i wsp., 2004). SLC6A18/B⁰AT3 wykazuje niemal 50% homologii z B⁰AT1 i jest związany z chorobą wieńcową (Matsumoto i wsp., 2011). SLC6A20/IMINO, podobnie jak SLC6A19, wymaga do działania ko-ekspresji ACE2. Mutacje w genie kodującym ten transporter są z kolei związane z iminoglicynurią, czyli łagodnym zaburzeniem wpływającym na reabsorpcję glicyny i proliny w nerkach (Bröer i wsp., 2008).

Fizjologiczna rola neuronalnych członków tej gałęzi jest słabo poznana. Najprawdopodobniej dostarczają one prekursorów metabolicznych dla produktów pośrednich cyklu kwasu cytrynowego, umożliwiając tym samym produkcję neuroprzekaźników (Bröer i Gether, 2012). Przeprowadzone, stosunkowo niedawno, badania obejmujące cały genom sugerują, że SLC6A15/B⁰AT2 jest potencjalnym kandydatem związanym z występowaniem ciężkiej depresji (Kohli i wsp., 2011).

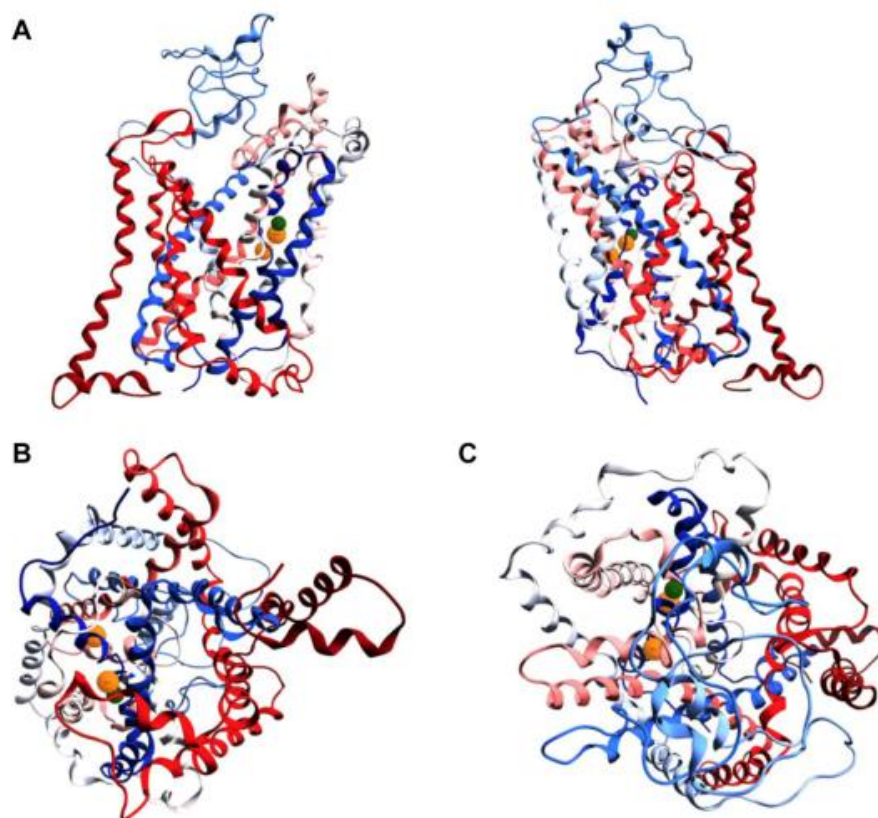
Rodzina SLC6 to, jak wyżej wspomniano, dobrze poznana i opisana grupa transporterów, której członkowie pełnią kluczowe role w neurotransmisji oraz homeostazie całego organizmu. Nieprawidłowe działanie lub zmieniona ekspresja tych transporterów jest związana z wieloma chorobami i zaburzeniami u ludzi, co czyni tę rodzinę istotnym celem dla rozwoju terapeutycznego.

1.3.1. SLC6A14 – transporter o szerokiej specyficzności substratowej

Większość transporterów aminokwasów ma stosunkowo wąską specyficzność substratową. Wyjątkiem jest SLC6A14 z niezwykle szeroką selektywnością substratową, bowiem transportuje 18 z 20 aminokwasów białkogennych (Sikder i wsp., 2017). Transporter ten został pierwotnie scharakteryzowany w jelicie krętym królika i nazwany transporterem β -alaniny, pomimo że transportuje również szeroki wachlarz aminokwasów obojętnych i zasadowych (Munck i Schultz, 1969). Niezależnie, transporter zidentyfikowano również w przedimplantacyjnych blastocystach myszy i nazwano systemem B^{0,+} (Winkle i wsp., 1985), natomiast cDNA transportera zostało sklonowane z ludzkiego gruczołu sutkowego i nazwane ATB^{0,+} (Sloan i Mager, 1999). Jak wyżej wspomniano, ATB^{0,+} jest 14 członkiem rodziny SLC6, jest znany jako SLC6A14 (Bröer i Gether, 2012) i w przeciwieństwie do innych transporterów z rodziny SLC6, transportuje jedną cząsteczkę aminokwasu w symporcie z dwoma jonami Na⁺ i jednym Cl⁻ wykorzystując potencjał transbłonowy (Sloan i Mager, 1999).

Struktura transportera nie jest znana, jednak wszystko wskazuje na to, że podobnie jak większość członków rodziny SLC6, ma on strukturę rdzenia bakteryjnego transportera LeuT - pierwszego skrytalizowanego transportera z tej rodziny (Ryc. 1.4.) (Yamashita i wsp., 2005). SLC6A14 jest zbudowany z

642 aminokwasów zorganizowanych prawdopodobnie, z uwagi na jego przypuszczalnie hydrofobowy charakter, w 12 domen transbłonowych z końcami N- i C- zlokalizowanymi wewnątrzkomórkowo. W modelowaniu struktury SLC6A14 wykorzystano strukturę krystaliczną transportera DAT z *Drosophila melanogaster* oraz strukturę fosfofruktokinazy-1 (PFKA1) z *Saccharomyces cerevisiae* (Ryc. 1.5.) (Palazzolo i wsp., 2019). W swojej pracy, autorzy przedstawili zrównoważony model zawierający dwa miejsca wiązania dla substratów (S1 i S2) i transportowanych jonów (Na¹ i Na²). Dodatkowo opisali oni pięć reszt aminokwasowych (Tyr52, Gly57, Val128, Ser322 i Ser324) tworzących zespół orientujący substraty i zaproponowali, że reszta Tyr321, znajdująca się w dolnej części miejsca wiązania S2 jest zaangażowana w mechanizm bramkowania, podczas gdy Arg104 i Asp479 definiują miejsce wiązania S1 (Palazzolo i wsp., 2019).



Ryc. 1.5. Model struktury SLC6A14. (A) Widok przez przekrój poprzeczny, (B) z dołu i (C) z góry. Struktura drugorzędowa jest reprezentowana przez wstążki i oznaczona kolorami: niebieskim od N-końca i czerwonym do C-końca. Pomarańczowe balonki symbolizują jony Na⁺, podczas gdy zielony to jon Cl⁻ (Palazzolo i wsp., 2019).

Wiadomo, że SLC6A14 jest regulowany potranslacyjnie. Występowanie kilku modyfikacji potranslacyjnych przewidziano na podstawie sekwencji aminokwasów (Sloan i Mager, 1999) a wśród nich znalazła się fosforylacja i glikozylacja. Zaproponowano również siedem możliwych miejsc glikozylacji na drugiej domniemanej pętli zewnątrzkomórkowej i jedno na trzeciej domniemanej pętli zewnątrzkomórkowej (Sloan i Mager, 1999). W modelowej strukturze bakteryjnego transportera LeuT miejsca glikozylacji znaleziono na drugiej pętli zewnątrzkomórkowej a lokalizacja ta została potwierdzona przez krystalizację transportera SERT (Coleman i wsp., 2016). Badania z zastosowaniem nadekspresji ATB^{0,+} w komórkach HEK293 wykazały wrażliwość transportera na enzymy deglikozylujące, peptydo-N-glikozydazę F (PNGase F) i endoglikozydazę H (Endo H), co potwierdza obecność glikozylowanej formy transportera w błonie plazmatycznej (Kovalchuk i wsp., 2019).

Fosforylacja reszt seryny przez białkową kinazę C (PKC) została potwierdzona eksperymentalnie (Samluk i wsp., 2010; Samluk i wsp., 2012). Wykazano, że estry forbolu poprzez aktywację PKC wpływają na regulację aktywności SLC6A14 poprzez zwiększenie jego poziomu w błonie plazmatycznej oraz wzrost aktywności transportowej (Samluk i wsp., 2012; Czeredys i wsp., 2013). Dodatkowo stwierdzono kolokalizację SLC6A14 z izoformą α PKC (Samluk i wsp., 2012). Ostatnio wykazano możliwość regulacji SLC6A14 przez kinazę AKT i udowodniono, że zahamowanie tej kinazy zmniejszyło fosforylację transportera na reszcie treoninowej. Ponieważ wiązało się to ze zmniejszeniem ilości transportera w błonie plazmatycznej, obserwacja ta wskazuje na powiązanie aktywności kinazy AKT, regulowanej poziomem aminokwasów w komórce z aktywnością ich pobierania przez SLC6A14 (Kovalchuk i Nałęcz, 2021).

Każde białko transbłonowe błony plazmatycznej jest wbudowywane ko-translacyjnie do błony siateczki śródplazmatycznej i w procesie odpączkowywania, opłaszczonych koatomerem II (COPII) pęcherzyków, jest przenoszone w błonie pęcherzyków do *cis*-Golgi, a następnie do *trans*-Golgi i kolejno do powierzchni komórki. Proces ten nazwany „trafficking”, czyli przemieszczanie białka w komórce jest ściśle regulowany i wymaga interakcji z różnymi białkami (Lord i wsp., 2013). Część białka po stronie światła siateczki ulega rdzeniowej glikozylacji i podlega kontroli przez dwie lektyny: rozpuszczalną kalretyninę i błonową kalneksynę. Następnie dochodzi do utworzenia COPII, rozpoczętego przez związanie białek SEC23/SEC24 przez GTPazę SAR1, a następnie związany jest kompleks SEC13/SEC31 (Lord, 2013). Białka SEC24 są odpowiedzialne za rozpoznanie ładunku (cargo) i, jak wykazano, SLC6A14 jest specyficznym rozpoznawany przez SEC24C (Kovalchuk i wsp., 2019).

Aby przybliżyć mechanizm przemieszczania się SLC6A14 do błony plazmatycznej przeprowadzono analize proteomu tego transportera i wśród 128 zidentyfikowanych białek stwierdzono obecność białek szoku cieplnego (Tabela 1.3.) (Rogała-Koziarska i wsp., 2019).

Tabela 1.3. Białka szoku cieplnego wykryte w proteomie SLC6A14.

Numer	Nazwa białka wg bazy danych Mascot	Gen
P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon	<i>CCT5</i>
Q0VDF9	Heat shock 70 kDa protein 14	<i>HSPA14</i>
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	<i>HSP90AB1</i>
Q8WXX5	DnaJ homolog subfamily C member 9	<i>DNAJC9</i>
Q9UHV9	Prefoldin subunit 2	<i>PFDN2</i>
P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1	<i>DNAJA1</i>

* Analizę proteomiczną SLC6A14 wykonał Łukasz Samluk. Wyniki z pracy (Rogała-Koziarska i wsp., 2019).

1.4. Białka szoku cieplnego (HSP)

Białka szoku cieplnego (ang. Heat Shock Protein - HSP) to grupa białek, które działają w celu utrzymania homeostazy komórkowej w odpowiedzi na czynniki stresowe, takie jak hipoksja, anoksja, wysoka temperatura, wolne rodniki, promieniowanie UV, leki i inne czynniki, które indukują denaturację białek (Zou i wsp., 2014; Perazella, 2003). HSP biorą udział w kilku procesach, między innymi w fałdowaniu i transporcie białek - zwanych substratami lub klientami (ang. Clients), składaniu/rozkładaniu kompleksów białkowych oraz utrzymywaniu struktur białkowych regulujących metabolizm komórkowy niezbędny do przeżycia i proliferacji komórek (Bukau i wsp., 2006). Białka te odgrywają zatem kluczową rolę w proteostazie. Podczas gdy niektóre HSP ułatwiają fałdowanie nowo utworzonych białek, inne są silnie indukowane podczas stresu fizjologicznego, aby poradzić sobie z dodatkowym obciążeniem związanym z nieprawidłowym fałdowaniem białek pod wpływem stresu. Ponadto, HSP są zaangażowane w ustalanie przeznaczenia nieprawidłowo sfałdowanych białek poprzez ich ponowne fałdowanie lub kierowanie na szlak degradacji proteolitycznej ubikwityna-proteasom (Kriegenburg i wsp., 2012). Należy też zaznaczyć, że komórki nowotworowe wykorzystują ochronną rolę tych białek podczas procesu kancerogenezy (Ghane Shahrbaft i Assadi, 2015). W normalnych warunkach HSP stanowią 5-10% białek w komórce i działają na zasadzie zorganizowanej sieci utrzymującej proteostazę (Hartl i wsp., 2011). Natomiast w ekstremalnych warunkach dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych szoku cieplnego (ang. Heat Shock Factor - HSF) w odpowiedzi na stres, co prowadzi do transkrypcji dużej liczby genów kodujących HSP w celu zrównoważenia tego stresu (Murshid i wsp., 2018).

1.4.1. Rodziny białek HSP

W oparciu o masy cząsteczkowe, HSP są klasyfikowane jako małe HSP, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 i duże HSP, które pełnią różne funkcje w procesie metabolizmu białek (Tabela 1.4.).

Tabela 1.4. Rodziny białek szoku cieplnego – przedstawiciele, lokalizacja w komórce i podsumowanie najważniejszych funkcji.

Rodzina	Przedstawiciele	Lokalizacja	Funkcje	Bibliografia
HSP40/DNAJ	DnaJA, DnaJB, DnaJC	Cytozol, Mitochondria, Jądro komórkowe	ko-chaperony HSP70, regulują aktywność ATPazy HSP70; Zatrzymują nieprawidłowo sfaldowane substraty białkowe	(Kityk i wsp., 2018; Liberek i wsp., 1991; Misselwitz i wsp., 1998)
HSP60	HSP60 TRiC	Mitochondria Cytozol	Foldazy białkowe; Zapobiegają agregacji	(Cappello i wsp., 2008; Ishida i wsp., 2018; Ostermann i wsp., 1989)
HSP70	HSPA1A/1B HSPA1L, HSPA2, HSPA6, HSPA7, HSPA8, HSPA12A/12B, HSPA13, HSPA14; HSPA5 HSPA9	Cytozol Jądro komórkowe Siateczka śródpłazmatyczna Mitochondria	Wiele funkcji w proteostazie; Holdazy i foldazy; Zapobiegają agregacji i kontrolują losy białek.	(Brocchieri i wsp., 2008; Fernández- Fernández i wsp., 2017; Rosenzweig i wsp., 2019)
HSP90	HSP90-alfa HSP90-beta	Cytozol Cytozol	Foldazy dla białek syntetyzowanych de novo,	(Hoter i wsp., 2018; Johnson, 2012;

	GRP94 TRAP1	Cytozol/Siateczka śródpłazmatyczna Mitochondria	ponownie fałdują nieprawidłowo sfałdowane białka;	Prodromou, 2016)
Małe HSP	HSPB1-HSPB10	Cytozol, Mitochondria	Holdazy, zapobiegające agregacji; Sekwestrują nieprawidłowo sfałdowane białka	(Basha i wsp., 2012; Bakthisaran i wsp., 2015; Haslbeck i wsp., 2005)
Duże HSP	HSP110 GRP170	Cytozol/Jądro komórkowe Siateczka śródpłazmatyczna	Holdazy zapobiegające agregacji białek; HSP110 – ko- chaperon dla HSP70	(Easton i wsp., 2000; Schuermann i wsp., 2008; Raviol i wsp., 2006)

Członkowie rodziny **HSP40** (zwani DnaJ u prokariotów) posiadają wysoce zachowaną w ewolucji domenę J składającą się z około 70 aminokwasów (Laufen i wsp., 1999). Domena ta zawiera motyw HPD, który ułatwia interakcję tego ko-chaperonu z białkami HSP70. HSP40 są podzielone na cztery typy (I-IV), głównie w oparciu o ich charakterystykę strukturalno-funkcjonalną (Botha i wsp., 2007). Hsp40 typu I i II mają zdolność wiązania substratów poprzez swój motyw CXXCXGXG (CRR), a także fragment C-końcowy (Botha i wsp., 2007), ale nie mogą ponownie składać substratów. W związku z tym, pełniąc funkcję ko-chaperonów, ułatwiają dostarczanie nieprawidłowo sfałdowanych substratów białkowych do HSP70 w celu ponownego sfałdowania. Mimo to, zarówno HSP40 I, jak i II są zdolne do samodzielnego hamowania agregacji białek (Zininga i wsp., 2018). HSP40 typu I i II wiążą się z HSP70, pobudzając aktywność ATPazy tego ostatniego (Njunge i wsp., 2015) a w interakcji HSP70 - HSP40 pośredniczy domena J HSP40. Interakcja tych dwóch białek obejmuje rekrutację substratu z jednoczesną stymulacją aktywności ATPazowej HSP70 (Bascos i Landry, 2015). Liczba izotypów HSP40 obecnych w organizmach na ogół wzrasta wraz ze złożonością komórek. Zatem komórki eukariotyczne zazwyczaj prezentują szerszy wachlarz HSP40 w porównaniu do prokariotów. Na przykład, *E. coli* posiada 4 HSP40, podczas gdy ludzki genom zawiera ponad 50 genów kodujących białka podobne do HSP40 (Zininga i wsp., 2018).

HSP60 (inaczej: chaperonina, Cpn60) jest jednym z najbardziej zachowanych w ewolucji białek ulegających ekspresji u wszystkich gatunków. Istnieją dwie grupy chaperonin, które ulegają ekspresji w różnych miejscach w komórkach. HSP60 z I grupy ulegają ekspresji u prokariotów (znane jako GroEL) oraz w eukariotycznych mitochondriach i chloroplastach, gdzie

współdziałają z kofaktorem HSP10 (GroES u prokariotów). HSP60 z II grupy są obecne u archeonów i w cytozolu komórek eukariotycznych (TRiC lub CCT) (Balchin i wsp., 2018). Obie grupy mają podobną konformację i mechanizm fałdowania substratu, który wspomaga fałdowanie białka poprzez zależną od ATP cylindryczną klatkę fałdującą (Hu i wsp., 2022). Chaperoniny pełnią szereg różnych ról w komórkach. Przykładowo, TRiC uczestniczy w fałdowaniu około 10% nowo zsyntetyzowanych białek (Khabirova i wsp., 2014) a mitochondrialne HSP60 są niezbędne do utrzymania integralności łańcucha oddechowego (Hu i wsp., 2022). Chaperoniny zapobiegają również agregacji i ponownemu fałdowaniu zdenaturowanych białek pod wpływem stresu (Kim i wsp., 2013). Dodatkowo, warto zaznaczyć, że HSP60 są regulatorami apoptozy o dwukierunkowym działaniu w odpowiedzi na stres zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowy (Sarangi i wsp., 2013).

HSP70/DnaK to zachowane w ewolucji białka opiekuńcze ulegające powszechnej ekspresji w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych. Jest to najlepiej poznana z rodzin białek HSP o bardzo dużym podobieństwie międzygatunkowym. DnaK ulega ekspresji u prokariotów, a HSP70 jest jego eukariotycznym odpowiednikiem (Rosenzweig i wsp., 2019). W ludzkim genomie znajduje się około 17 genów kodujących wiele białek HSP70 (Brocchieri i wsp., 2008). Przedstawicielami tej rodziny są białka indukowane stresem, zwane HSP70s, aktywowane aby uporać się ze zmianami środowiska oraz białka takie jak HSC70 (ang. Heat Shock Cognate 70) ulegające konstytutywnej ekspresji w komórkach. HSP70 ulegają ekspresji w różnych lokalizacjach komórkowych, w tym w cytozolu, jądrze, siateczce śródplazmatycznej czy mitochondriach i utrzymują dynamiczną równowagę syntezy, fałdowania, degradacji i translokacji białek (Daugaard i wsp., 2007). Białka HSP70 mają zachowane w ewolucji cechy struktury. Zarówno prokariotyczne jak i eukariotyczne białka z tej rodziny składają się z N-końcowej domeny wiążącej nukleotydy (NBD - ang. N-terminal nucleotide binding domain) o masie 44 kDa, która posiada aktywność ATPazy, domeny wiążącej substrat (SBD – ang. substrate binding domain) oraz C-końcowej pokrywy (Rosenzweig i wsp., 2019). Aktywność HSP70 opiera się na allosterycznej zmianie konformacji HSP70, która jest zależna od ATP. W trakcie tego procesu HSP70 związany z ADP rozpoznaje substrat w domenie SBD z wysokim powinowactwem. Następnie czynniki wymiany nukleotydów (NEF - ang. nucleotide exchange factors) pośredniczą w wymianie ADP na ATP, a ATP indukuje rotację HSP70. Konformacja HSP70 z ATP, ma niskie powinowactwo do substratów, co powoduje ich uwalnianie (Brehmer i wsp., 2001). Białka z rodziny HSP70, do prawidłowego funkcjonowania, wymagają kooperacji z białkami pomocniczymi – HSP40, których rolą jest rekrutowanie substratów i zwiększenie aktywności ATPazowej HSP70. Po interakcji HSP70 z domeną J, ko-chaperonu HSP40, dochodzi do hydrolizy ATP i HSP70 powraca do konformacji z ADP. Uwolniony substrat może się ponownie wiązać z HSP70 i przechodzić kolejne cykle fałdowania, aż osiągnie stan natywny (Kityk i wsp., 2012; Kityk i wsp., 2018). HSP70 są aktywne w początkowej fazie fałdowania nowopowstałych białek, przed przekazaniem ich dalej do HSP90 (Rosenzweig i

wsp., 2019). Są również zdolne do ponownego fałdowania nieprawidłowo sfałdowanych białek i hamowania ich niekontrolowanej agregacji (Mogk i wsp., 1999).

Małe białka szoku cieplnego - **sHSP/HSPB** (ang. small Heat Shock Protein) to niezależne od ATP białka opiekuńcze, które charakteryzują się niską masą cząsteczkową (12-43 kDa) i oligomeryczną strukturą. Wspólną cechą strukturalną małych HSP jest zachowana w ewolucji domena α -krystalinowa, która ma postać β -kanapki i jest zbudowana z 90 reszt aminokwasowych (Basha i wsp., 2012). Na chwilę obecną, u ssaków, zidentyfikowano 10 genów kodujących sHSP, których produkty spełniają różne funkcje, tj. holdazy, sekwestrazy czy agregazy (Haslbeck i wsp., 2005). W przeciwieństwie do aktywności foldazy białek HSP90/70/60, sHSP mają wyraźną aktywność holdazy, która jest niezależna od ATP. Dimery sHSP oddziałują z niesfałdowanymi substratami pośrednimi i sekwestrują je w rdzeniu kompleksów sHSP/substrat, aby uniknąć agregacji. Ponieważ sHSP nie mają aktywności foldazy, sekwestrowane substraty mogą zostać poddane procesowi ponownego fałdowania przez układ HSP70/90 (Hu i wsp., 2022). Małe HSP ulegają ciągłej ekspresji w celu uniknięcia agregacji białek i podlegają gwałtownej nadekspresji pod wpływem stresu w celu buforowania presji związanej z rozfałdowaniem białek (Basha i wsp., 2012).

Duże HSP, w tym HSP110 i Grp170, to HSP o dużych masach cząsteczkowych występujące u eukariontów. HSP110 jest powszechnie dystrybuowane zarówno w cytozolu, jak i jądrze komórkowych, podczas gdy Grp170 jest zlokalizowane w siateczce śródplazmatycznej. Sekwencje aminokwasowe tych białek są zachowane w ewolucji i są homologiczne z rodziną HSP70, dlatego bywają często klasyfikowane jako członkowie tak zwanej "nadrodziny HSP70". Duże HSP ulegają konstytutywnej ekspresji w komórkach i są szybko indukowane pod wpływem stresu w celu utrzymania proteostazy. Działają jako holdazy, zapobiegając agregacji substratów (Easton i wsp., 2000). Dodatkowo, HSP110 pełni funkcję pomocniczą dla HSP70 działając jako NEF wymieniający ADP na ATP. Jako ko-chaperon, HSP110, nie tylko pomaga HSP70 pełnić funkcję fałdowania białek komórkowych, jest też niezbędny dla mechanizmu dysagregacji HSP70 i uczestniczy w szlaku degradacji, w którym HSP70 pośredniczy (Tittelmeier i wsp., 2020).

1.4.2. HSP90 – struktura, funkcje i rola w procesie nowotworzenia

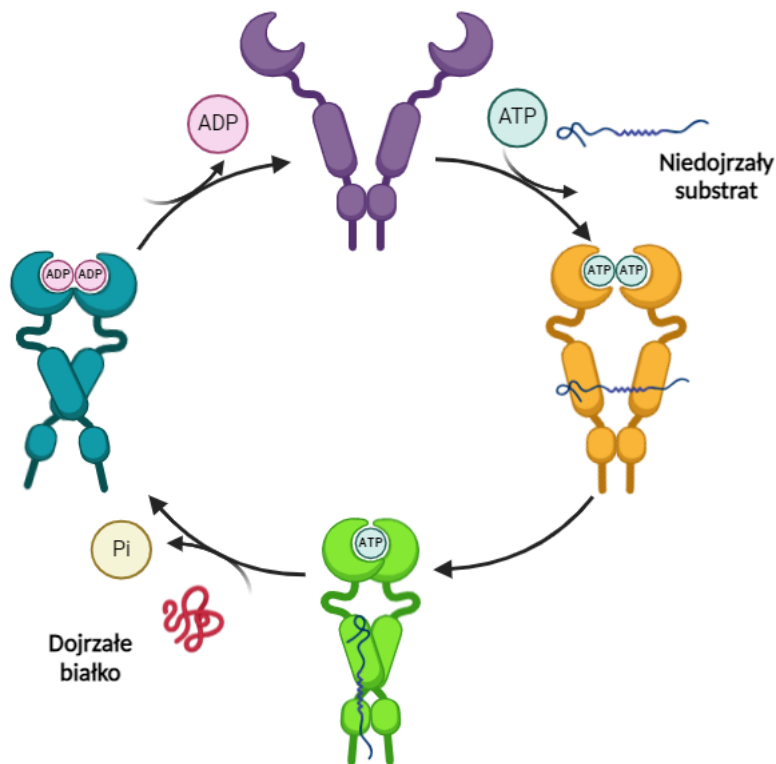
HSP90 uczestniczy w cyklach z udziałem substratów/klientów, w odmienny sposób od innych białek szoku cieplnego. Nie wspomaga fałdowania nowopowstałych białek, tak jak HSP60 i 70, ale odgrywa kluczową rolę na późnym etapie dojrzewania, aktywacji i stabilności substratów białkowych (Gvozdenov i wsp., 2019). Co więcej, HSP90 oddziałuje z bardziej specyficzną grupą klientów, których aktywacja jest od niego wysoce zależna. Substratami

białkowymi HSP90 są przede wszystkim niestabilne cząsteczki sygnałowe, w szczególności kinazy i czynniki transkrypcyjne regulujące procesy, takie jak, transdukcja sygnału, transport białek, remodeling chromatyny, autofagia, proliferacja komórek i ich przeżywalność (Zuehlke i Johnson, 2010). Wiele z tych substratów to białka onkogenne uważane za kluczowe czynniki wpływające na powstawanie i rozwój nowotworów (Whitesell i Lindquist, 2005).

HSP90 występuje w komórkach pod postacią homodimeru. Na każdy monomer składają się cztery domeny: domena N-końcowa (NTD – N-terminal domain), domena środkowa (MD – ang. middle domain), domena C-końcowa (CTD – C-terminal domain) oraz łącznik obdarzony ładunkiem ujemnym (ang. charged linker), łączący domenę N-końcową z domeną środkową. Sekwencja łącznika może wpływać na funkcje HSP90 (Tsutsumi i wsp., 2012). Domena NTD jest odpowiedzialna za wiązanie ATP z kieszenią wiążącą nukleotydy adeninowe na N-końcu (Chène, 2002). Dzięki aktywności ATPazy, NTD jest siłą napędową dla kilku procesów, takich jak wiązanie białek. Środkowa domena również moduluje aktywność ATPazową HSP90 a tym samym jego zdolność wiązania substratów (Meyer i wsp., 2003). Z kolei C-końcowa jest ważna na etapie dimeryzacji HSP90, która stanowi strukturalną podstawę dla prawidłowego funkcjonowania tego białka opiekuńczego. Kieszeń wiążąca nukleotydy adeninowe na C-końcu jest aktywna tylko wtedy, gdy miejsce N-końcowe jest zajęte (Soti i wsp., 2003). Dodatkowo, domena ta posiada sekwencję aminokwasową – MEEVD, która jest odpowiedzialna za wiązanie białek pomocniczych (Ali i wsp., 2006).

Istnieją cztery izoformy HSP90: HSP90-alfa (forma indukowalna), HSP90-beta (forma ulegająca konstytutywnej ekspresji), GRP94 (białko zależne od glukozy, ang. glucose-regulated protein 94) i TRAP1 (ang. tumor necrosis factor receptor-associated protein 1). HSP90-alfa i HSP90-beta mają podobną strukturę (85% identyczności sekwencji), funkcję i położenie wewnątrzkomórkowe w cytoplazmie (Ren i wsp., 2022). GRP94 jest glikoproteiną, która może chronić komórki przed działaniem stresu retikulum endoplazmatycznego. Białko to posiada specjalną grupę klientów, obejmującą białka sekrecyjne i błonowe, w tym rodzinę immunoglobulin (Ig), receptory Toll-podobne (TLR – ang. toll-like receptor) i integryny. Podobnie jak izoformy cytozolowe, GRP94 posiada domeny NTD, MD, CTD i łącznik obdarzony ładunkiem (Marzec i wsp., 2012). TRAP1 jest mitochondrialną izoformą HSP90 zlokalizowaną głównie w macierzy mitochondrialnej. W przeciwieństwie do innych izoform, TRAP1 nie posiada łącznika. TRAP1 jest niezbędny dla homeostazy mitochondriów w niektórych stanach patologicznych (Lisanti i wsp., 2014). Aktywność HSP90 opiera się na dynamicznych zmianach konformacji, zależnych od ATP i jest regulowana przez liczne ko-chaperony. Bez związanego nukleotydu, HSP90 pozostaje w otwartej konformacji NTD, tworząc dimery poprzez domenę CTD. Rozwinięte białka są związane do HSP90, w konformacji otwartej, w domenie MD, a wiązanie ATP indukuje dimeryzację domeny NTD. Następnie dochodzi do hydrolizy ATP, co prowadzi do bardziej zwiniętej i zamkniętej konformacji HSP90, po czym ADP jest uwalnianie z HSP90, co przywraca otwartą konformację. Dzięki powtarzaniu tego cyklu,

białka są składane i uwalniane w konformacjach natywnych (Ryc.1.6.) (Zierer i wsp., 2016).



Ryc. 1.6. Cykl ATP-azowy białka HSP90. Rycina zmodyfikowana na podstawie Hu i wsp., 2022.

Prawidłowe funkcjonowanie HSP90 wymaga udziału innych komponentów, z których najważniejszymi są ko-chaperony, które wspomagają HSP w cyklicznych zmianach konformacyjnych i wiązaniu substratów. Niektóre ko-chaperony zawierające domeny TPR (ang. Tetratricopeptide Repeat Domain) oddziałują z HSP90 poprzez wiązanie z C-końcowym motywem MEEVD. Jednym z najbardziej specyficznych ko-chaperonów zawierających TPR jest białko stabilizujące HSC70/HSP90 - HOP, które może wiązać się zarówno z HSP90, jak i HSP70. HOP pełni funkcję stabilizatora otwartej konformacji HSP90 (Zuehlke i Johnson, 2010). Inne ko-chaperony TPR to między innymi Tah1, fosfataza białkowa 5 (PP5), CHIP, cyklofilina 40 (CYP40) i TTC4 (Calderwood, 2013). Oprócz tego istnieją również ko-chaperony niezawierające domeny TPR. Dobrze zbadanym ko-chaperonem z tej grupy jest Cdc37, który jest związany z dojrzewaniem kinaz i prowadzi do częściowego zahamowania aktywności ATPazy HSP90 (Roe i wsp., 2004). Cdc37 jest także związany z powstawaniem i progresją nowotworów (Ren i wsp., 2022). Inne ko-chaperony niezawierające TPR to Aha1, aktywujący aktywność ATPazy HSP90 i p23, hamujący tą aktywność (Schopf i wsp., 2017).

Szereg złośliwych procesów, w tym wzrost guza, adhezja, inwazja, przerzutowanie i angiogeneza, jest ściśle związanych z funkcją opiekuńczą HSP90 oraz jego regulacją (Wu i wsp., 2017). Ekspresja HSP90 jest niezwykle wysoka w wielu nowotworach złośliwych, co potwierdza, że komórki nowotworowe znajdują się pod silną presją związaną z utrzymaniem integralności białek, a tym samym mają większe zapotrzebowanie na HSP90 (Isaacs i wsp., 2003). Ponadto nadekspresja HSP90 w tkankach nowotworowych często wiąże się z gorszym rokowaniem (Patel i wsp., 2014). Inhibicja HSP90 może prowadzić do degradacji białek kancerogennych i przerywania onkogennych szlaków (Jhaveri i wsp., 2014). Na podstawie struktury i funkcji HSP90 opracowano szereg inhibitorów, które wykazywały aktywność przeciwnowotworową w wielu badaniach przedklinicznych. W oparciu o strukturę, inhibitory te można podzielić na dwie kategorie: inhibitory N-końcowe, np. geldanamycyna i radicol (Blagg i Kerr, 2006) i inhibitory C-końcowe, takie jak nowobiocyna (Allan i wsp., 2006) i chlorobiocyna (Ren i wsp., 2022). Jednak wyniki monoterapii inhibitorami HSP90 nie były tak dobre, jak zakładano. Obok oporności nowotworów na inhibitory to toksyczność jest głównym czynnikiem ograniczającym skuteczność inhibitorów HSP90 jako monoterapii (Chatterjee i wsp., 2011). Połączenie inhibitorów HSP90 z innymi terapiami przeciwnowotworowymi wydaje się być obiecującą strategią rozwiązania tego problemu.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Efektywne leczenie raka piersi nadal pozostaje wyzwaniem dla naukowców poszukujących nowych metod leczenia. Każda komórka potrzebuje ciągłego dostarczania składników odżywczych do prawidłowego funkcjonowania, a także usuwania produktów przemiany materii. Aminokwasy, stanowiące niezbędne składniki odżywcze, przekraczają dwuwarstwę lipidową błony plazmatycznej dzięki funkcjonowaniu transporterów błonowych. Komórki nowotworowe również wymagają ciągłej podaży aminokwasów, która z uwagi na ich szybką proliferację jest znacznie wyższa niż w komórkach prawidłowych. Sukcesywnie pojawiające się badania dotyczące innowacyjnych rozwiązań w terapiach nowotworowych rodzą potrzebę dogłębnego poznania mechanizmów regulacji transporterów. SLC6A14, znany również jako ATB⁰⁺, jest transporterem aminokwasów o unikalnych właściwościach. Transportuje 18 z 20 aminokwasów białkogennych, w tym wszystkie obojętne i dodatnie. Z uwagi na małą ilość informacji dotyczących regulacji i mechanizmu doprowadzania SLC6A14 do błony plazmatycznej, celem projektu była identyfikacja białek zaangażowanych w te procesy, które mogłyby mieć wpływ na ilość transportera w błonie. Wykazano, że członkowie rodziny SLC6 w trakcie wychodzenia z siateczki śródplazmatycznej oddziałują z kilkoma białkami, takimi jak kalneksyna i białka szoku cieplnego. Uwolnienie tych białek opiekuńczych odkrywa miejsce wiązania w C-końcu dla SEC24 (który jest składnikiem COPII). Pozwala to na eksport transportera z siateczki. Ponieważ w proteomie SLC6A14 wykryto kilka cytozolowych białek szoku cieplnego, postanowiono zweryfikować interakcję między transporterem a owymi białkami w procesie wychodzenia SLC6A14 z siateczki. Wysoką ekspresję zarówno SLC6A14, jak i HSP90-beta zaobserwowano w różnych typach nowotworów, gdzie mają istotny wpływ na proliferację i żywotność komórek. W związku z tym postanowiono przeanalizować rolę tych białek w liniach komórkowych raka piersi, w których jest obecny receptor estrogenowy.

Głównymi celami przeprowadzonych badań były:

- 1) weryfikacja interakcji między SLC6A14 i białkami HSP w procesie eksportu transportera z siateczki śródplazmatycznej;
- 2) analiza potencjalnej roli białka HSP90-beta jako regulatora aktywności SLC6A14 w liniach komórkowych raka piersi.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Roztwory i bufor

Wszystkie wymienione niżej roztwory i bufor przygotowano przy użyciu wody oczyszczonej przez odwróconą osmozę i ultrafiltrację filtrami Mili-Q Plus (Milipore). Skład najważniejszych i najczęściej wykorzystywanych roztworów i buforów podano w Tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Wykaz stosowanych roztworów i buforów

NAZWA	SKŁAD
PBS (z ang. phosphate buffer saline) - Sól fizjologiczna w buforze fosforanowym	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBS+	PBS, 1mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂ , 5mM glukoza
TBS (z ang. Tris-buffered saline)	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4
TBS-T	TBS zawierający 0,1% Tween-20
Roztwory glukonianów	137 mM C ₆ H ₁₁ NaO ₇ , 2,7 mM C ₆ H ₁₁ KO ₇ , 1 mM C ₁₂ H ₂₂ CaO ₁₄ , 0,5 mM C ₁₂ H ₂₂ MgO ₁₄ xH ₂ O, 10 mM HEPES, pH 7,4
Bufor do elektroforezy białek	192 mM glicyna, 0,1% SDS, 25 mM Tris, pH 8,3
Bufor do transferu białek na membranę PVDF lub nitrocelulozową	192 mM glicyna, 20% metanol, 0,05% SDS, 25 mM Tris, pH 8,3
Bufor do blokowania po elektrotransferze	TBS-T, 7,5% lub 10% odtłuszczone mleko
5x stężony SB – bufor do denaturacji i zawieszania białek do rozdzielania elektroforetycznego (z ang. sample buffer)	10% SDS, 50% glicerol, 0,05% błękit bromofenolowy, 25% β – merkaptoetanol, 300 mM Tris-HCl, pH 6,8
Bufor do lizy i ekstrakcji białek – RIPA	150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 0,5% dezoksychoalan sodu, 50 mM Tris, pH 7,4
Bufor do lizy i ekstrakcji białek – IGEPAL	150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% IGEPAL - 40, 50 mM Tris, pH 7,4
Odczynnik do oznaczania ilości białka zmodyfikowaną metodą Lowry'ego	0,1% CuSO ₄ i 0,2% winian sodowo- potasowy w roztworze 0,1 N NaOH,

	2% Na ₂ CO ₃ , 0,3% SDS
Bufor do blokowania (Immunocytochemia)	5% surowica kozia w PBS
Roztwór do utrwalania komórek (Immunocytochemia)	100% metanol o temp. -20°C
TBE (z ang. Tris/Borate/EDTA)	45 mM kwas borowy, 2 mM EDTA, 45 mM Tris, pH 8,3

3.1.2. Przeciwciała

Tabela 3.2. Wykaz stosowanych przeciwciał pierwszorzędowych

Antygen (Nazwa firmy, numer katalogowy)	Pochodzenie	Zastosowanie/Rozcieńczenie
Anty-FLAG (Sigma-Aldrich, F3165)	monoklonalne mysie	WB – 1:1000 ICC/PLA – 1:1000
Anty-FLAG (Sigma-Aldrich, F7425)	poliklonalne królicze	ICC – 1:1000
Anty-SLC6A14 (Abcam, ab99102)	poliklonalne królicze	WB – 1:1000
Anty-SLC6A14 (Abcam, ab254786)	poliklonalne królicze	WB – 1:1000
Anty-SLC6A14 (Aviva Systems Biology, ARP43925_P050)	poliklonalne królicze	WB – 1:1000 ICC – 1:250
Anty-HSP90-beta (Invitrogen, PA3-012)	poliklonalne królicze	WB – 1:1000 ICC/PLA – 1:250
Anty-HSP90-beta (Enzo Life Sciences, K3705)	monoklonalne mysie	WB – 1:1000 ICC/PLA – 1:250
Anty-HSPA14 (Santa Cruz Biotechnology, sc-398208)	monoklonalne mysie	ICC – 1:250
Anty-HSPA14 (Biorbyt, orb247809)	poliklonalne królicze	WB – 1:1000 ICC/PLA – 1:250
Anty-ER alpha (ThermoFisher Scientific, MA5-13304)	monoklonalne mysie	WB – 1:500
Anty-ER alpha (Abcam, ab108398)	poliklonalne królicze	WB – 1:1000
Anty-GAPDH (Milipore, AB5220)	monoklonalne mysie	WB – 1:500

Anty- β -Aktyna, p-ciało sprzężone z HRP (Sigma, A3854)	monoklonalne mysie	WB – 1:25000
---	--------------------	--------------

WB – Immunobloting, ICC – Immunocytochemia, PLA – test ligacji zbliżeniowej

Tabela 3.3. Wykaz stosowanych przeciwciał drugorzędowych

Antygen (Nazwa firmy, numer katalogowy)	Pochodzenie	Zastosowanie/Rozcieńczenie
Anty-IgG-mysie, sprzężone z Alexa Fluor 568® (ThermoFisher Scientific, A11031)	Koza	ICC – 1:500
Anty-IgG-królicze, sprzężone z Alexa Fluor 488® (ThermoFisher Scientific, A11034)	Koza	ICC – 1:500
Anty-IgG-królicze, sprzężone z Alexa Fluor 568® (ThermoFisher Scientific, A11036)	Osiół	ICC – 1:500
Anty-IgG-mysie, sprzężone z Alexa Fluor 488® (ThermoFisher Scientific, A11029)	Osiół	ICC – 1:500
Anty-IgG-królicze (Invitrogen, 31460)	Koza	WB – 1:1000
Anty-IgG-mysie (Invitrogen, 31430)	Koza	WB – 1:1000

WB – Immunobloting, ICC – Immunocytochemia

3.1.3. Pochodzenie materiałów i odczynników

Bio-Rad: Bufor do blokowania po elektrotransferze - EveryBlot Blocking Buffer

Biomatik: synteza peptydów z N i C-końca białka SLC6A14 (N11, C1, C11, C36)

Cayman Chemical: Radicicol

Chempur: metanol, aceton, chlorek sodu (NaCl), kwas solny (HCl)

Cyanagen: zestawy odczynników do chemiluminescencji (Westar Sun, Westar Eta C 2.0, Westar Eta C ULTRA 2.0, Westar Supernova)

Fluka: glicyna, glukoza, Triton® X-100

GE Healthcare: membrana nitrocelulozowa do immunoblotingu (Amersham Protran 0.45 NC nitrocellulose Western blotting membranes)

Gibco: płodowa surowica bydlęca (ang. FBS – fetal bovine serum), pożywka RPMI 1640 bez czerwieni fenolowej (ang. Roswell Park Memorial Institute), pożywka DMEM bez czerwieni fenolowej (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium), L-glutamina, EFG

Invitrogen: Lipofectamine 2000

Lab Empire: agar, tabletki PBS, roztwór dwusiarczanu genetycyny (G418), roztwór penicylina/streptomycyna (100x stężony), L-glutamina, dezoksycholan sodu

Merck Millipore: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , odczynnik Folina (Folin–Ciocâlțeu), Immobilon-P PVDF (z ang. PolyVinylidene DiFluoride, dwufluorek poliwinylidenu), Immobilon-NC

MKJ radiologia: klisze - Fuji X-ray medical film Super RX

MP Biochemicals: ampicylina

PerkinElmer: radioaktywna L-Leucyna: L-[3,4,5- $^3H(N)$]-Leucine aqueous sol (Cat. No. NET460A001MC), odczynnik scyntylicyjny: Ultima Gold™

POCH Polskie Odczynniki Chemiczne: siarczan miedzi, chlorek wapnia, izopropanol, wodorotlenek sodu, etanol, winian sodowo-potasowy, kwas octowy, gliceryna bezwodna cz.d.a. 99,5%

Promega: CellTox Green™ cytotoxicity assay

Roche: koktajl inhibitorów fosfataz PhosphoSTOP

Selleckchem: Bortezomib (PS-341), VER155008

Serva: DNA stain G

Sigma: agaroz, akryloamid/bis-akryloamid 30% roztwór, alkaliczna fosfataza (z bydłowej błony śluzowej), błękit bromofenolowy, chlorek magnezu, dehydrogenaza mleczanowa (LDH), surowicza albumina wołowa (BSA), L-tryptofan, 3-[(3-cholamidopropylo)dimetyloamonio]-1-propanosulfonian, 1-metylo-L-tryptofan, D-(+)-glukoza, dwuwęglan sodu, pożywka bakteryjna LB, EZview ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel, fosfoenolopirogronian, 3xFLAG® PEPTIDE, Igepal® CA-630 (Nonidet P-40), koktajl inhibitorów proteaz, hydrokortyzon, nadsiarazan amonu, kinaza pirogronianowa, kwas trójchlorooctowy, fluorek fenylo-metylosulfonowy, NADH, paraformaldehyd, insulina, poli-D-lizyna, radicicol, pożywki do hodowli komórkowych: DMEM oraz EMEM w proszku, DMEM gotowy roztwór, DMEM/F12, DMEM/F12 bez czerwieni fenolowej; sól sodowa siarczanu dodecyłu, surowica końska, surowica ośła, błękit trypanu, wodorotlenek sodu, DMSO, odczynniki do PLA: Duolink® in situ detection reagents ORANGE, Duolink® in situ PLA probe anti-mouse MINUS, Duolink® in situ PLA probe anti-rabbit PLUS, Duolink® in situ wash buffers, Duolink® in situ Mounting Medium with DAPI, trypsyna, tiomocznik, Tween® 20.

SignalChem: rekombinowane białko HSP90-beta

Thermo Fisher Scientific: roztwór ATP, fungizon, standard do żeli poliakryloamidowych: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder – 10 to 250 kDa, medium służące do zatapiania preparatów do ICC: ProLong Diamond Antifade Mountant, odczynnik biotynylujący: EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin, złożo do biotynylacji z awidyną: Pierce Avidin Agarose, mieszanina dNTP, barwnik z obciążnikiem do DNA – 6x Loading Dye Solution.

Ubichem: β-merkaptoetanol, sacharoza.

VWR: filtry butelkowe (0,22 μm), filtry strzykawkowe (0,2 μm), odczynnik do transfekcji JetPRIME, sterylne pipety serologiczne, butelki, szalki oraz inne materiały do hodowli komórkowej.

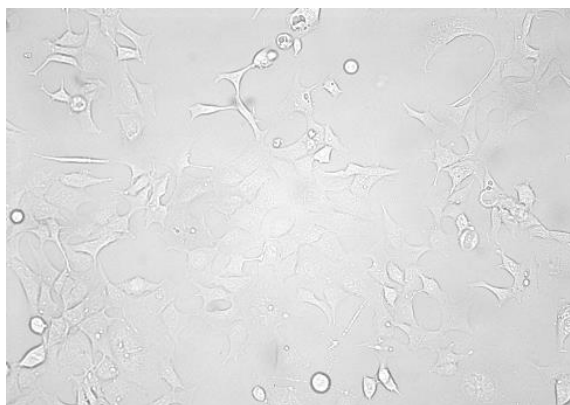
3.2. Hodowle komórkowe

Materiał biologiczny w realizowanej pracy doktorskiej stanowiły komórki HEK293 oraz wybrane linie nowotworowe raka piersi, dla których, kontrolę stanowiły prawidłowe linie nabłonkowe – MCF 10A oraz MCF-12A. Wszystkie wymienione hodowle prowadzono w 37°C w atmosferze nasyconej parą wodną oraz 5% CO₂. Pożywkę wymieniano średnio co dwa dni a komórki pasażowano, roztworem trypsyny z EDTA (0.25% trypsyna, 1mM EDTA w PBS), po osiągnięciu przez nie 80-90% konfluencji.

3.2.1. Linia komórkowa HEK293

HEK293 (z ang. **Human Embryonic Kidney 293**) to nieśmiertelniona linia komórkowa stworzona w 1973 roku przez holenderskich badaczy (Graham i wsp., 1977). Linię tę otrzymano przy użyciu DNA adenowirusa typu 5, którym transfekowano ludzkie komórki embrionalne wyizolowane z nerek abortowanych lub samoistnie poronionych płodów.

Komórki użyte do badań pozyskano z ATCC® (293[HEK-293]; CRL-1573). Hodowlę prowadzono na 10 cm szalkach w pożywce DMEM wzbogaconej o 10% FBS, 4,5 mg/ml glukozę, 1% roztwór penicyliny/streptomycyny oraz 0,25 µg/ml fungizon.



Ryc. 3.1. Morfologia komórek HEK293.

3.2.2. Linie nowotworowe raka piersi

W niniejszej pracy wykorzystano następujące linie komórek raka piersi:

MCF7 (ang. **Michigan Cancer Foundation-7**) – linia komórkowa wyizolowana w 1970 roku z wysięku opłucnowego 69 letniej kobiety rasy kaukaskiej cierpiącej na złośliwego gruczolakoraka piersi (ang. breast adenocarcinoma). Komórki tej linii są podwójnie pozytywne, to znaczy, wykazują ekspresję receptorów: estrogenowego alfa (ER-α), progesteronowego (PR) natomiast nie ulega w nich ekspresji ludzki naskórkowy czynnik wzrostu typu 2 (HER2, ang. human epidermal growth factor receptor 2) i są tumorogenne.

MDA-MB-231 – linia komórkowa przerzutowego gruczolakoraka sutka wyizolowana z wysięku opłucnowego 51 letniej kobiety rasy kaukaskiej. Komórki tej linii są potrójnie negatywne: ER-α⁻, PR⁻, HER2⁻, ale są tumorogenne.

MDA-MB-468 – linia komórkowa przerzutowego gruczolakoraka piersi wyizolowana w 1977 roku z wysięku opłucnowego 51 letniej kobiety rasy czarnej. Komórki tej linii są potrójnie negatywne: ER- α^{-} , PR $^{-}$, HER2 $^{-}$ i są tumorogenne.

SKBR3 – linia komórkowa gruczolakoraka sutka wyizolowana w 1970 roku z wysięku opłucnowego 43 letniej kobiety rasy kaukaskiej. Komórki tej linii są podwójnie negatywne: ER- α^{-} , PR $^{-}$, wykazują nadekspresję ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2 $^{+}$) i nie są tumorogenne.

Komórki wyżej wymienionych linii hodowano w pożywce DMEM bez czerwieni fenolowej z dodatkami: 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), 1% roztworem penicyliny/streptomycyny oraz 0,25 μ g/ml fungizonem. Linie MCF7 pozyskano dzięki uprzejmości prof. dr hab. Bożeny Kamińskiej - Kaczmarek (Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN), zaś MDA-MB-231 i SKBR3 dzięki uprzejmości prof. dr hab. Anny Żaczek (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego).

BT-474 – linia komórkowa wyizolowana w 1978 roku z biopsji litego inwazyjnego guza przewodowego raka piersi 60 letniej kobiety rasy białej. Komórki tej linii są potrójnie pozytywne ER- α^{+} , PR $^{+}$, HER2 $^{+}$ oraz tumorogenne.

T-47D – linia komórkowa wyizolowana z wysięku opłucnowego 54 letniej kobiety cierpiącej na naciekającego przewodowego raka piersi. Komórki tej linii są podwójnie pozytywne ER- α^{+} , PR $^{+}$, HER2 $^{-}$ oraz tumorogenne.

Komórki hodowano w pożywce RPMI 1640 bez czerwieni fenolowej z dodatkami: 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), 1% roztworem penicyliny/streptomycyny oraz 5 mg/ml insuliny.

Linie pozyskano dzięki uprzejmości prof. dr hab. Anny Żaczek. Tożsamość badanych linii nowotworowych również potwierdzono za pośrednictwem ATTC® w grudniu 2019 roku.

3.2.3. Wybrane linie kontrolne

Kontrolę dla komórek nowotworowych stanowiły dwie zdrowe linie nabłonkowe:

MCF 10A – wyizolowana w 1984 roku z gruczołu sutkowego 36 letniej kobiety rasy białej z mastopatią piersi.

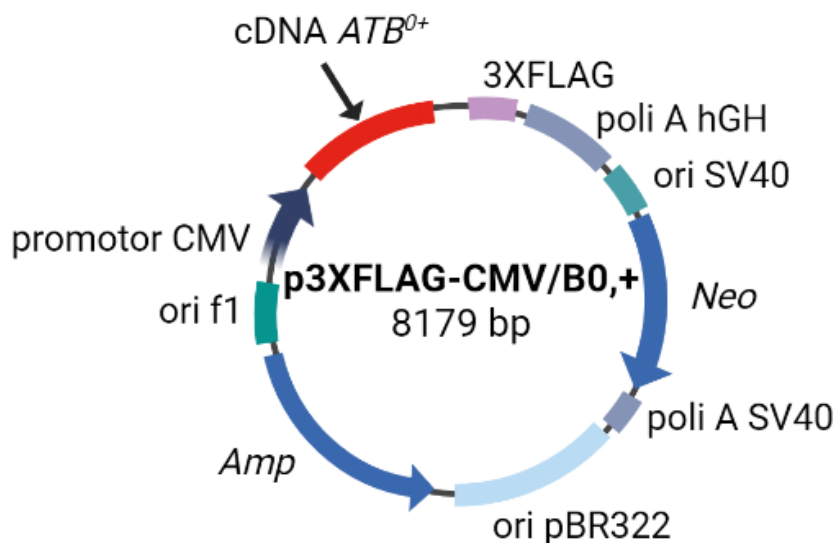
MCF-12A – wyizolowana z gruczołu sutkowego 60 letniej kobiety rasy kaukaskiej.

Komórki hodowano w pożywce DMEM/F12 bez czerwieni fenolowej z dodatkami: 5% serum końskim, 0,5 mg/ml hydrokortyzonem, 10 mg/ml insuliny oraz 20 ng/ml EGF.

Linie pozyskano dzięki uprzejmości prof. dr hab. Anny Żaczek a ich tożsamość potwierdzono za pośrednictwem ATTC® w grudniu 2019 roku.

3.3. Stosowane plazmidy

W pracy zastosowano dwa plazmidy - plazmid bez wstawki, stanowiący kontrolę negatywną: p3×FLAG-CMV14 zakupiony w Sigmie i drugi do nadekspresji SLC6A14 - p3×FLAG-CMV14/B^{0,+} uzyskany przez Magdalенę Czeredys, poprzez wklonowanie szczurzego cDNA ATB^{0,+} do wektora p3×FLAG-CMV14 (p3×FLAG-CMV14/B^{0,+}). Szczegóły dotyczące procesu otrzymania plazmidu zostały opisane w pracy Łukasza Samluka (Samluk i wsp., 2012). Mapę plazmidu przedstawiono poniżej (Ryc. 3.2).



Ryc. 3.2. Mapa plazmidu p3×FLAG-CMV14/B^{0,+}. Szczurze cDNA ATB^{0,+} zostało sklonowane do plazmidu p3×FLAG-CMV14. cDNA ATB^{0,+} - szczurze cDNA ATB^{0,+}; 3XFLAG – metka wstawki; CMV – promotor Cytomegalowirusa; poli A hGH – sygnał poliadenylacji z ludzkiego hormonu wzrostu; ori SV40 – miejsce startu replikacji wirusa SV40; Neo – gen oporności na genetycynę (G418); poli A SV40 – sygnał poliadenylacji z wirusa SV40; ori pBR322 – miejsce startu replikacji wektora pBR322; Amp – gen oporności na ampicylinę; ori f1 – miejsce startu replikacji faga f1.

3.4. Hodowle bakteryjne

3.4.1. Warunki hodowli

Plazmidy namnażano a następnie izolowano z kultury bakterii *Escherichia coli*, szczepu TOP10, chemicznie kompetentnego (Invitrogen). Wykorzystywano kultury bakteryjne transformowane wektorami, które zostały przygotowywane przez współpracowników. Bakterie hodowano w podłożu wzrostowym LB (Luria-Bertani, Sigma; skład: 1% trypton kazeinowy, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 1% NaCl, pH 7,5) z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego - ampicyliny (100 µg/ml). Hodowlę prowadzono w 37°C z wytrząsaniem 200 rpm przez noc.

3.4.2. Izolacja plazmidowego DNA

Izolację przeprowadzano, gdy bakterie były w fazie wzrostu logarytmicznego. Gęstość optyczną (OD₆₀₀) mierzono w spektrofotometrze (długość fali 600 nm), kontrole stanowiło podłoże LB z antybiotykiem. DNA oczyszczano przy użyciu zestawu Plasmid Midi (A&A Biotechnology).

3.5. Metody

3.5.1. Traktowanie komórek

Poza α -metylotryptofanem (α -MT), który został rozpuszczony w sterylnej wodzie Mili-Q z dodatkiem HCl, wszystkie inhibitory podawane komórkom przygotowano przy użyciu DMSO. Wybrane linie kontrolne traktowano rozpuszczalnikiem o stężeniu odpowiadającym próbom eksperymentalnym. Końcowe stężenie DMSO nie przekraczało 0,5% w przypadku podania komórkom dwóch inhibitorów jednocześnie (Radicicol + Bortezomib, lub VER + Bortezomib) i 0,1% w przypadku pojedynczego inhibitora. W pracy zastosowano następujące substancje: radicol (stężenia końcowe 20, 40 lub 60 µM), VER155008 (50 µM), bortezomib (25 lub 50 nM) oraz α -MT (1 mM).

Komórki inkubowano w odpowiedniej dla linii pożywcze hodowlanej z dodatkiem wybranego inhibitora przez 24 h w temperaturze 37°C. Konfluencja komórek użytych do doświadczeń wynosiła co najmniej 80%.

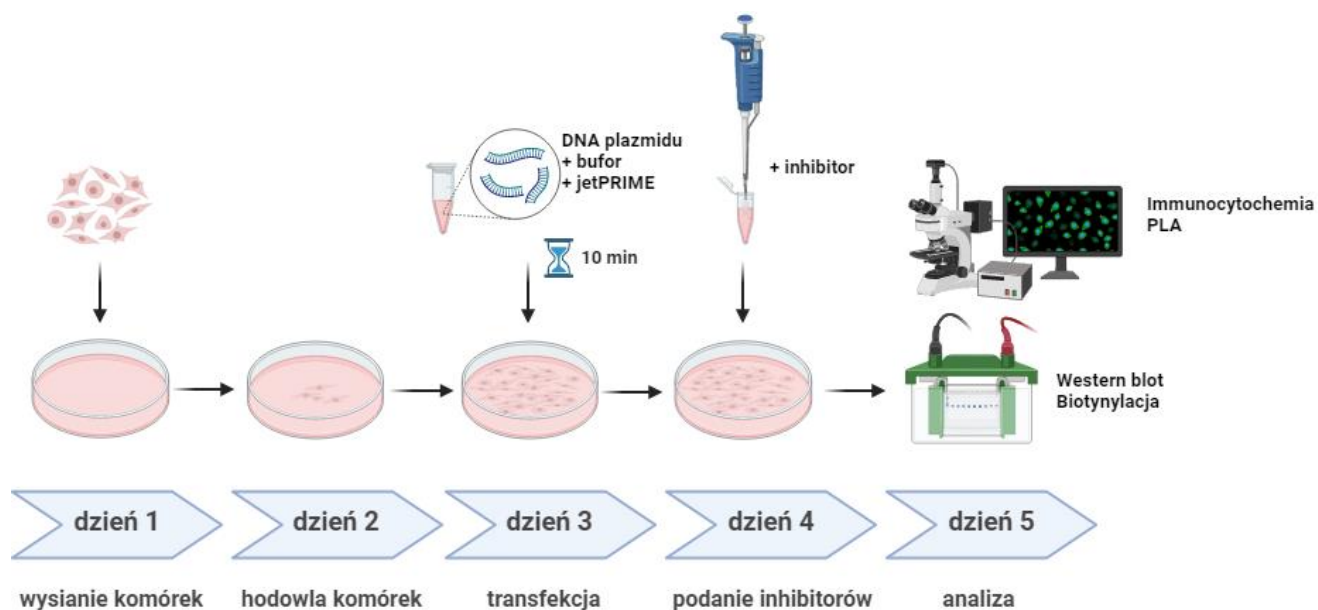
3.5.2. Transfekcja komórek

3.5.2.1. Stabilna transfekcja komórek linii HEK293

Komórki wysiewano na 10 cm szalki i hodowano w pożywce DMEM z antybiotykami do uzyskania 80-90% konfluencji. Następnie, 24 h przed eksperymentem, komórkom zmieniano pożywkę na DMEM bez dodatku antybiotyków. Procedurę transfekcji poprzedzało przygotowanie na świeżo dwóch mieszanin: 8 µg DNA wybranego plazmidu + 500 µl pożywki Opti-MEM Reduced Serum Media, oraz 20 µl Lipofektamine 2000 + 500 µl pożywki Opti-MEM Reduced Serum Media. Po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej łączono i delikatnie mieszano obie mieszaniny a następnie poddawano kolejnej inkubacji również w temperaturze pokojowej przez 20min. Po tym czasie otrzymaną mieszaninę dodawano do komórek a po 6 godzinach wymieniano im pożywkę na świeżą, również nie zawierającą dodatku antybiotyków (penicyliny/streptomycyny). Następnego dnia, w celu stabilnego utrzymania plazmidów, pożywkę wymieniano na pożywkę hodowlaną uzupełnioną antybiotykiem selekcyjnym – genetyciną (300 µg/ml) a w kolejnych dniach komórki pasażowano i hodowano nadal w pożywce selekcyjnej.

3.5.2.2. Przejściowa transfekcja komórek linii HEK293

Transfekcję przeprowadzano przy użyciu odczynnika jetPRIME, metodą lipofekcji. Komórki poddawano procedurze zgodnie z protokołem dostarczonym przez dostawcę. W uproszczeniu, do roztworu DNA w buforze jetPRIME dodawano odczynnik jetPRIME, mieszano i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Tak przygotowaną mieszaninę dodawano do komórek hodowanych na 10 cm szalkach ze świeżo zmienioną pożywką. Następnego dnia, po upływie 24 h, komórki poddawano dalszym manipulacjom (Ryc. 3.3.).



Ryc. 3.3. Schemat transfekcji przejściowej komórek HEK293.

3.5.3. Przygotowywanie ekstraktów białkowych

3.5.3.1. Sporządzanie lizatów

Komórki rosnące na szalkach poddawano lizie, po osiągnięciu 90% gęstości. W tym celu, po trzykrotnym przepłukaniu zimnym roztworem PBS, komórki zbierano przy pomocy głaszczki a następnie wirowano przez 10 minut (prędkość 800xg) w 4°C. W przypadku komórek traktowanych inhibitorami zbierano także komórki obecne w pożywce poprzez trypsynizację oraz trzykrotne płukanie roztworem PBS wraz z wirowaniem. Osad komórek zawieszano i lizowano w roztworach do homogenizacji IGEPAL lub RIPA (skład podany w rozdziale 3.1.1.) z dodanym koktajlem inhibitorów proteaz 1:100 (Sigma Aldrich), 40 µg/ml PMSF oraz w przypadku komórek nowotworowych z dodatkiem inhibitorów fosfataz PhosphoSTOP 1:10. Homogenizację prowadzono na lodzie przepuszczając komórki przez igłę 25G (0,5 mm × 25 mm) około 30 razy. W celu oddzielenia jąder komórkowych, otrzymany homogenat wirowano przez 15 minut (1000xg) w 4°C, następnie zbierano supernatant, w którym mierzono stężenie białka.

Ekstrakty białkowe wykorzystywano od razu do następných procedur lub zamrażano w -80°C.

3.5.3.2. Pomiar stężenia białka

Ilość białka w przygotowanych ekstraktach mierzono metodą Lowry'ego (Lowry i wsp., 1951), zmodyfikowaną przez Nałęcz i współpracowników (Nałęcz i wsp., 1986), przy użyciu albuminy z surowicy bydlęcej (BSA) jako

standardu. Próbkę ekstraktu białkowego, odpowiednio 5 μ l lub 10 μ l, rozcieńczano wodą do objętości 200 μ l a następnie dodawano 1 ml zmodyfikowanego odczynnika Lowry'eg (Tabela 3.1.). Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej próbkę mieszano z 0,1 ml odczynnika fenolowego Folina-Ciocalteu (rozcieńczonego w wodzie w stosunku 2:3) i inkubowano 30 minut również w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dokonywano pomiaru absorbancji próby w spektrofotometrze przy długości fali 750 nm wobec próby kontrolnej zawierającej roztwór do izolacji białka rozcieńczony odpowiednio wodą oczyszczoną (Rozdział 3.1.1.).

Stężenie białka określano ilościowo, odczytując je z krzywej wzorcowej przygotowanej na podstawie pomiarów absorbancji próbek BSA o znanym stężeniu białka (zakres 0-70 μ g/ml) w roztworze do izolacji białka użytym do danego eksperymentu.

3.5.4. Techniki elektroforetyczne

3.5.4.1. Elektroforeza jednokierunkowa (SDS-PAGE)

Do rozdziału białek z ekstraktów białkowych wykorzystywano elektroforezę prowadzoną w warunkach denaturujących, w poliakryloamidowym żelu SDS-PAGE (z ang. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) opracowaną przez U.K. Laemmli (Laemmli, 1970). Próbki, zawierające 1-50 μ g białka, lub całe lizaty (biotynylacja, immunoprecypitacja) zawieszano w 5x stężonym buforze SB w stosunku 1:4 (skład - Tabela 3.1.) i nakładano na przygotowany wcześniej żel poliakryloamidowy. Używano żeli składających się z warstwy 5% żelu zagęszczającego (0,33 ml mieszaniny 30% akryloamidu i 2% N,N'-bis-metylenoakryloamidu, 0,25 ml roztworu 0,5 M Tris o pH 6,8, 0,02 ml 10% SDS, 1,4 ml wody, 0,02 ml 10% nadsiarczanu amonu, 2 μ l TEMED) i warstwy 10% żelu rozdzielającego (1,7 ml mieszaniny 30% akryloamidu i 2% N,N'-bis-metylenoakryloamidu, 1,3 ml roztworu 1,5 M Tris o pH 8,8, 0,05 ml 10% SDS, 1,9 ml wody, 0,05 ml 10% nadsiarczanu amonu, 2 μ l TEMED). Elektroforezę białek prowadzono w buforze do elektroforezy (skład – Tabela 3.1.), w aparacie Mini Protean II (Bio-Rad), przy napięciu 100-150 V. Aby odczytać masę cząsteczkową rozdzielonych białek na żel nakładano również standard w formie barwnej mieszaniny białek o znanych masach cząsteczkowych, zakres 10 – 250 kDa (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder firmy Thermo Scientific).

3.5.4.2. Immunobloting (Western Blot)

Po zakończonej elektroforezie białka przenoszono na membranę nitrocelulozową lub z fluorku poliwinylidenu, Immobilon™ PVDF (uprzednio aktywowana metanolem), techniką mokrego transferu białek. Transfer

prowadzono przez 2 godziny przy stałym natężeniu prądu 400 mA w zimnym buforze do elektrotransferu (skład – Tabela 3.1.).

Aby zablokować niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał membranę inkubowano przez noc w 4°C w 7,5% lub 10% roztworze odtłuszczonego mleka rozpuszczonego w TBS-T (skład – Tabela 3.1.) lub w gotowym odczynniku blokującym (EveryBlot Blocking Buffer, Bio-Rad). Tak przygotowaną błonę inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym rozpuszczonym w roztworze do blokowania przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej lub przez noc w 4°C. W celu usunięcia nadmiaru niezwiązanego przeciwciała, membranę płukano trzykrotnie po 10 minut w roztworze TBS-T. Następnie błonę poddawano godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym (anty IgG myszy lub królika sprzężone z peroksydazą chrzanową) rozcieńczonym w buforze do blokowania w stosunku 1:5000 i ponownie wypłukiwano nadmiar przeciwciała trzy razy po 10 minut w TBS-T. Detekcję białek przeprowadzano przy użyciu zestawów do chemiluminescencji (ECL Westar ηC, Westar ηC Ultra lub Westar Supernova – w zależności od ilości białka lub czułości przeciwciała) zawierających w składzie substrat dla peroksydazy. Membranę umieszczano w kasecie a wyniki zbierano w ciemni, na kliszach rentgenowskich przykładanych do błony na różne czasy ekspozycji. W celu ilościowego opracowania wyników przeprowadzano analizę densytometryczną z wykorzystaniem ogólnodostępnego programu ImageJ/FijiJ.

Tych samych membran używano często kilkakrotnie po przeprowadzeniu procesu strippingu, czyli inkubacji w 0,2 M wodnym roztworze NaOH przez około 10 - 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie błonę płukano 3 krotnie w roztworze TBS-T przez 10 min i ponownie poddawano opisanej wyżej procedurze.

3.5.5. Immunoprecypitacja na złożu EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel

Lizaty białkowe zawierające 0,8 lub 1 mg białka nakładano na 40 µl złoża związanego z przeciwciałem specyficznym dla peptydu 3xFLAG, stanowiącego metkę białka ATB^{0,+} po jego nadekspresji z wykorzystaniem wektora (p3xFLAG-CMV14/B^{0,+}). Złoże uprzednio aktywowano przez dwukrotne przepłukanie buforem TBS i odwirowanie w 4°C. Jako kontrolę potencjalnego niespecyficznego sygnału z przeciwciała na równoległą porcję złoża nakładano lizat z komórek transfekowanych plazmidem p3xFLAG-CMV14. Następnie próby inkubowano z delikatnym wytrząsaniem przez noc w 4°C, po tym czasie złoże oddzielano poprzez wirowanie (1 min przy 8200xg) i płukano sześciokrotnie zimnym roztworem TBS (skład – Tabela 3.1.) przez 5 min. Elucję białek przeprowadzano przy użyciu 50 µl peptydu 3xFLAG rozpuszczonego w TBS (stężenie 150 ng/µl) z delikatnym wytrząsaniem przez 30 minut w 4°C. Po tym etapie próby odwirowywano a do zebranego

supernatantu dodawano 5x stężony SB. Tak przygotowane próbki poddawano elektroforezie i metodzie immunoblotingu.

3.5.6. Biotynylacja białek powierzchniowych

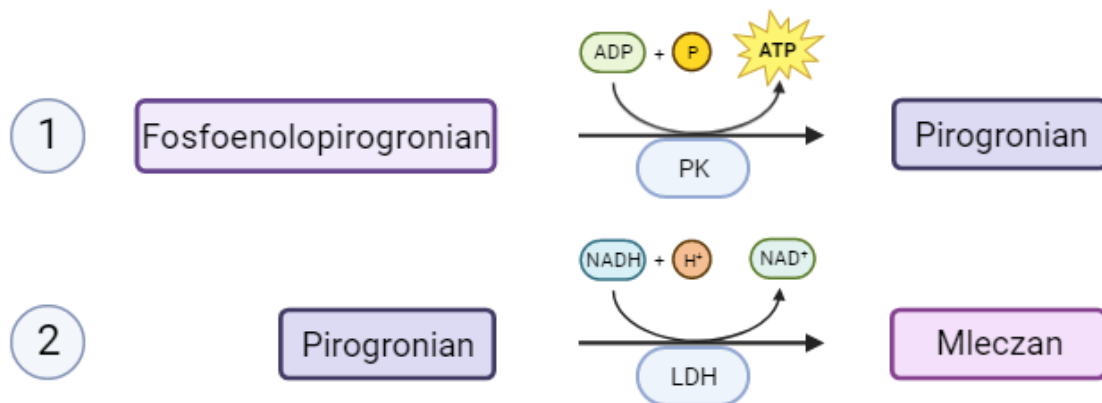
Komórki rosnące na szalkach przepłukiwano dwukrotnie zimnym roztworem PBS+ (skład – Tabela 3.1.) a następnie poddawano 30 minutowej inkubacji w 4°C z odczynnikiem biotynylującym (EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin) rozpuszczonym w PBS+ (1mg/ml). Po tym czasie usuwano nadmiar niezwiązanego odczynnika poprzez trzykrotne płukanie PBS+ i inkubowano przez 15 min w 4°C ze 100 mM zimnym roztworem glicyny w PBS+. Komórki płukano dwukrotnie zimnym roztworem PBS+, następnie przygotowywano ekstrakty białkowe w buforze RIPA (skład – Tabela 3.1.) oraz dokonywano pomiaru stężenia białka zgodnie z protokołami z Rozdziału 3.5.3.

Z powstałych ekstraktów przygotowywano próby kontrolne, do późniejszej elektroforezy i immunoblotingu, zawierające 10 - 50 µg białka i 5x stężony SB oraz próby zawierające 400 - 800 µg, które mieszano ze 100 µl zawiesiny złoża agarozowego z awidyną (Pierce® Avidin Agarose Resin) i inkubowano przez noc w 4°C z delikatnym mieszaniem. Złoże odwirowywano przy 1000xg przez 1 min i płukano trzykrotnie zimnym roztworem RIPA. Po odwirowaniu dokonywano elucji poprzez łączenie otrzymanego peletu z 2x stężonym roztworem SB. Otrzymane próbki, wraz z kontrolami, poddawano elektroforezie i analizie metodą immunoblotingu.

3.5.7. Pomiar aktywności białka HSP90-beta

Aktywność ATPazy oczyszczonego i rekombinowanego białka HSP90-beta o pełnej długości oznaczano w buforze reakcyjnym zawierającym: 20mM KCl, 6mM MgCl₂, 100 mM Tris o pH 7,4, zgodnie z metodą enzymatyczną opracowaną przez Williamsona i Corkey (Williamson i Corkey, 1969) dostosowaną do pomiarów fluorescencji w czytniku płytkowym. W skrócie, do 100 µl buforu reakcyjnego uzupełnionego o 196 µM NADH, 2,4 mM fosfoenolopirogronian, 45 U/ml dehydrogenazę L-mleczanową, 24,5-42 U/ml kinazę pirogronianową i 2 µg HSP90-beta dodawano 1 mg wybranego N-acetylowanego lub C-amidowanego peptydu (Tabela 3.4.) lub inhibitor HSP90-beta radicicol (548 µM). ADP jako produkt został wykorzystany przez kinazę pirogronianową do utworzenia pirogronianu z fosfoenolopirogronianu, po czym nastąpiła redukcja pirogronianu do mleczanu przez dehydrogenazę mleczanową w obecności NADH (Ryc. 3.4.). Reakcję prowadzono przez 3 godziny w 37°C a rozpoczynano, po 30 minutowej stabilizacji, przez dodanie ATP (1,5 mM stężenie końcowe). Następnie co minutę rejestrowano pomiary fluorescencji w czytniku płytek Tecan Infinite M1000 Pro przy wzbudzeniu falą o długości 340 nm i detekcją emisji przy 465 nm na czarnych 96-dołkowych

plytkach z przezroczystym dnem (Greiner). Kontrolę stanowił sam bufor reakcyjny, bufor reakcyjny z wymienionymi wyżej dodatkami bez HSP90-beta i ATP (1,5 mM) oraz bufor reakcyjny z wymienionymi wyżej dodatkami z HSP90-beta, peptydem lub inhibitorem bez ATP. Kalibrację przeprowadzono w równoległych próbkach bez ATP poprzez dodawanie kolejnych porcji 2 nmoli ADP.



Ryc. 3.4. Reakcje zachodzące podczas pomiaru aktywności ATP-azowej HSP90-beta.
PK, kinaza pirogronianowa; LDH, dehydrogenaza mleczanowa

Tabela 3.4. Peptydy z sekwencji SLC6A14 (ATB^{0,+}) stosowane do oznaczania aktywności HSP90-beta

Nazwa	Numery aminokwasów	Sekwencja aminokwasowa
N11	11 – 30	KCRQKEKVTASSENFHVGEN
C1	582 – 601	KIVRAEGNILQRIIKCCRPA
C11	592 – 611	QRIIKCCRPASNWGPYLEKH
C36	617 – 636	KDMAEPAKETDHEIPTISGT

3.5.8. Termoforeza mikroskalowa – MST

W celu potwierdzenia bezpośredniego oddziaływania peptydu C11 z białkiem HSP90-beta przeprowadzono pomiary przy zastosowaniu termoforezy mikroskalowej (MST, ang. MicroScale Thermoforesis). Jest to szybka i precyzyjna metoda, która pozwala na ilościową ocenę interakcji zachodzących pomiędzy ligandem (małą cząsteczką) a badanym białkiem. Fundamentem MST są dwa parametry: zmiana intensywności fluorescencji oraz termoforeza ruchu cząsteczek pod wpływem gradientu temperaturowego zależnego od właściwości molekularnych tych cząsteczek, takich jak wielkości czy ładunek. Parametry te ulegają zmianie w wyniku oddziaływania ligand-cząsteczka, dlatego technika ta jest używana do badania siły tego oddziaływania. Za gradient temperaturowy odpowiada laser podczerwieni, który oddziałuje na

kapilary zawierające badane próbki. Na potrzeby analizy zmianę termoforezy wyraża się jako zmianę znormalizowanej fluorescencji (ΔF_{norm}), która jest zdefiniowana jako stosunek $F_{\text{hot}}/F_{\text{cold}}$ (faza gorąca i zimna) (Jerabek-Willemsen i wsp., 2011).

Pomiarów dokonano przy użyciu aparatu Monolith NT.115 (Nanotemper Technologies), zgodnie z protokołem zapewnionym przez producenta. Do przygotowania doświadczenia użyto rekombinowanego białka HSP90-beta o pełnej długości, znakowanego metką His (His-Tag). Przed przystąpieniem do eksperymentu dokonano wymiany buforu reakcyjnego na PBS, poprzez przepuszczenie białka HSP przez kolumnę A, aby żadne substancje dodatkowe w nim zawarte nie miały wpływu na pomiary fluorescencji. Następnie przeprowadzano reakcję znakowania HSP90-beta znacznikiem fluorescencyjnym His-Tag przy użyciu zestawu Monolith His-Tag Labeling kit RED-tris-NTA 2nd Generation (Nanotemper Technologies). Pomiarów termoforezy dokonywano przy stałym stężeniu znakowanego HSP90-beta (200 nM) i zmiennym stężeniu peptydu (seria rozcieńczeń o zakresie 626 nM - 20,5 mM). Przygotowane próbki, zawierające znakowane białko i peptyd w odpowiednich stężeniach, umieszczano w kapilarach pokrytych powłoką Monolith NT.115 Premium (Nanotemper Technologies) i sczytywano sygnał fluorescencji przy parametrach urządzenia ustawionych na 100% mocy diody LED i 40% mocy MST. Zmianę termoforezy wyrażano jako zmianę znormalizowanej fluorescencji (F_{norm}), wartość tę obliczano z wykresów MST normalizując sygnał po 1,5/2,5/10/15/20 s (faza gorąca – hot region) z sygnałem przed MST (faza zimna – cold region).

3.5.9. Techniki mikroskopowe

3.5.9.1. Immunocytochemia

Komórki, w zależności od linii komórkowej, wysiewano w określonej gęstości na plastikowe 12-dołkowe płytki, zawierające szklane szkiełka nakrywkowe pokryte wcześniej poli-D-lizyną (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Następnego dnia komórki płukano roztworem PBS oraz utrwalano i uprzepuszczeliano poprzez 20 minutową inkubację z zimnym metanolem w temperaturze -20°C . Po tym czasie komórki płukano trzykrotnie po 5 min w PBS i blokowano niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał poprzez dwugodzinną inkubację w 5% roztworze surowicy koziej w PBS w temperaturze pokojowej z delikatnym mieszaniem. Następnie komórki inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi rozpuszczonymi w roztworze do blokowania przez 1 h w temperaturze pokojowej lub przez noc w temperaturze 4°C (stężenia stosowanych przeciwciał – Tabela 3.2.) a nadmiar przeciwciał usuwano poprzez trzykrotne, 10 minutowe, płukanie w PBS z delikatnym mieszaniem. Następnie komórki poddawano godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej z przeciwciałami drugorzędowymi, rozpuszczonymi w roztworze do blokowania

w stosunku 1:500, sprzężonymi z barwnikami fluorescencyjnymi (Alexa 488®, Alexa 568®, Alexa 647®) a nadmiar przeciwciał usuwano tak jak poprzednio poprzez trzykrotne płukanie PBS z delikatnym mieszaniem w temperaturze pokojowej. Tak przygotowane szkiełka nakrywkowe umieszczano na szkiełkach podstawowych w kropli odczynnika ProLong™Diamond Antifade Mountant zawierającym DAPI i poddawano analizie mikroskopowej.

Specyficzność stosowanych przeciwciał sprawdzano poprzez równoczesne przygotowanie szkiełek z komórkami według powyższej procedury z pominięciem inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi.

3.5.9.2. Test ligacji zbliżeniowej (ang. Proximity Ligation Assay, PLA)

Test ligacji zbliżeniowej jest wysoce specyficzną techniką umożliwiającą potwierdzenie istnienia bliskiej/bezpośredniej interakcji białko-białko w odległości nieprzekraczającej 40 nm pomiędzy badanymi białkami lub wykrycie modyfikacji potranslacyjnych białek.

Komórki wysiewano a później kolejno utrwalano, uprzepuszczalniano i blokowano tak jak opisano w Rozdziale 3.5.9.1. Następnie komórki inkubowano przez 1 h z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi rozpuszczonymi w roztworze do blokowania w temperaturze pokojowej z delikatnym mieszaniem. Po trzykrotnym przepłukaniu PBS komórki inkubowano przez 1 h w 37°C, w komorze z dużą wilgotnością i delikatnym mieszaniem, z dwiema różnymi tzw. sondami do PLA (anty-mysią - PLA probe MINUS i anty-króliczą - PLA probe PLUS) przygotowanymi poprzez rozpuszczenie w roztworze blokującym w stosunku 1:5. Następnie, po dwukrotnym płukaniu buforem A (Wash Buffer A) dołączonym do zestawu przez producenta, przeprowadzano proces ligacji, poprzez 30 minutową inkubację komórek w 37°C w komorze z dużą wilgotnością i delikatnym mieszaniem w roztworze zawierającym: 5x stężony bufor ligujący rozcieńczony w wodzie w stosunku 1:5 (Duolink® Ligation buffer) i ligazę (rozcieńczoną 1:40). W kolejnym etapie szkiełka płukano buforem A i poddawano kolejnej inkubacji, tym razem w ciemności przez 100 minut w 37°C w komorze z dużą wilgotnością z roztworem do amplifikacji zawierającym: 0,5 µl polimerazy w 40 µl pięciokrotnie rozcieńzonego w wodzie buforu do amplifikacji (na jedno szkiełko). Po amplifikacji komórki przemywano dwukrotnie przez 10 min 1x stężonym buforem B (Wash Buffer B) również dołączonym przez producenta a następnie 0,01x stężonym buforem B przez 5 minut w temperaturze pokojowej z delikatnym mieszaniem. Szkiełka nakrywkowe, po ostrożnym przepłukaniu w wodzie destylowanej i osuszeniu, umieszczano na szkiełkach podstawowych w kropli odczynnika Duolink® In Situ Mounting Medium z DAPI i przechowywano w ciemności w -20°C przed analizą w mikroskopie konfokalnym.

3.5.9.3. Analiza preparatów w mikroskopie konfokalnym

Analizę preparatów przeprowadzono z wykorzystaniem wysokorozdzielczego mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 800 Airyscan zaopatrzonego w detektory PMT i lasery diodowe. Do zbierania obrazów używano dwóch dostępnych obiektywów immersyjnych: obiektywu o 63-krotnym powiększeniu do analizy standardowych preparatów immunocytochemicznych oraz obiektywu o 40-krotnym powiększeniu dla preparatów z testu ligacji zbliżeniowej (PLA). Fluorescencję barwników używanych do eksperymentów badano z zastosowaniem następujących długości fal świetlnych: wzbudzenie przy 488 nm i emisja przy 495-550 nm dla Alexa Fluor 488, wzbudzenie przy 561 nm i emisja przy 580-640 nm dla Alexa Fluor 568 oraz wzbudzenie przy 405 nm i emisja przy 414-471 nm dla DAPI (barwienie jader komórkowych). Analizę szkiełek z PLA przeprowadzono przy użyciu odczynników Duolink™ In Situ Detection Reagents Orange z następującymi parametrami: wzbudzeniem przy 400 nm i emisją przy 405-490 nm dla DAPI oraz wzbudzeniem przy 561 nm i emisją przy 568-712 nm dla Reagents Orange oraz zgodnie z zaleceniem producenta z zastosowaniem filtra Cyanine 3 (Sigma).

Zbieranie obrazów przeprowadzono stosując to samo powiększenie i moc lasera dla danego zestawu eksperymentalnego. Skrawki optyczne również rejestrowano jednakowo dla konkretnego doświadczenia: dla ICC co 0,3 μm a dla PLA co 0,2 μm .

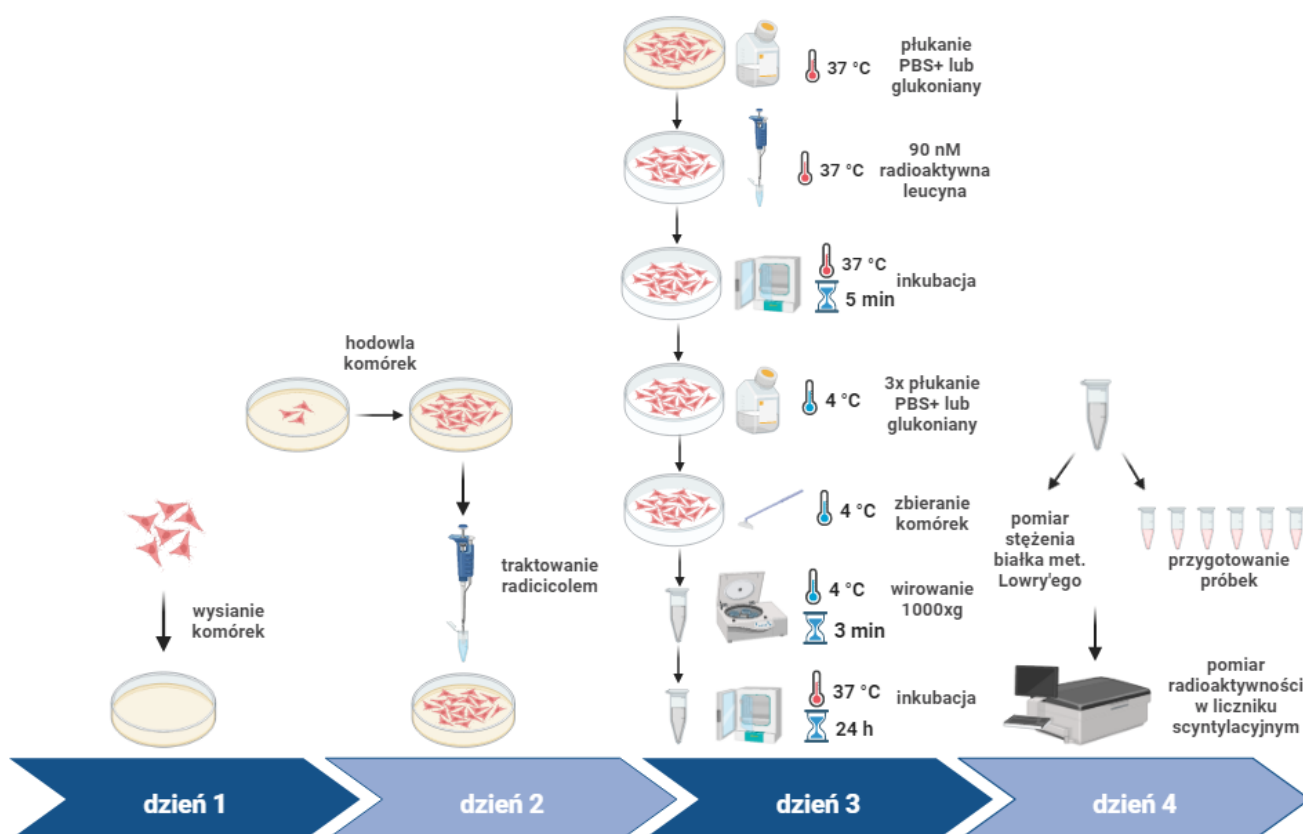
W celu wykonania analizy ilościowej z PLA, czytywano co najmniej 25 różnych pól widzenia. Dalszą obróbkę danych prowadzono z użyciem programu ImageJ/FijiJ. Wartości intensywności fluorescencji czerwonego barwnika w PLA dzielono przez liczbę jąder komórkowych na konkretnym obszarze uzyskując tym samym wartość sygnału PLA przypadającą na pojedynczą komórkę. Analizę statystyczną prowadzono jak opisano w Rozdziale 3.5.12.

3.5.10. Badanie transportu radioaktywnej leucyny

Transport badano w komórkach traktowanych DMSO lub radiciolem, tak jak opisano w Rozdziale 3.5.1. Komórki płukano ogrzanyymi do temp. 37°C roztworem PBS+ lub, w doświadczeniach prowadzonych w nieobecności chloru roztworem glukonianów (skład – Tabela 3.1.). Następnie komórki pokrywano 3 ml PBS+ bądź roztworem glukonianów z dodaną, bezpośrednio przed podaniem do komórek, 90 nM radioaktywną leucyną (5,7 Ci/mmol) (L-[3,4,5-³H(N)]-Leucyna, PerkinElmer) i inkubowano przez 5 minut w 37°C. Po tym czasie roztwór radioaktywnej leucyny usuwano a komórki płukano 3 krotnie zimnym roztworem PBS+ lub glukonianów i zbierano również w tych samych zimnych roztworach. W kolejnym etapie komórki wirowano przez 3 min przy 1000 × g w 4°C a powstały osad rozpuszczano w 1 ml 0,1% NaOH, 2% Na₂CO₃, 1% SDS i inkubowano przez noc w 37°C (Ryc. 3.5.).

Następnego dnia dokonywano pomiaru stężenia białka metodą opisaną w Rozdziale 3.5.3.2. i przygotowywano próbki zawierające 800 µl lizatu zmieszane z 3,1 ml koktajlu scyntylicyjnego (Ultima Gold, Packard). Pomiaru radioaktywności dokonywano w liczniku scyntylicyjnym (Beckman LS6500 Multi-Purpose Scintillation Counter).

Ilość zgromadzonej w komórkach radioaktywnej leucyny obliczano na podstawie otrzymanych pomiarów radioaktywności: roztworu wyjściowego leucyny oraz lizatów komórek w przeliczeniu na 1 mg białka.



Ryc. 3.5. Schemat transportu radioaktywnej leucyny w komórkach nowotworowych.

3.5.11. Badanie przeżywalności komórek – analiza cytotoksyczności z użyciem zestawu CellTox™ Green

Cytotoksyczny efekt testowanych związków został zbadany przy pomocy kitu CellTox™ Green cytotoxicity assay (Promega), zawierającego barwnik wiążący się do DNA komórek z uszkodzoną błoną komórkową - CellTox™ Green. Procedurę przeprowadzano według protokołu Endpoint Method dostarczonego przez producenta. W skrócie, na 96-dółkowe sterylne czarne płytki z przezroczystym dnem, wysiewano 5000 komórek na dółek i po upływie 24h wymieniało im pożywkę na 100 µl świeżej z dodanymi związkami

(wskazanymi w legendzie ryciny) na kolejne 24h. Po tym czasie, do obecnej w dołkach pożywki, dodawano 100 μ l barwnika CellToxTM Green, rozcieńczonego w dołączonym przez producenta buforze (Assay Buffer) w stosunku 1:500. Płytkę wytrząsano 1 min i inkubowano 15 min w temperaturze pokojowej, następnie mierzono fluorescencję przy wzbudzeniu falą o długości 485 nm i detekcję emisji przy 520 nm w czytniku płytek Tecan Infinite M1000 Pro.

Cytotoksyczność obliczano z różnicy średniej wartości fluorescencji populacji żywych komórek i średniej wartości fluorescencji populacji martwych komórek podzielonej przez odchylenie standardowe kontroli nie zawierającej komórek, według protokołu producenta.

3.5.12. Analiza statystyczna

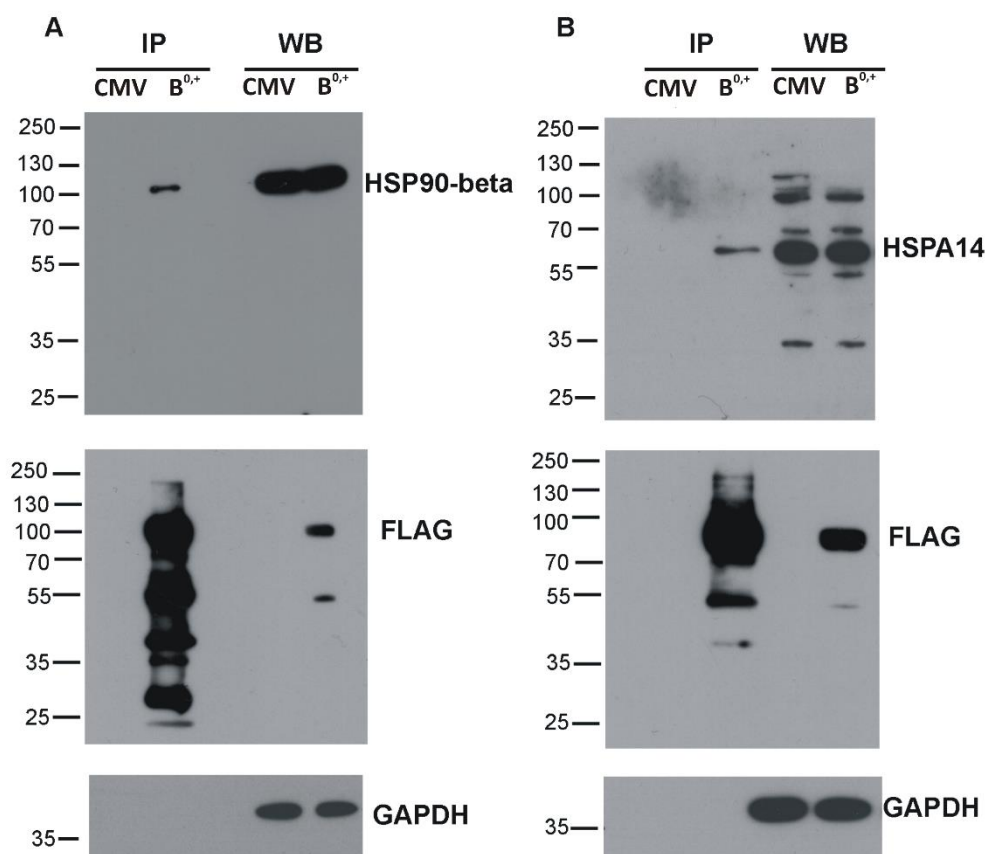
W doświadczeniach, w których możliwe było wykonanie analizy ilościowej obliczano średnią arytmetyczną wraz z uwzględnieniem odchylenia standardowego z co najmniej trzech niezależnych powtórzeń danego eksperymentu. Analizę przeprowadzano w programie GraphPad Prism6, stosując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z poprawką Tuckey'a, umożliwiającą wielokrotne porównania. W przypadku dwóch układów doświadczalnych stosowano niesparowany t-test z poprawką Welcha. Próg istotności statystycznej przyjęto na poziomie $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Oddziaływanie SLC6A14 z białkami szoku cieplnego (HSP)

Jak podano w Rozdziale 1.3.1., SLC6A14 jest wbudowany do błony siateczki śródplazmatycznej kotranslacyjnie, a stopień jego uglikozylowania i pofałdowania jest kontrolowany przez lektyny - chaperony funkcjonujące w świetle siateczki: kalneksynę i kalretyninę. W minionych latach zaczęło pojawiać się coraz więcej danych potwierdzających, iż kontrola procesu fałdowania białek transbłonowych może zachodzić również po cytoplazmatycznej stronie siateczki śródplazmatycznej. Wykazano, że cytozolowe C – końce dwóch białek transbłonowych, czyli receptora adenylnowego - A(2A) (Keuerleber i wsp., 2011) oraz innego członka rodziny SLC6, transportera serotoniny (SERT, z ang. serotonin transporter) (El-Kasaby i wsp., 2014) oddziałują z cytozolowymi białkami szoku cieplnego przed związaniem coatomeru II (COPII) i opuszczeniem siateczki śródplazmatycznej. Jak podano we Wstępie (Rozdział 1.3.1.) analiza potencjalnych partnerów białkowych SLC6A14 przeprowadzona w naszym laboratorium wykryła m.in. białka opiekuńcze. Chociaż stanowiły one tylko 4,7% białek oddziałujących z SLC6A14, wśród nich znajdowały się białka należące do rodzin HSP90 i HSP70, a konkretnie HSP90-beta i HSP70 kodowane przez gen HSPA14 (Tabela 1.3.).

W związku z wymienionymi wyżej danymi postanowiliśmy zweryfikować możliwość bezpośredniego oddziaływania SLC6A14 z tymi białkami. Przeprowadziliśmy analizę metodą immunoprecypitacji. Doświadczenia wykonano na komórkach HEK293 stabilnie transfekowanych wektorami: p3xFLAG-CMV14/B^{0,+} (B^{0,+}) lub p3xFLAG-CMV14 (CMV) - kontrola. Otrzymane ekstrakty białkowe poddawano metodzie immunoprecypitacji (Rozdział 3.5.5.) z zastosowaniem złoża EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel a następnie analizie western blot z wykorzystaniem przeciwciał anty-HSP90-beta lub anty-HSPA14 oraz przeciwciałem anty-FLAG stanowiącym kontrolę transfekcji. Jak pokazano na Rycinie 4.1., oba białka, zarówno HSP90-beta jak i HSPA14 koprecypitują z SLC6A14.

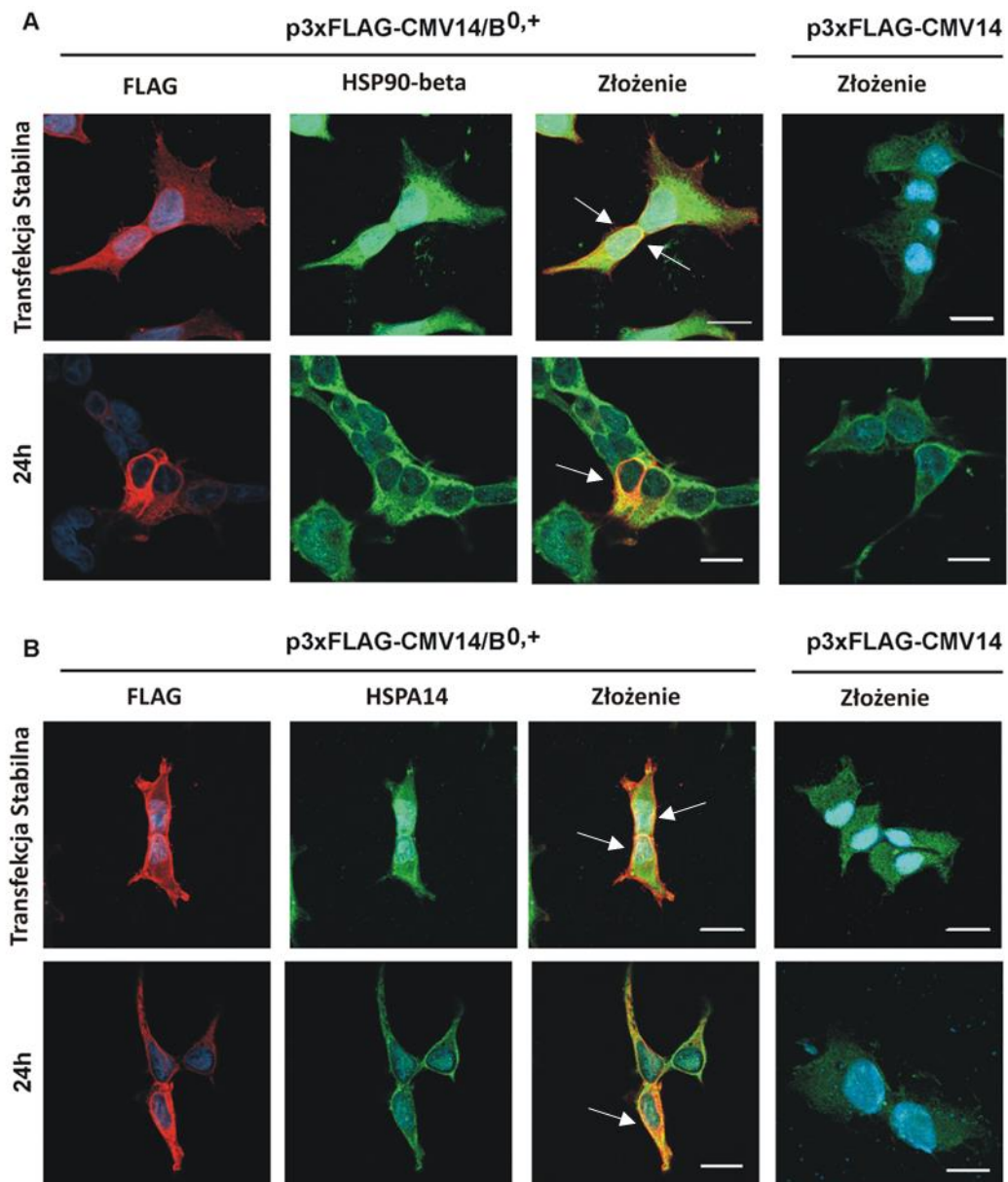


Ryc. 4.1. Wykrycie możliwych interakcji pomiędzy SLC6A14 a HSP90-beta lub HSPA14. Komórki HEK293 poddano stabilnej transfekcji wektorami p3xFLAG-CMV14 (CMV) lub p3xFLAG-CMV14/B⁰⁺ (B⁰⁺), jak opisano w Rozdziale 3.5.2.1., a po lizie ekstrakty poddano immunoprecypitacji z użyciem EZview ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel. Ekstrakty zawierające 800 lub 600 µg białka wykorzystano do immunoprecypitacji (IP) w celu wykrycia odpowiednio HSP90-beta (A) lub HSPA14 (B). Całkowite ekstrakty (5 µg w A i 20 µg w B) analizowano metodą western blot (WB). Skuteczność immunoprecypitacji zweryfikowano za pomocą przeciwciała anty-FLAG. GAPDH analizowano jako kontrolę ilości białka nałożonego na żel. Przedstawiono reprezentatywne bloty z 3 niezależnych eksperymentów.

4.2. Kontrola procesu fałdowania SLC6A14 w siateczce śródplazmatycznej przez HSP90-beta i HSPA14

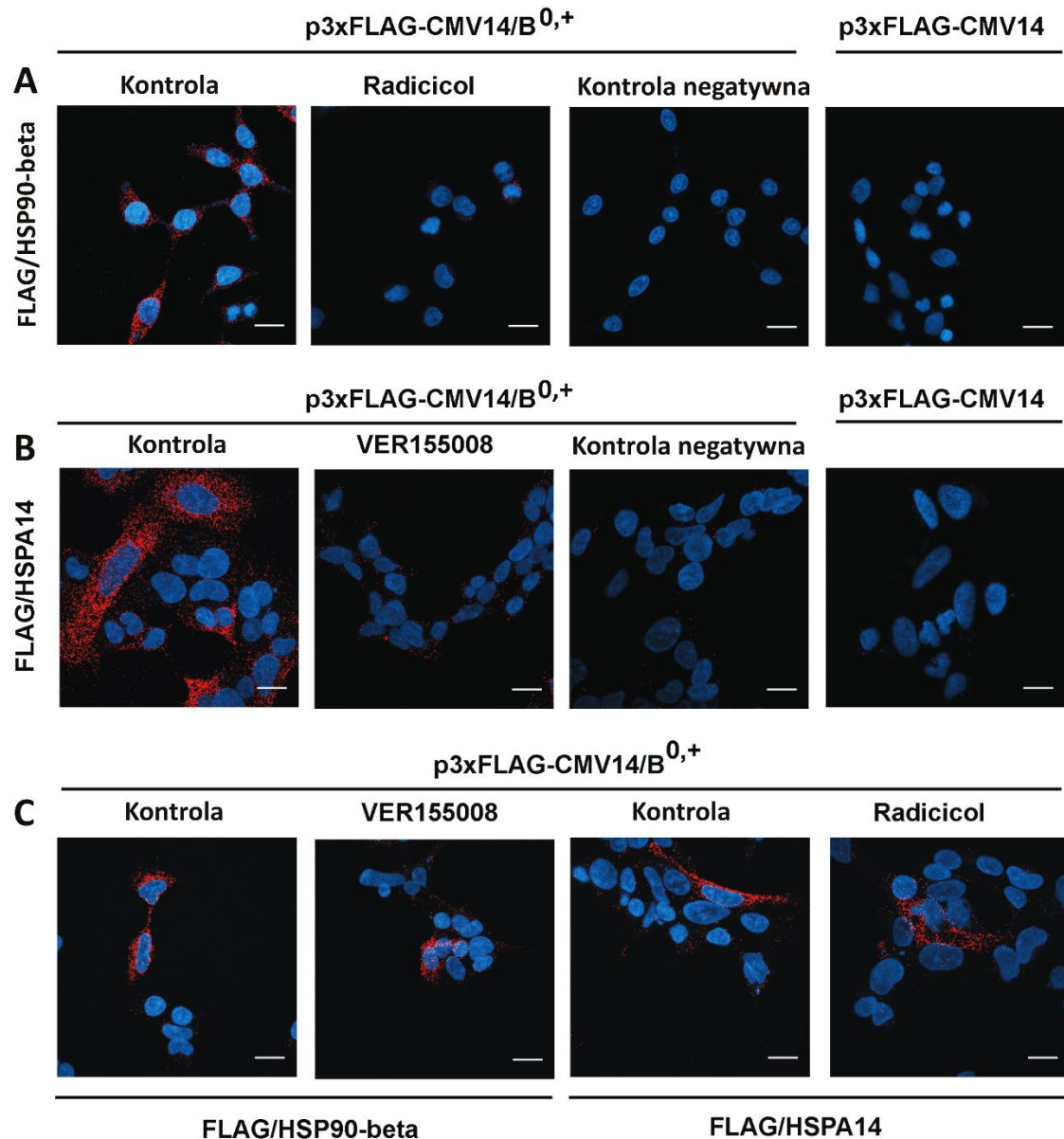
Po wykryciu oddziaływania białka SLC6A14 z HSP90-beta i HSPA14 postanowiono wykonać znakowanie immunofluorescencyjne (Rozdział 3.5.9.1.), w celu sprawdzenia możliwości kolokalizacji tych białek. Znakowanie przeprowadzono na komórkach HEK293 transfekowanych stabilnie lub przejściowo wektorem p3xFLAG-CMV14/B⁰⁺ lub p3xFLAG-CMV14 (kontrola transfekcji). Wykazało ono, że oba białka kolokalizują z SLC6A14 a największy

sygnał obserwowano w pobliżu jądra komórkowego (białe strzałki na Ryc. 4.2.). Dodatkowo, kolokalizacja ta była silniejsza, gdy analizę przeprowadzano 24 h po transfekcji. Zaobserwowano, że po przejściowej transfekcji, większość transportera znajduje się na terenie cytoplazmy, podczas, gdy w stabilnie transfekowanych komórkach sygnał pochodzący od przeciwciała anty-FLAG (przeciwciała wykrywające ATB^{0,+}) jest widoczny głównie w błonie plazmatycznej (Ryc. 4.2.). Z wcześniejszych analiz, wykonanych w naszym zespole (Kovalchuk i wsp., 2019), w których przeprowadzono doświadczenia z markerami: siateczki śródplazmatycznej (kalneksyną) oraz części *trans* aparatu Golgi'ego (TGN38), wynika, że 24 h po transfekcji białko SLC6A14 znajduje się głównie w siateczce. Dzięki tej obserwacji możemy stwierdzić, że do interakcji SLC6A14 zarówno z HSP90-beta, jak i HSPA14 dochodzi podczas fałdowania transportera w siateczce śródplazmatycznej.



Ryc. 4.2. Znakowanie immunofluorescencyjne SLC6A14 oraz białek HSP pokazujące ich lokalizację w komórkach HEK293. Komórki transfekowano wektorami p3xFLAG-CMV14 lub p3xFLAG-CMV14/B^{0,+} (Rozdział 3.5.2.) a następnie analizowano lokalizację wyżej wymienionych białek w stabilnie transfekowanych komórkach lub 24 h po transfekcji (transfekcja przejściowa). W tym celu komórki utrwalono, uprzepuszczelniono oraz wybarwiono przeciwciałami pierwszorzędowymi anti-FLAG (SLC6A14), anti-HSP90-beta oraz anti-HSPA14, a następnie przeciwciałami drugorzędowymi skierowanymi przeciwko mysiemu IgG wyznakowanymi Alexa568 (SLC6A14) oraz przeciwko króliczemu IgG i wyznakowanymi Alexa488 (HSP). Dodatkowo wybarwiono jądra komórkowe przy pomocy DAPI. Analizę przeprowadzono przy pomocy mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM800 Airyscan i obiektywu o powiększeniu 63x. Przedstawiono reprezentatywne zdjęcia wybrane z jednego z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. Białe strzałki wskazują odpowiednio na miejsca kolokalizacji SLC6A14/HSP90-beta i SLC6A14/HSPA14. Skala 20 μ m.

Powszechnie wiadomo, że w badaniach kolokalizacji można określić współwystępowanie dwóch lub więcej białek na tym samym obszarze w komórce, ale analiza ta, podobnie jak immunoprecypitacja nie dowodzi istnienia bezpośredniej interakcji między nimi. Dlatego, aby sprawdzić czy między badanymi przez nas białkami dochodzi do bezpośredniej interakcji zastosowaliśmy test ligacji zbliżeniowej - PLA (Rozdział 3.5.9.2.), ponieważ pozwala on na wykrycie dwóch białek zlokalizowanych nie dalej niż 40 nm od siebie. Jak pokazuje Ryc. 4.3., detekcja sygnału była możliwa tylko po zastosowaniu dwóch przeciwciał pierwszorzędowych, tj. FLAG i HSP90-beta lub FLAG i HSPA14, nie obserwowano natomiast sygnału, gdy pominięto ten krok (kontrola negatywna) oraz po transfekcji komórek wektorem p3xFLAG-CMV14 bez wstawki, ponieważ wtedy SLC6A14 nie ulegał nadekspresji w komórkach. Postanowiliśmy sprawdzić również, czy zahamowanie obu badanych białek HSP będzie mieć wpływ na wykrytą interakcję. W tym celu zastosowaliśmy dwa inhibitory: radicicol, o którym wiadomo, że hamuje HSP90 (Schulte i wsp., 1998) oraz VER155008 hamujący HSPA14 (Massey i wsp., 2010). Oba związki dodawano w stężeniach odpowiednich do zahamowania HSP90 (Falsone i wsp., 2005) i HSPA14 (Minoia i wsp., 2014) w komórkach HEK293 (wskazanych w legendzie Ryciny 4.3.). Wykazano, że traktowanie komórek, z nadekspresją SLC6A14, racicicolem silnie zmniejszyło liczbę czerwonych kropek, które świadczą o interakcji transportera z HSP90-beta (Ryc. 4.3A) a traktowanie drugim inhibitorem, VER155008 zmniejszyło sygnał wskazujący na interakcję z HSPA14 (Ryc.4.3B). Obserwacje te wskazują, że do bezpośredniej interakcji transportera z białkami HSP dochodzi, gdy są one w stanie aktywnym i posiadają wolne miejsca wiązania ATP. Dodatkowo, na Ryc. 4.3C pokazano, że inhibitory nie wpływają na test sam w sobie, ponieważ obserwowaliśmy interakcję SLC6A14/HSP90-beta po dodaniu VER155008 oraz interakcję SLC6A14/HSPA14 w obecności radicicolu.

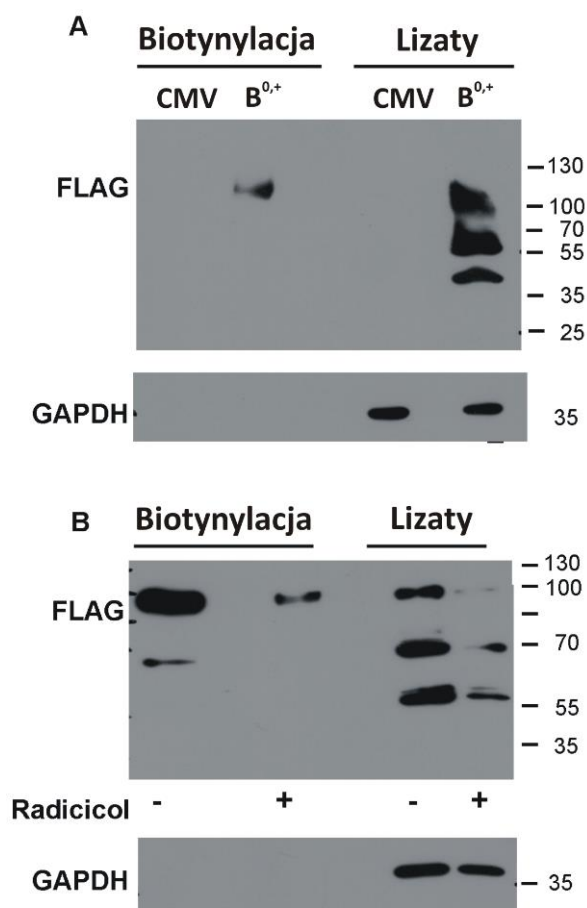


Ryc. 4.3. Test ligacji zbliżeniowej (PLA) – wykrywanie interakcji pomiędzy SLC6A14 i białkami HSP. Komórki poddawano transfekcji przejściowej wektorem p3xFLAG-CMV14 lub p3xFLAG-CMV14/B^{0,+} na 24 h tak jak opisano w Rozdziale 3.5.2.2., w tym samym czasie do komórek dodawano również inhibitory HSP lub DMSO (kontrola). Radicolol (20 μ M) zastosowano do zahamowania HSP90-beta (A) a VER155008 (50 μ M) do zahamowania aktywności HSPA14 (B). Dodatkowo wykonano eksperymenty kontrolne pokazujące, że dodanie VER155008 nie wpływa na interakcję SLC6A14/HSP90-beta a radicololu na interakcję SLC6A14/HSPA14 (C). Po transfekcji i traktowaniu odpowiednim inhibitorem komórki poddawano procedurze PLA (Rozdział 3.5.9.2.). Reprezentatywne obrazy z mikroskopu konfokalnego pokazują miejsca oddziaływania transportera odpowiednio z HSP90-beta lub HSPA14 widoczne jako czerwone kropki – sygnał PLA. Jądra komórkowe wyznakowano przy pomocy DAPI. Kontrolę negatywną, dla sygnału PLA, stanowiły komórki HEK293 wyznakowane z pominięciem przeciwciał pierwszorzędowych. Skala 20 μ m, n=3.

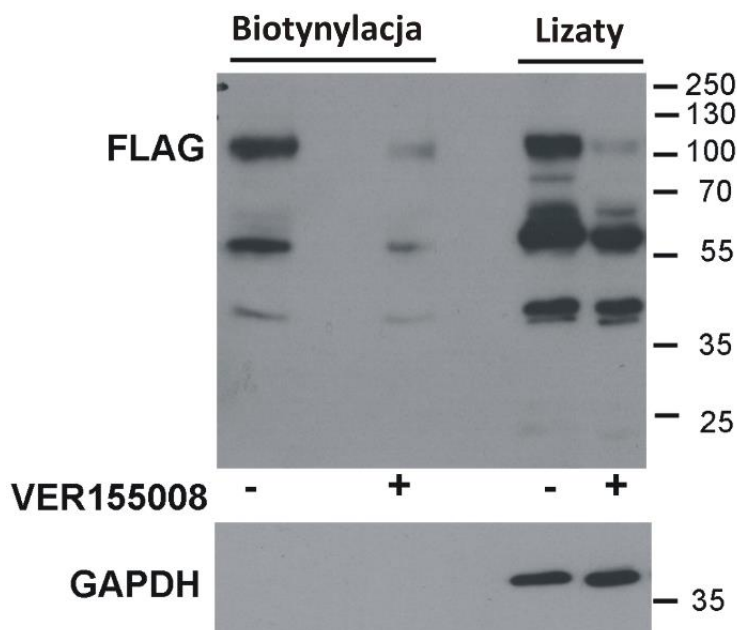
4.3. Wpływ inhibitorów białek HSP na ilość ATB^{0,+}/SLC6A14 w błonie komórkowej linii HEK293

W celu sprawdzenia czy zahamowanie interakcji SLC6A14 z białkami HSP po podaniu inhibitorów, w transfekowanych komórkach HEK293, wiązało się również ze zmianą ilości transportera w błonie komórkowej, przeprowadzono biotynylację białek powierzchniowych komórek. Eksperymenty wykonano z użyciem nieprzechodzącego przez błonę komórkową odczynnika biotynylującego (Rozdział 3.5.6.).

Nadekspresja SLC6A14 z metką FLAG skutkuje pojawieniem się kilku pasm, których nie wykryto w komórkach HEK293 transfekowanych plazmidem CMV bez wstawki (Ryc. 4.4A). Jak wykazano wcześniej (Kovalchuk i wsp., 2019), pasma te reprezentują transporter w różnych stanach glikozylacji oraz nieglikozylowane białko. W pełni uglikozylowane pasmo migrujące w okolicach 100 000 M_r można wykryć na powierzchni komórki jako białko biotynylowane. Po traktowaniu radicolem poziom transportera na powierzchni komórki (frakcja biotynylowana) zmniejszył się o 85±4%, co wynikało ze spadku całkowitej ilości SLC6A14 w komórce (Ryc. 4.4B). Analogiczną serię eksperymentów przeprowadzono z zastosowaniem VER155008. Podobnie jak w przypadku radicolu, zaobserwowano silny (88±7%) spadek całkowitej ilości transportera biotynylowanego (Ryc. 4.5.).



Ryc. 4.4. Wpływ inhibitora HSP90-beta na ilość białka SLC6A14 w błonie komórkowej. (A) Komórki HEK293 transfekowano plazmidem p3xFLAG-CMV14 (CMV) lub p3xFLAG-CMV14/B^{0,+} (B^{0,+}). Następnie po 24 godzinach przeprowadzono biotynylację białek powierzchniowych, zgodnie z metodą opisaną w Rozdziale 3.5.6. SLC6A14 wykrywano metodą immunoblotingu (Rozdział 3.5.4.2.) przy pomocy przeciwciała anty-FLAG. Frakcja biotynylowana oznacza frakcję SLC6A14 będącą w błonie komórkowej a frakcja lizatów oznacza całkowitą ilość transportera w lizacie komórkowym. (B) Komórki HEK293 transfekowane plazmidem ze wstawką p3xFLAG-CMV14/B^{0,+} traktowano, tam gdzie zaznaczono, DMSO (kontrola) lub 20 μ M radicicolem przez 24 h, a obecność SLC6A14 wykrywano przeciwciałem anty-FLAG zarówno w lizacie, jak i frakcji biotynylowanej. Przedstawiono reprezentatywne bloty z 3 niezależnych eksperymentów. GAPDH stanowi kontrolę czystości frakcji biotynylowanej.

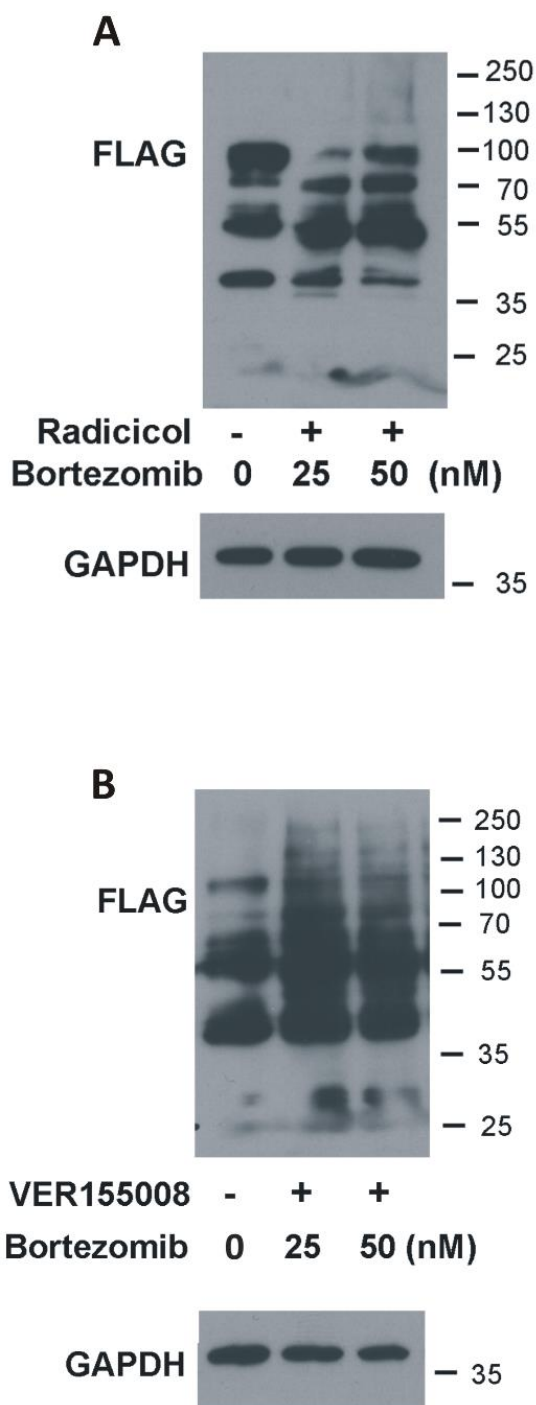


Ryc. 4.5. Wpływ inhibitora HSPA14 na ilość białka SLC6A14 w błonie komórkowej. Komórki HEK293 transfekowane wektorem ze wstawką p3xFLAG-CMV14/B^{0,+} poddawano działaniu DMSO lub 50 μ M VER155008. Po 24 godzinach przeprowadzano biotynylację białek powierzchniowych, tak jak opisano w Rozdziale 3.5.6., a lizaty i frakcję biotynylowaną, eluowaną ze złoża agarozowego sprzężonego z awidyną, poddano analizie western blot (Rozdział 3.5.4.2.) z przeciwciałem anti-FLAG. Przedstawiono reprezentatywne bloty z 3 niezależnych eksperymentów. GAPDH stanowi kontrolę czystości frakcji biotynylowanej.

4.4. Analiza poziomu białka ATB^{0,+}/SLC6A14 po zastosowaniu inhibitora proteasomu – bortezomibu

Nowo syntetyzowane białka podlegają ścisłej kontroli jakości, w celu eliminacji niesfałdowanych lub źle sfałdowanych białek. Aby uchronić komórki przed akumulacją toksycznych agregatów białkowych niektóre nieprawidłowo sfałdowane cząsteczki stają się substratami dla degradacji białek związanej z siateczką śróplazmatyczną (Oakes i Papa, 2015). Na podstawie naszych wcześniejszych wyników, chcieliśmy zweryfikować, czy opisane w Rozdziale 4.3., zmniejszenie ilości SLC6A14 po traktowaniu inhibitorami HSP może być efektem skierowania transportera na szlak degradacji po zahamowaniu procesu fałdowania białka. W związku z tym przeprowadzono doświadczenia, gdzie komórki HEK293 po nadekspresji, traktowano radicicolem lub VER155008 wraz z rosnącymi stężeniami inhibitora proteasomu – bortezomibu (PS-341) (Adams i wsp., 1999). Poziom ATB^{0,+} analizowano metodą western blot (Rozdział 3.5.4.2.), 24 h po transfekcji, w komórkach transfekowanych przejściowo (Rozdział 3.5.2.2.). Jak pokazano na Rycinie 4.6A, pasmo SLC6A14 migrujące z najniższą ruchliwością elektroforetyczną prawie zanikło

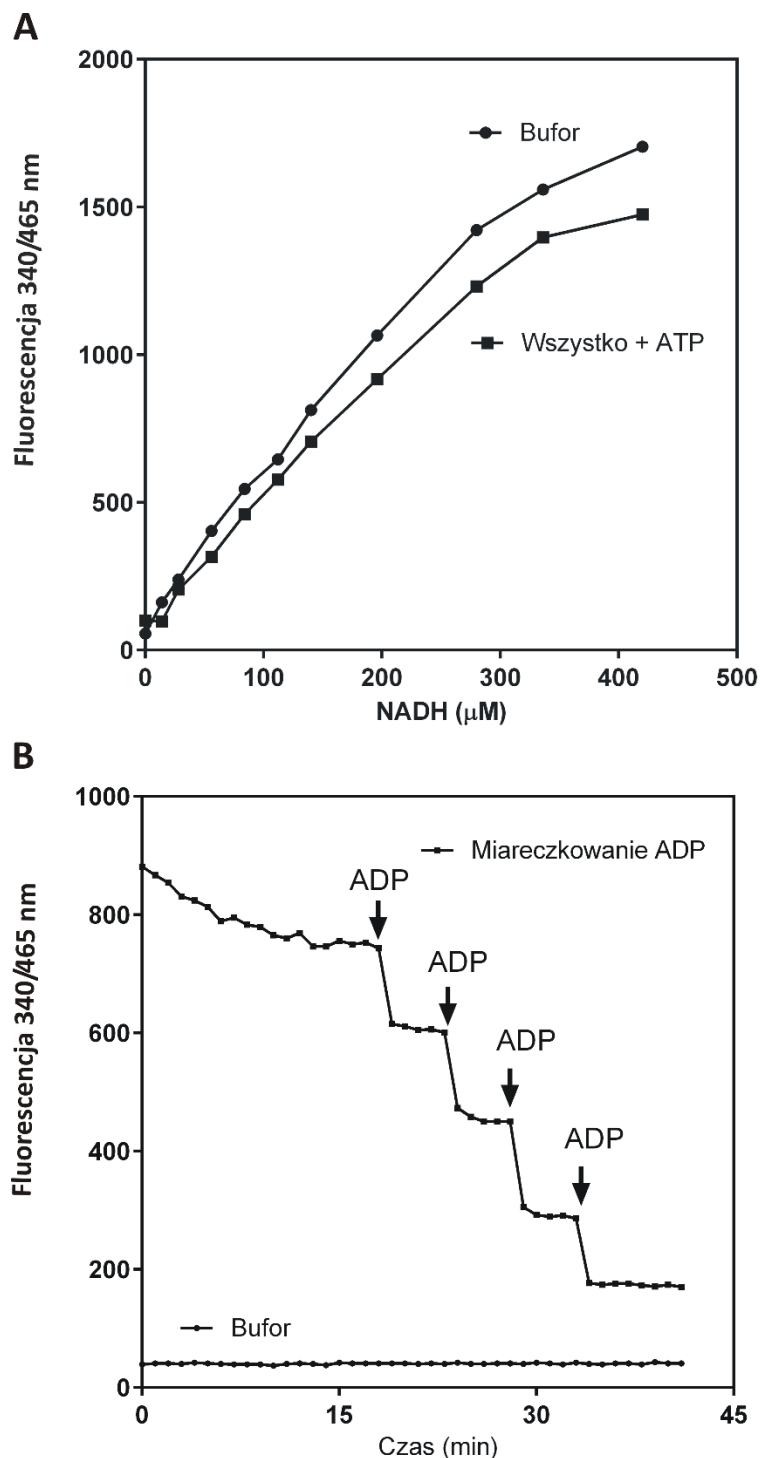
w obecności radicicolu, a jego poziom wzrastał wraz ze wzrostem stężenia bortezomibu, chociaż nie osiągał tego samego poziomu co pasmo w warunkach kontrolnych. Analogicznie, w przypadku inhibitora VER155008, zahamowanie proteolizy proteasomalnej podobnie jak poprzednio skutkowało zwiększoną ilością sygnału FLAG, wykrywanego głównie jako nieglikozylowane białko i rdzeniowa forma glikozylowana (Ryc. 4.6B).



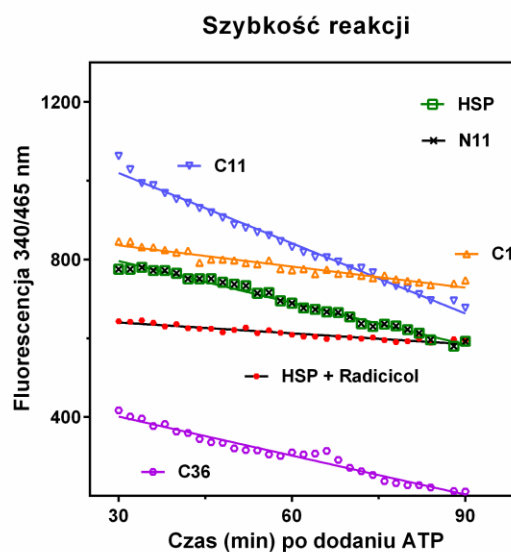
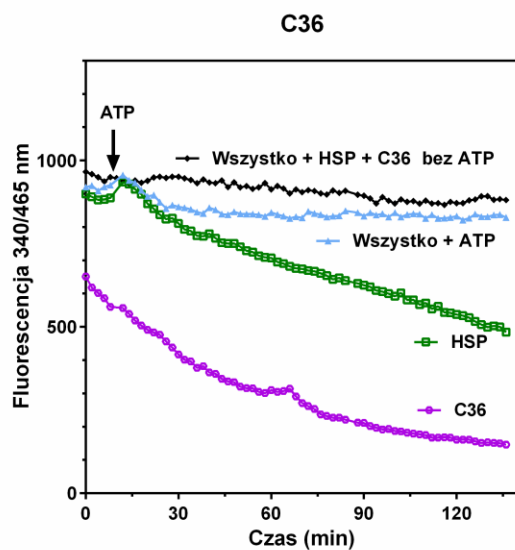
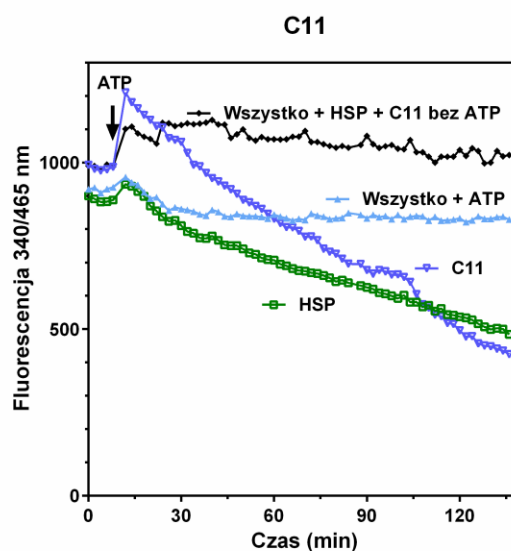
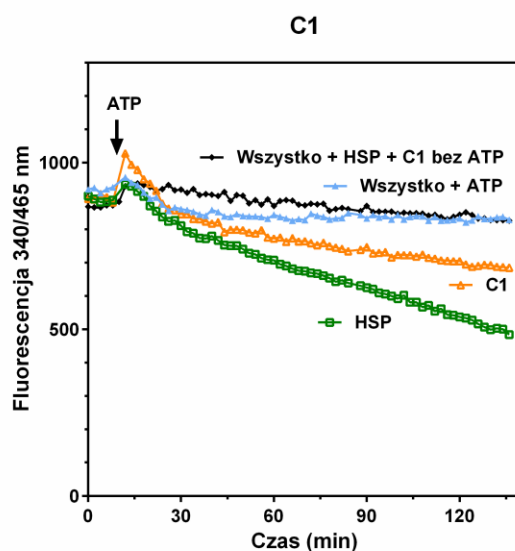
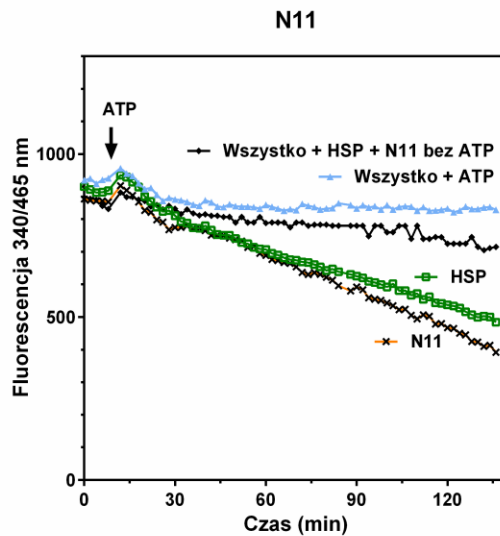
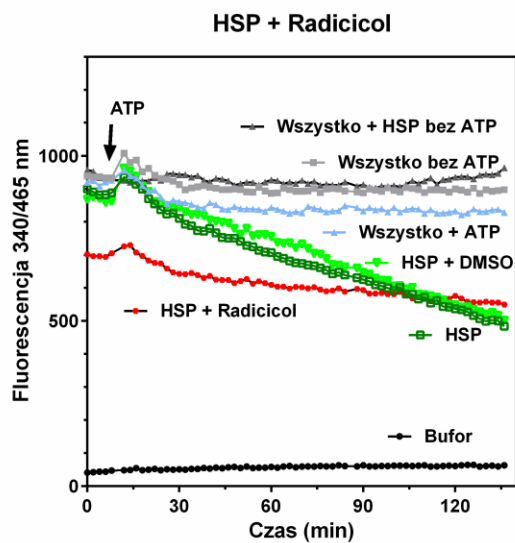
Ryc. 4.6. Wpływ inhibitora proteasomu – bortezomibu na poziom ATB^{0,+}/SLC6A14. (A) Komórki HEK293 transfekowane plazmidem ze wstawką p3xFLAG-CMV14/B^{0,+} traktowano, tam gdzie zaznaczono: DMSO (kontrola), 20 μM radicicolem lub 20 μM radicicolem i jednocześnie wskazanym stężeniem bortezomibu przez 24 h. Ilość SLC6A14 analizowano metodą immunoblotingu (Rozdział 3.5.4.2.) z przeciwciałem anti-FLAG. (B) Komórki HEK293 transfekowano p3xFLAG-CMV14/B^{0,+} i traktowano DMSO, 50 μM VER155008, albo, tam gdzie zaznaczono, 50 μM VER155008 i wskazanym stężeniem bortezomibu przez 24 h, a SLC6A14 wykrywano przeciwciałem anti-FLAG. Przedstawiono reprezentatywne bloty z 3 niezależnych eksperymentów. GAPDH stanowi kontrolę ilości białka nałożonego na żel.

4.5. Oddziaływanie C – końca białka SLC6A14 z HSP90-beta

Chcąc sprawdzić, czy interakcja pomiędzy HSP90-beta i SLC6A14 może modyfikować aktywność białka szoku cieplnego przeprowadzono test *in vitro*, mierzący aktywność ATPazy rekombinowanego i oczyszczonego HSP90-beta zgodnie z metodą z Rozdziału 3.5.7. Test ten łączy ilość utworzonego ADP z utlenianiem NADH. Jak pokazano na Ryc. 4.7A, wykrywanie NADH jest liniowe do stężenia 400 μ M. Zastosowanie miareczkowania ADP (Ryc. 4.6B) pozwoliło na wyrażenie zmiany intensywności fluorescencji w wartościach bezwzględnych. Aby ustalić, która część białka SLC6A14 może być odpowiedzialna za interakcję z HSP90-beta, użyliśmy peptydów odpowiadających fragmentom sekwencji aminokwasowej z N- lub C-końca transportera (Tabela 3.4.). Ryc. 4.8. (lewy górny panel) pokazuje, że aktywność ATPazy HSP90-beta jest liniowa, nie ulega zmianie po dodaniu DMSO (kontrola dla radicicolu) i jest hamowana przez radicicol. Wszystkie badane peptydy nie zmieniały pomiarów fluorescencji, gdy nie dodawano ATP. Peptydy N11 i C36 nie miały wpływu na aktywność ATPazy, podczas gdy dwa inne peptydy (C1 i C11), odpowiadające fragmentom SLC6A14 zlokalizowanym bliżej 12 domeny transbłonowej, wpływały na tę aktywność, choć w przeciwny sposób. Dodanie peptydu C1 hamowało aktywność ATPazową białka HSP90-beta a C11 tę aktywność zwiększało. Jak pokazano na Ryc. 4.8., (panel „szybkość reakcji”) i 4.9A, peptyd C1 hamuje reakcję o 40%, podczas gdy peptyd C11 aktywuje szybkość reakcji HSP90-beta o 50%. Szybkość reakcji analizowano za pomocą regresji liniowej.

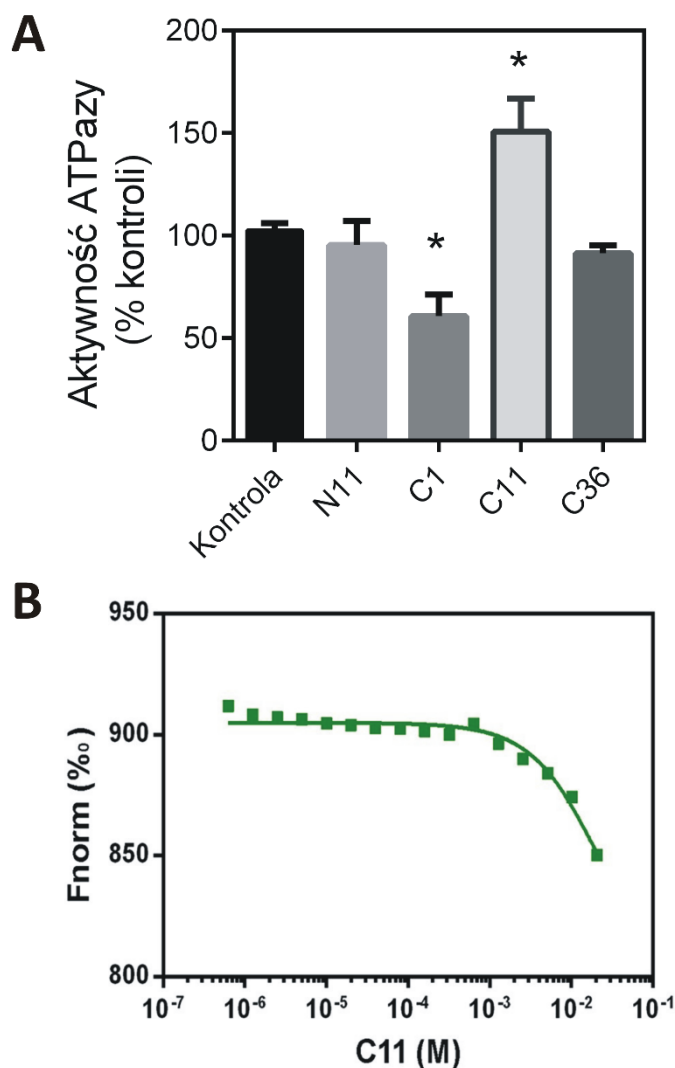


Ryc. 4.7. Miareczkowanie NADH i ADP do testu aktywności ATPazy. Fluorescencję mierzono w czytniku płytek Tecan Infinite M1000 Pro, na czarnych 96-dołkowych płytkach z przezroczystym dnem. Stosowano długość fali 340 nm do wzbudzenia oraz 465 nm do detekcji emisji. Objętość reakcji wynosiła 100 µl. (A) Pomiary fluorescencji przy wskazanych stężeniach NADH w buforze testowym: 20 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 100 mM Tris, pH 7,6 (Bufor) lub w tym samym buforze uzupełnionym 2,4 mM fosfoenolopirogronianem, 24,5÷42,0 U/ml kinazą pirogronianową, 45 U/ml dehydrogenazą mleczanową (Wszystko + ATP). (B) Pomiary fluorescencji po dodaniu 2 nmol porcji ADP do bufora zawierającego wszystkie składniki jak w (A) i 196 µM NADH.



Ryc. 4.8. Aktywność ATPazy HSP90-beta mierzona w obecności peptydów wybranych z sekwencji aminokwasowej SLC6A14. Aktywność rekombinowanego oczyszczonego HSP90-beta (2 μg na test) mierzono w teście reakcji enzymatycznych połączonych z utlenianiem NADH, a następnie pomiarami fluorescencji, jak opisano w Rozdziale 3.5.7. Bufor reakcyjny uzupełniono fosfoenolpirogronianem, kinazą pirogronianową, dehydrogenazą mleczanową i 196 μM NADH (wszystko), a reakcję rozpoczynano przez dodanie ATP. Reakcję śledzono w warunkach kontrolnych (HSP), po dodaniu 548 μM radicicolu lub peptydów (1 mg każdy) wymienionych w Tabeli 3.4. Panel "Szybkość reakcji" przedstawia wyniki regresji liniowej szybkości reakcji. Wszystkie panele przedstawiają wyniki reprezentatywnego eksperymentu z 5 niezależnych pomiarów aktywności HSP90-beta.

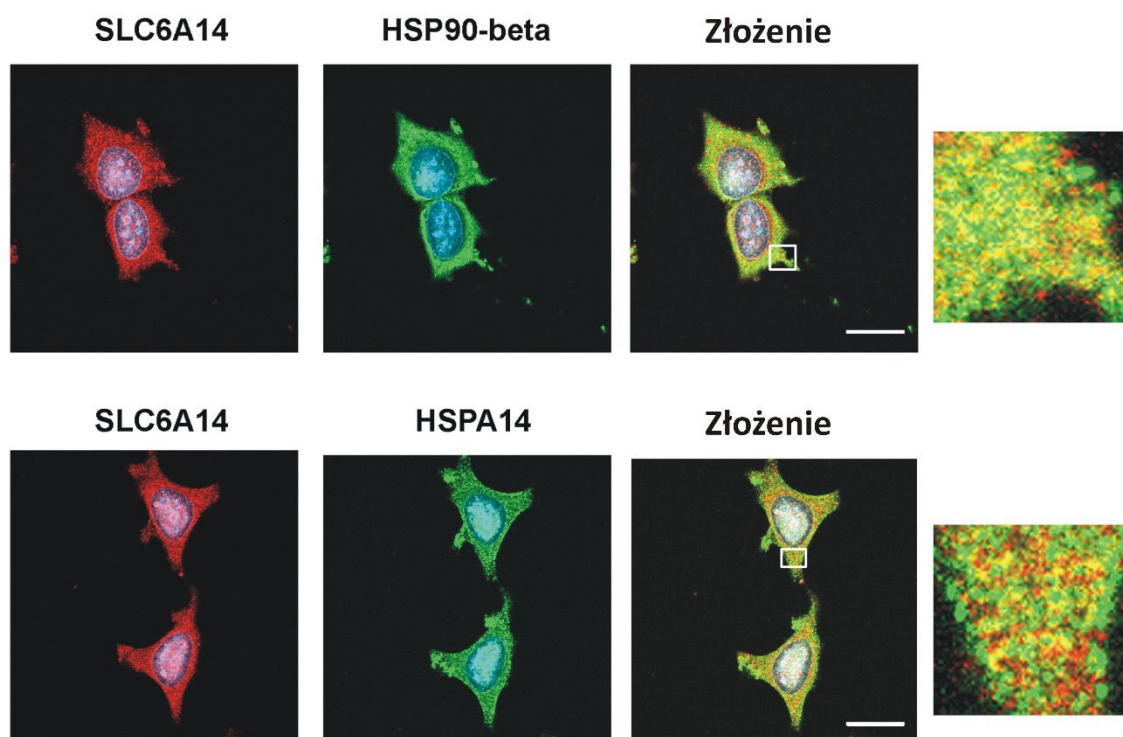
Aby sprawdzić, czy peptyd C11 może wiązać się bezpośrednio z HSP90-beta, zastosowaliśmy termoforezę mikroskalową – MST (Rozdział 3.5.8.) (Wienken i wsp., 2010). Choć rozpuszczalność peptydu nie pozwoliła na osiągnięcie wyższych stężeń, to obserwowany spadek fluorescencji (Ryc. 4.9B) dla najwyższych zastosowanych stężeń peptydu wskazuje na bezpośrednie wiązanie C11 do HSP90-beta ze stałą dysocjacji wiązania (K_D) w zakresie 7 - 12 mM, co jest wartością najprawdopodobniej zawyżoną ze względu na brak ko-czaperonów.



Ryc. 4.9. Wpływ peptydów wybranych z N – i C – końca SLC6A14 na aktywność ATPazy HSP90-beta. (A) Zmierzono aktywność HSP90-beta, jak pokazano na Ryc. 4.8. w nieobecności lub obecności wskazanych peptydów. Słupki przedstawiają średnie szybkości reakcji ATPazy \pm SD ($n=5$), wyrażone jako procent odpowiedniej kontroli, równe $22,9 \pm 0,9$ nmol ADP/mg białka/min. * - gwiazdki wskazują znaczącą zmianę w stosunku do aktywności kontrolnej. Przyjęto próg istotności statystycznej na poziomie $p<0,05$. (B) Termoforeza mikroskalowa - pomiar interakcji pomiędzy HSP90-beta znakowanym fluorescencyjnie a różnymi stężeniami peptydu C11. Serie rozcieńczeń niefluorescencyjnego ligandu powodują stopniową zmianę termoforezy, która została wyrażona jako %Fnorm w celu uzyskania krzywej niezbędnej do wyliczenia stałej dysocjacji wiązania (K_D). Wykres przedstawia wyniki jednego z 3 niezależnych pomiarów z wartościami po 10s (faza gorąca – hot region).

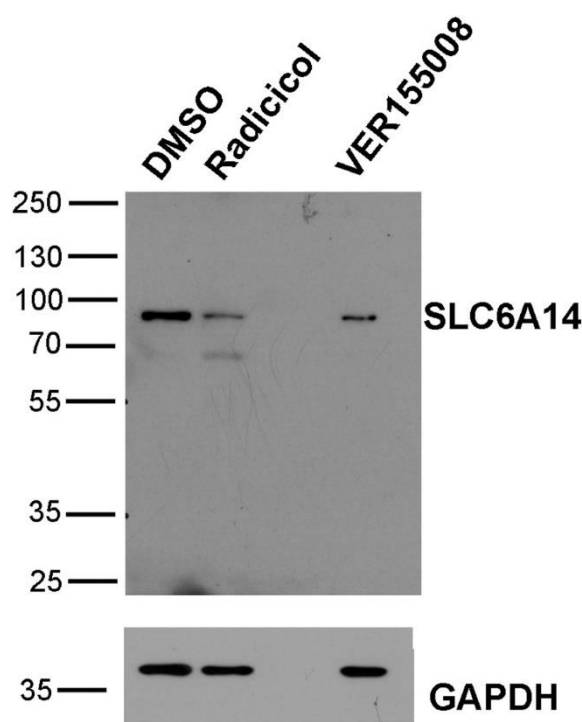
4.6. Oddziaływanie natywnej formy transportera $ATB^{0,+}/SLC6A14$ z białkami HSP

Wcześniejsze obserwacje wykazały, że białko $ATB^{0,+}/SLC6A14$ jest obecne w linii komórkowej nabłonkowego gruczolaka MCF7 a większość tego transportera znajduje się wewnątrz komórki (Kovalchuk i wsp., 2019). W związku z tym, że zarówno identyfikacja białek związanych z $SLC6A14$, jak i dalsze badania nad interakcją transportera z HSP90-beta i HSPA14 zostały przeprowadzone w systemie nadekspresji, postanowiliśmy sprawdzić, czy będziemy w stanie wykryć wymienione wyżej oddziaływania w przypadku endogennego transportera. W tym celu wykonano analizę immunofluorescencyjną, podczas której komórki utrwalono zimnym metanolem i poddano dalszym procedurom, zgodnie z opisem z Rozdziału 3.5.9.1. Do wykrywania $ATB^{0,+}$ użyto przeciwciał pochodzących z organizmu królika a do wybarwienia białek HSP przeciwciał mysich. Wyniki przedstawione na Ryc. 4.10., wskazują na kolokalizację (żółte punkty) $SLC6A14$ zarówno z HSP90-beta, jak i HSPA14.



Ryc. 4.10. Analiza lokalizacji $SLC6A14$ i HSP w komórkach MCF7. Komórki poddano analizie metodą immunofluorescencji, jak opisano w Rozdziale 3.5.9.1. Do wykrywania białek HSP użyto przeciwciał anti-HSP90-beta i anti-HSPA14 oraz Alexa Fluor® 488 (zielony). Do wykrycia $SLC6A14$ użyto przeciwciał anti- $SLC6A14$ oraz Alexa Fluor® 568 (czerwony). Przedstawiono reprezentatywne zdjęcia z trzech niezależnych hodowli komórkowych. Skala 20 μm . Powiększenie zaznaczonych paneli przedstawiono po prawej.

Następnie, aby zweryfikować, czy zahamowanie obu HSP może wpływać na SLC6A14 podobnie jak w przypadku eksperymentów przeprowadzonych w systemie nadekspresji, wykorzystano technikę western blot (Rozdział 3.5.4.2.) z zastosowaniem inhibitorów w stężeniach wskazanych w legendzie Ryciny 4.11. Jak pokazano na Rycinie 4.11., traktowanie MCF7 odpowiednio radicicolem lub VER155008 zmniejszyło ilość w pełni uglikozylowanego transportera oraz całkowity poziom SLC6A14 w komórce.

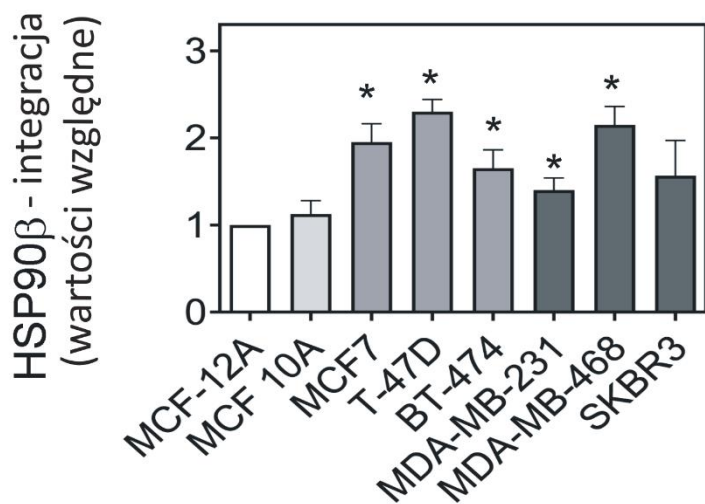
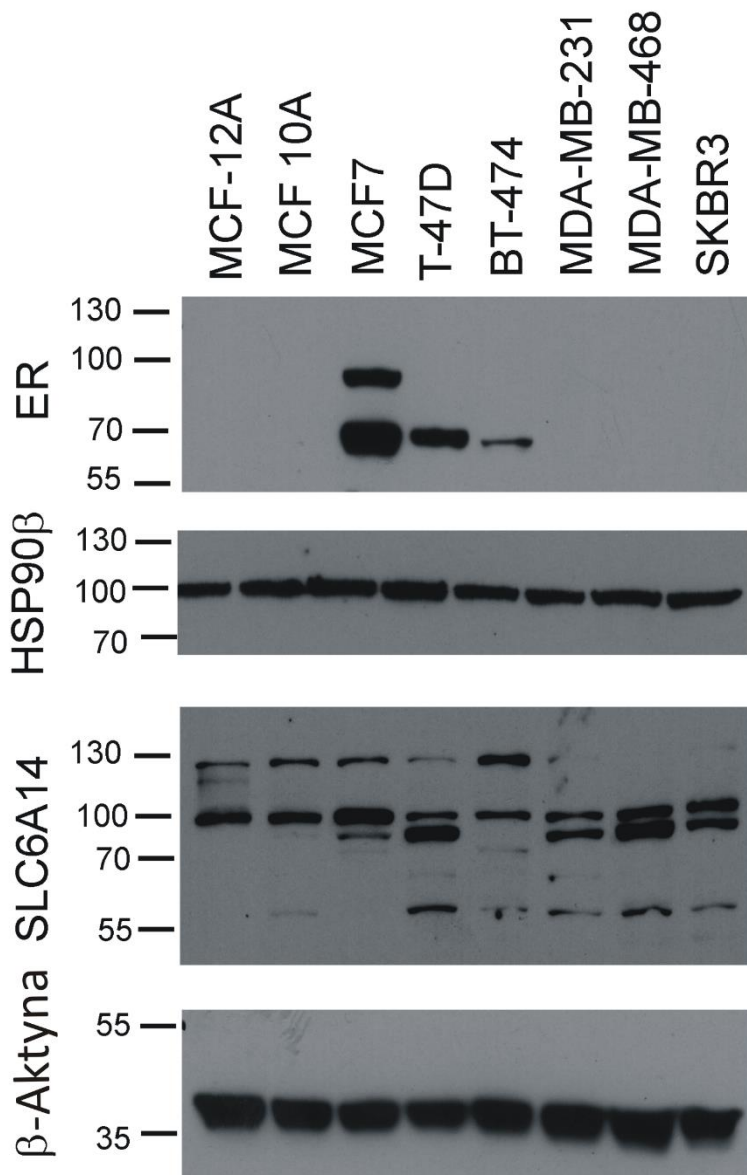


Ryc. 4.11. Wpływ inhibitorów HSP na SLC6A14 w komórkach linii MCF7. Komórki MCF7 traktowano, tam gdzie wskazano, przez 24 h odpowiednio radicicolem (20 μ M) lub VER155008 (50 μ M). Ekstrakty białkowe pozyskane zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.5.3., poddano analizie western blot (Rozdział 3.5.4.2.). Przedstawiono reprezentatywny blot wybrany z jednego z trzech niezależnych eksperymentów. GAPDH zastosowano jako kontrolę nanoszenia próbek na żel.

4.7. Ekspresja $ATB^{0,+}/SLC6A14$ oraz HSP90-beta w prawidłowych komórkach nabłonkowych i komórkach linii raka piersi

Wiadomo, że SLC6A14 ulega ekspresji na wysokim poziomie w komórkach raka piersi, w których obecny jest receptor estrogenowy ($ER-\alpha^+$) (Karunakaran i wsp., 2011). Wysoką ekspresję HSP90 także zaobserwowano w różnych typach nowotworów, w których ma ono duży wpływ na proliferację i żywotność komórek, dzięki zapobieganiu agregacji niesfałdowanych lub nieprawidłowo sfaldowanych białek (Lianos i wsp., 2015; Murphy, 2013). W związku z tym wybrane przez nas linie komórek nabłonkowych z ludzkiego

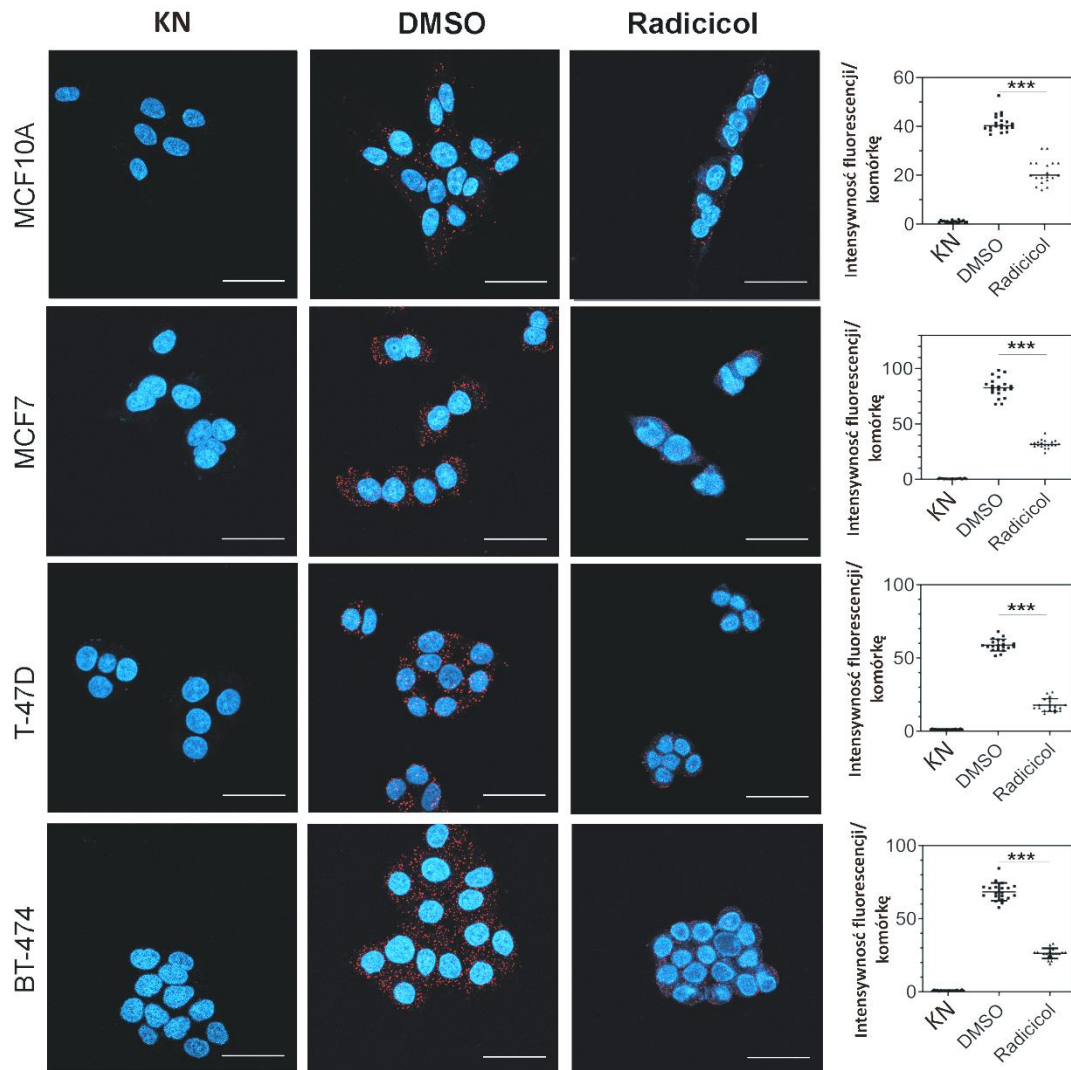
gruczołu sutkowego i linie komórek raka piersi poddano analizie western blot pod kątem obecności receptora estrogenowego, jak również HSP90-beta i SLC6A14. Wyniki przedstawione na Ryc. 4.12., pokazują, że ER- α można wykryć w liniach MCF7, T-47D i BT-474. Białko HSP90-beta wykryto we wszystkich stosowanych liniach komórkowych, a jego poziom jest znacznie wyższy w liniach komórek nowotworowych z wyjątkiem linii SKBR3. SLC6A14 można wykryć jako kilka pasm: nieglikozylowane, glikozylowane rdzeniowo i pasmo o wysokiej masie cząsteczkowej. To wysokocząsteczkowe pasmo jest widoczne w kontrolnych liniach nabłonkowych, a także w komórkach ER- α^+ . Jego poziom jest znacznie wyższy w komórkach BT-474, osiągając $3,1 \pm 0,2$ -krotny wzrost ($n=3$) w porównaniu z linią MCF-12A.



Ryc. 4.12. Analiza western blot wybranych białek w liniach komórek nabłonkowych oraz komórek raka piersi. ER - receptor estrogenowy α ; HSP90 β - białko szoku cieplnego 90 - beta; SLC6A14 - transporter aminokwasowy; 25 μ g białka na ścieżkę; β -aktyna stanowi kontrolę nanoszenia próbek na żel. Przedstawiono reprezentatywne bloty wybrane z jednego trzech niezależnych eksperymentów. Dla integracji HSP90-beta (n=4) przeprowadzono analizę statystyczną z użyciem programu GraphPad Prism za pomocą niesparowanego testu t z poprawką Welsha. Przyjęto próg istotności statystycznej na poziomie $p < 0,05$. * - gwiazdki wskazują znaczącą zmianę w porównaniu z kontrolą.

4.8. Bezpośrednia interakcja pomiędzy HSP90-beta a SLC6A14 in vivo

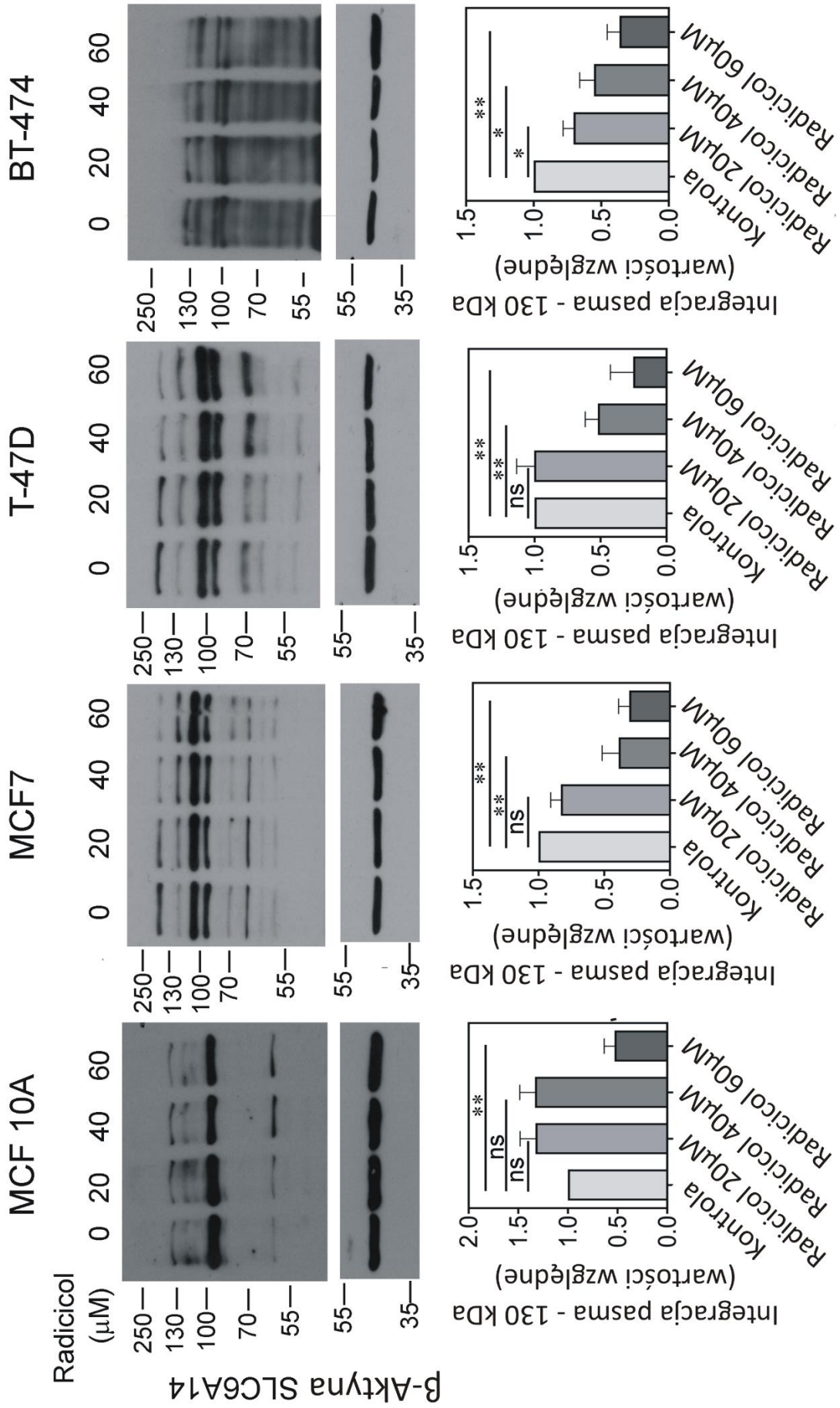
Zwiększoną ekspresję HSP90-beta wykryto m.in. w złośliwych nowotworach piersi i wykazano, że koreluje ona z występowaniem przerzutów i gorszą prognozą dla pacjentów (Osada i wsp., 2017). Z uwagi na ten fakt oraz biorąc pod uwagę nasze wcześniejsze obserwacje dotyczące roli HSP w kontroli procesu fałdowania SLC6A14, determinującego lokalizację transportera w komórce, postanowiliśmy przyjrzeć się roli białka HSP90-beta właśnie w tych liniach nowotworowych. Aby potwierdzić czy, tak jak w doświadczeniach z komórkami po nadekspresji, również w komórkach linii raka piersi między HSP90-beta i SLC6A14 dochodzi do bezpośredniej interakcji zastosowaliśmy test ligacji zbliżeniowej - PLA (Rozdział 3.5.9.2.). Do doświadczeń wybraliśmy linie komórkowe, w których występuje receptor estrogenowy i kontrolną linię nabłonkową - MCF 10A. Detekcja sygnału była możliwa tylko po zastosowaniu dwóch przeciwciał pierwszorzędowych, tj. anty-SLC6A14 i anty-HSP90-beta, nie obserwowano natomiast sygnału, gdy pominięto ten krok (KN - kontrola negatywna). Jak przedstawia Rycina 4.13., pozytywny sygnał PLA otrzymano we wszystkich badanych liniach, co świadczy o bliskiej interakcji białka HSP90-beta z SLC6A14. Interakcję tę obserwowano na wyższym poziomie w liniach komórek nowotworowych, w których jest obecny receptor estrogenowy (ER- α^+) w porównaniu z linią kontrolną. Ponadto inhibicja HSP90-beta spowodowała znaczny spadek intensywności tego oddziaływania.



Ryc. 4.13. Wpływ hamowania HSP90-beta na SLC6A14 w wybranych liniach komórkowych. Komórki nabłonkowe oraz nowotworowe po 24 godzinnym traktowaniu radicicolem o stężeniu 40 μ M lub DMSO (kontrola) poddano procedurze PLA. Reprezentatywne obrazy z mikroskopu pokazują miejsca oddziaływania wyżej wymienionych białek widoczne w postaci czerwonych kropek – sygnał PLA, jądra komórkowe zostały wyznakowane DAPI. Komórki wyznakowane z pominięciem przeciwciał I-rzędowych, stanowiły kontrolę negatywną (KN) dla sygnału PLA; skala: 40 μ m. Po prawej stronie przedstawiono ilościową analizę intensywności fluorescencji sygnału PLA znormalizowaną do liczby jąder komórkowych z 25 losowo wybranych pól widzenia, gdzie każdy punkt oznacza wartość z danego obszaru, *** $p < 0,001$, słupki błędów średnia \pm SD.

4.9. Wpływ HSP90-beta na lokalizację powierzchniową SLC6A14

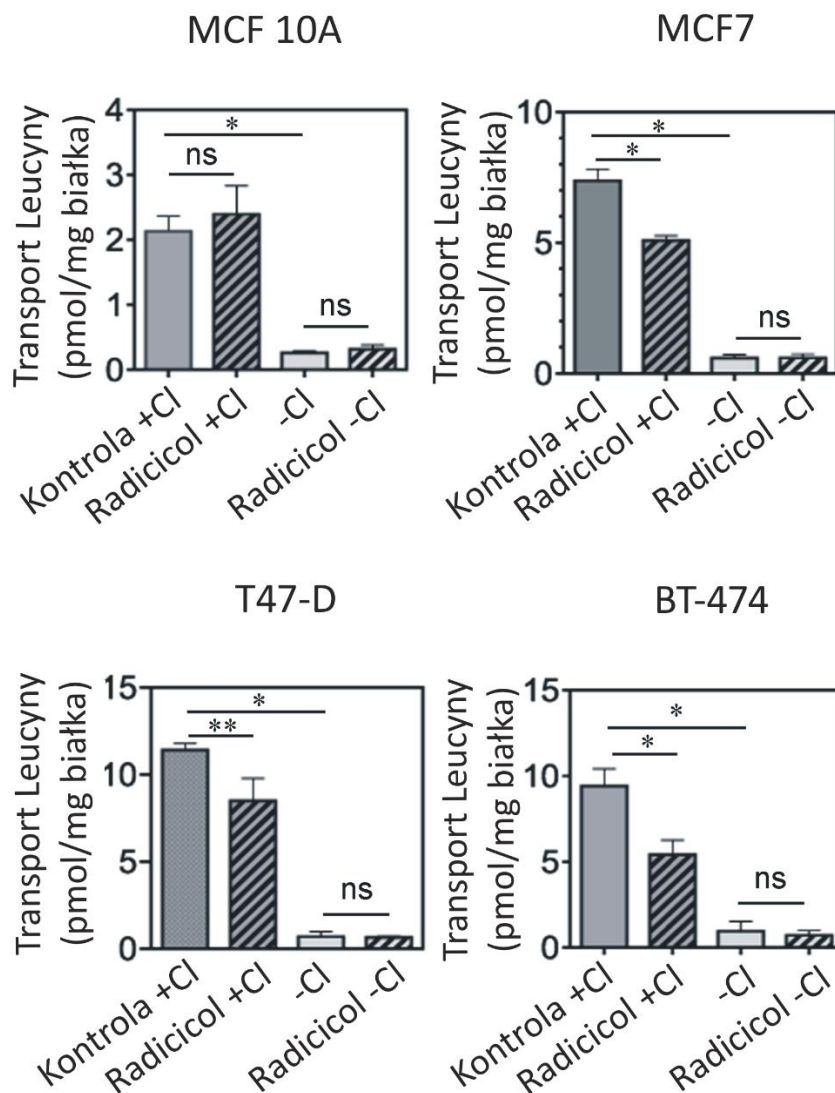
Jak wykazano wcześniej w badaniach z zastosowaniem techniki biotynylacji białek powierzchniowych, prezentowane przez transporter pasmo o wysokiej masie cząsteczkowej to zlokalizowana w błonie plazmatycznej w pełni uglikozylowana forma SLC6A14 (Rogała-Koziarska i wsp., 2019; Kovalchuk i wsp., 2019). Dlatego postanowiliśmy sprawdzić, czy lokalizacja powierzchniowa transportera w komórce zależy od aktywności HSP90-beta. W przeprowadzonych przez nas eksperymentach, do traktowania wybranych linii komórkowych, zastosowaliśmy różne stężenia radicicolu, aby jak najbardziej obniżyć aktywność białka HSP. Następnie po 24 godzinnej inkubacji z odpowiednim stężeniem tego inhibitora uzyskane ekstrakty białkowe poddano analizie immunoblotingu zgodnie z metodą z Rozdziału 3.5.4.2. Uzyskane wyniki przedstawione poniżej, na Ryc. 4.14., pokazują, że najniższe – 20 μM stężenie radicicolu obniżyło poziom wysokocząsteczkowego pasma tylko w komórkach BT-474, nie mając wpływu na inne badane linie. Wyższe – 40 μM stężenie radicicolu, nie miało wpływu na pasmo o wysokiej masie cząsteczkowej w nienowotworowych komórkach kontrolnych - MCF 10A, w przypadku których tylko 60 μM radicicol spowodował spadek ilości SLC6A14 na powierzchni komórek. Pasma o wysokiej masie cząsteczkowej uległo 2 krotnemu zmniejszeniu w przypadku linii MCF7 i T-47D oraz znacznemu zmniejszeniu w trzeciej wybranej linii nowotworowej BT-474 już po dodaniu 40 μM radicicolu, czyli we wszystkich liniach nowotworowych ER- α^+ a podanie tego inhibitora w najwyższym 60 μM stężeniu jeszcze potęgowało ten efekt. Jak wspomniano wyżej jedynie w linii BT-474 obserwowaliśmy istotny efekt po zastosowaniu każdego wybranego stężenia radicicolu.



Ryc. 4.14. Wpływ inhibitora HSP90-beta – radicicolu na poziom wysokocząsteczkowego pasma SLC6A14. Komórki wybranych linii komórkowych inkubowano przez 24 h z DMSO (kontrola) lub wskazanym stężeniem radicicolu. Następnie, ekstrakty białkowe uzyskane zgodnie z metodą z Rozdziału 3.5.3., poddano analizie western blot. Przedstawiono reprezentatywne bloty wybrane z jednego z trzech niezależnych eksperymentów na różnych pasażach dla danej linii. β -aktyna stanowi kontrolę ilości białka w nanoszanej próbce. Wykonano integrację pasm wysokocząsteczkowych, dla których przeprowadzono analizę statystyczną z użyciem programu GraphPad Prism za pomocą niesparowanego testu t z poprawką Welsha. W przypadku każdej wybranej linii komórkowej poszczególne pasma wysokocząsteczkowe, uzyskane po inhibicji przy użyciu radicicolu, porównywano z pasmem kontrolnym. Przyjęto próg istotności statystycznej na poziomie $*p<0.05$; $**p<0.02$; * - gwiazdki wskazują znaczącą zmianę w porównaniu z kontrolą, ns – nieistotne statystycznie.

4.10. Wpływ zahamowania HSP90-beta na akumulację L-Leucyny

Ponieważ obecność transportera w błonie plazmatycznej jest warunkiem koniecznym dla jego aktywności, w kolejnym etapie zmierzaliśmy transport radioaktywnej L-leucyny (Rozdział 3.5.10.) w linii nabłonkowej MCF 10A oraz w trzech wybranych liniach nowotworowych (MCF7, T-47D, BT-474) traktowanych DMSO (kontrola) lub 40 μ M radicicolem. Dla każdej z wybranych linii komórkowych, równolegle, prowadzono doświadczenia w dwóch różnych buforach. Pierwszy bufor stanowił roztwór PBS+ zawierający jony chloru, niezbędne do aktywności SLC6A14, natomiast drugi - roztwór glukonianów, który tych jonów nie zawierał. Zabieg ten zastosowano po to, aby ocenić udział innych transporterów leucyny o niskim powinowactwie, np. tych z rodziny LAT takich jak LAT1 i LAT2, o których wiadomo, że ulegają ekspresji w komórkach linii MCF7 i MCF 10A (Shennan i wsp., 2003) (Liang i wsp., 2011). Jak pokazuje Ryc. 4.15., całkowita akumulacja leucyny w porównaniu do linii MCF 10A jest odpowiednio 3,5, 11,4 i 4,2 raza wyższa w liniach MCF7, T47-D i BT-474. Transport leucyny po wyeliminowaniu aktywności SLC6A14 (pomiar przeprowadzane w buforze bez chloru) jest znacznie niższy we wszystkich liniach komórkowych i nie ma na niego wpływu obecność radicicolu w buforze reakcyjnym. W przypadku linii MCF 10A radicicol nie ma wpływu na akumulację leucyny również w sytuacji, gdy transporter działa efektywnie (doświadczenia w buforze zawierającym chlor). Wykazano natomiast, że traktowanie komórek 40 μ M radiciolem, przez 24 h przed przeprowadzeniem pomiarów transportu, wpływa na aktywność transportową samego SLC6A14, ocenianej z różnicy pomiędzy aktywnością transportową mierzoną w obecności chloru po odjęciu akumulacji leucyny po eliminacji chloru. Uzyskane wyniki potwierdzają, że interakcja HSP90-beta/SLC6A14 może odgrywać istotną rolę w transporcie L-leucyny w komórkach raka piersi.

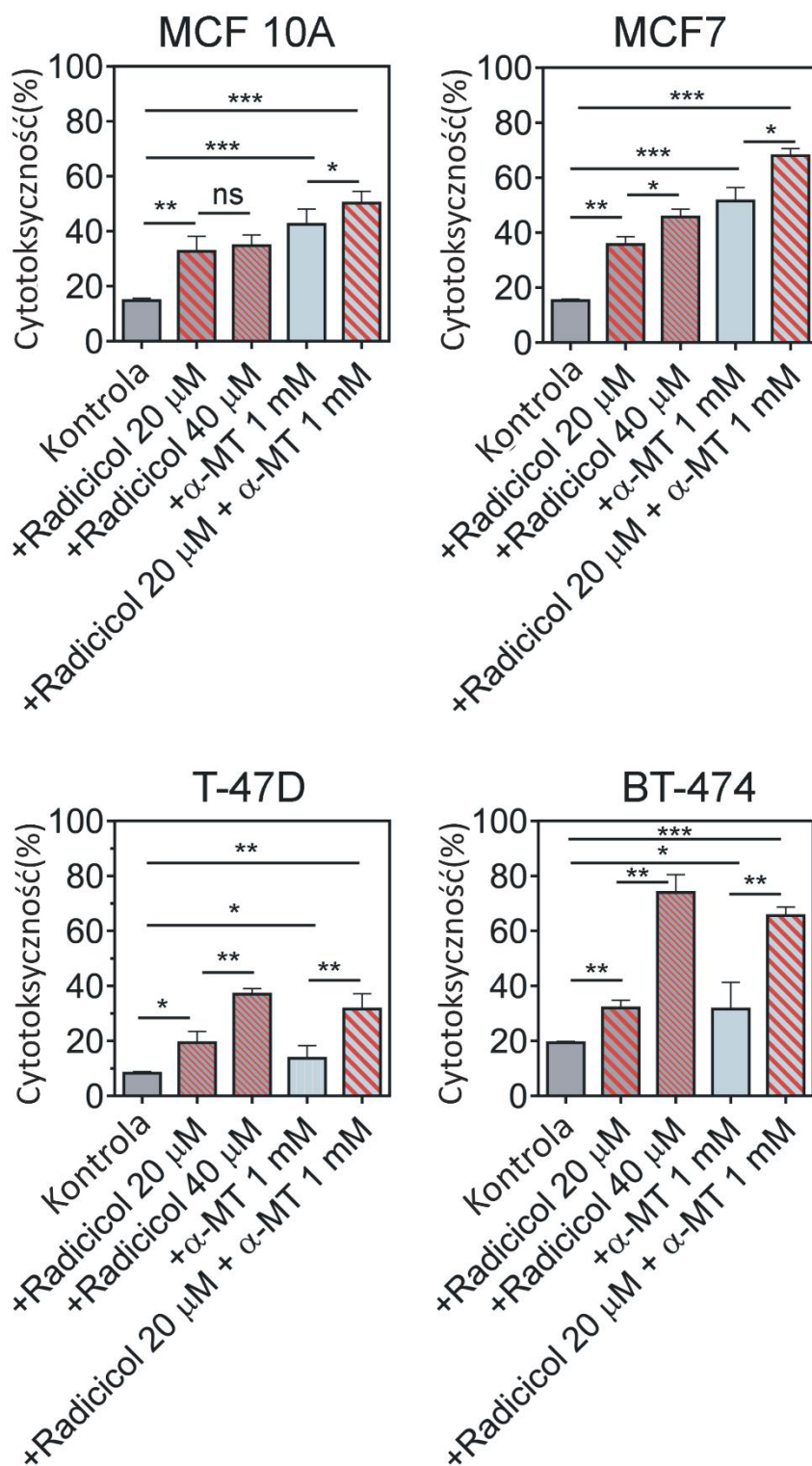


Ryc. 4.15. Transport L-leucyny w wybranych liniach komórkowych po zahamowaniu HSP90-beta. Komórki inkubowano przez 24 godziny z DMSO (kontrola) lub 40 μ M radicolom. Pomiar transportu radioaktywnie znakowanej leucyny wykonywano po 5 minutowej inkubacji (Rozdział 3.5.10.). Przedstawiono wyniki z 6 niezależnych pomiarów, gdyż transport mierzono w trzech powtórzeniach, w komórkach z dwóch różnych pasażi. Dane przedstawiono jako wartości pmol leucyny/mg białka. * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; ns – nieistotnie statystycznie.

4.11. Wpływ radicolu i α -metylotryptofanu na przeżywalność linii nowotworowych raka piersi

Ponieważ radicol może wpływać na poziom SLC6A14 w błonie plazmatycznej, co skutkuje zmniejszonym wychwytem radioaktywnie znakowanej leucyny, postanowiliśmy przeanalizować jaki wpływ ma ten

inhibitor na przeżywalność komórek. W tym celu zastosowaliśmy test cytotoksyczności CellTox Green, w którym komórki z uszkodzoną błoną komórkową, czyli komórki martwe są znakowane fluorescencyjnie. Do testu, oprócz radicicolu, wykorzystaliśmy dodatkowo α -metylotryptofan, o którym wiadomo, że jest selektywnym blokerem SLC6A14 w komórkach raka piersi ER- α^+ . W przeprowadzonych doświadczeniach, chcieliśmy sprawdzić jaki efekt cytotoksyczny na wybrane przez nas linie komórkowe, będą miały inhibitory podane oddzielnie oraz skojarzone ze sobą. Wyniki przedstawione na Ryc. 4.16., pokazują, że oba związki spowodowały wzrost cytotoksyczności, gdy zostały dodane osobno. Ponadto zastosowany test wykazał, że kombinacja tych inhibitorów w stężeniach: 20 μ M radicicol i 1 mM α -MT działa synergistycznie powodując dalszy wzrost efektu cytotoksycznego.



Ryc. 4.16. Wpływ radicolu i α -metylotryptofanu na cytotoksyczność linii komórkowych raka piersi, w których ulega ekspresji receptor estrogenowy. Cytotoksyczność analizowano za pomocą testu CellTox™ Green Cytotoxicity Assay po 24 godzinnym traktowaniu wskazanymi związkami. Pomiary wykonano w trzech powtórzeniach na komórkach z dwóch różnych pasaży. Cytotoksyczność obliczano, jak podano w Rozdziale 3.5.11. * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,001$; ns – nieistotne statystycznie.

5. DYSKUSJA

Komórki nowotworowe mają zwiększone zapotrzebowanie na aminokwasy ze względu na ich szybkie tempo proliferacji. Poza wysokim zapotrzebowaniem na syntezę białek, kilka aminokwasów odgrywa inne role we wspieraniu wzrostu nowotworów (Hanahan i Weinberg, 2011). Jak przedstawiono w Rozdziale 1.2., szereg transporterów ulega zwiększonej ekspresji w nowotworach, w tym wymienniki aminokwasów (Tabela 1.1.), takie jak SLC7A5 (LAT1), SLC1A5 (ASCT2), czy SLC7A11 (xCT), których aktywność pozbawia komórkę innego aminokwasu (Scalise i wsp., 2016).

Badania wykazały, że komórki nowotworowe mają zmienione szlaki metaboliczne obejmujące aminokwasy: glutaminę, serynę, treoninę i prolinę (Locasale, 2013; Phang i wsp., 2015). Szczególną uwagę zwrócono na dominującą rolę glutaminy, w selektywnych dla nowotworów szlakach metabolicznych, o której świadczy powszechne stosowanie terminów takich jak "uzależnienie od glutaminy" i "glutaminoliza" w języku biologii raka (Wise i Thompson, 2010). Glutamina po glutaminolizie i konwersji do glutaminianu bierze udział w produkcji kilku metabolitów, a także ATP i NADPH, które są niezbędne dla procesów anabolicznych (Kandasamy i wsp., 2018; Scalise i wsp., 2020). Transportery glutaminy SLC38A1 (System A) i SLC38A5 (System N) również ulegają podwyższonej ekspresji w komórkach nowotworowych. Glutamina może być również transportowana przez SLC6A14 (Ganapathy i wsp., 2009).

SLC6A14 (ATB⁰⁺) nie jest wymiennikiem, a stechiometria transportu SLC6A14 wynosi 1 substrat/2 Na⁺/1 Cl⁻, poza tym aktywność SLC6A14 zależy również od potencjału transmembranowego (Sloan i Mager, 1999). Ponieważ funkcjonowanie SLC6A14 zależy od trzech sił napędowych to może on koncentrować swoje substraty ok. 1000 krotnie w komórkach (Sikder i wsp., 2017).

Aktywność oraz lokalizacja transporterów w komórkach nowotworowych może być modulowana na szereg różnych sposobów w tym poprzez inhibicję farmakologiczną, modyfikacje potranslacyjne lub podczas ich przemieszczania do odpowiednich kompartmentów komórkowych. Aby spełniać swoją fizjologiczną rolę, każdy transporter błonowy musi dotrzeć do powierzchni komórki. Nowopowstający polipeptyd opuszcza ujście rybosomu w częściowo rozwiniętym stanie i musi zostać odpowiednio sfałdowany przez kilka białek opiekuńczych i enzymy fałdujące, aby uniknąć agregacji i degradacji związanej z siateczką śródplazmatyczną (ERAD). W siateczce zlokalizowanych jest kilka białek opiekuńczych, takich jak klasyczne białka szoku cieplnego czy lektyny, rozpoznające specyficzne glikany (Braakman i Hebert, 2013). Zarówno N- jak i C-koniec SLC6A14 są zlokalizowane wewnątrzkomórkowo (Samluk i wsp., 2012), dlatego po umieszczeniu w błonie siateczki śródplazmatycznej oba końce będą położone po stronie cytoplazmatycznej, podczas gdy N-glikozylowana pętla zewnątrzkomórkowa

będzie skierowana w stronę światła siateczki. Proces glikozylacji rdzeniowej zachodzi w świetle siateczki śródplazmatycznej po umieszczeniu, w jej wnętrzu, dużego prekursora - oligosacharydu - $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Glc - glukoza, Man - mannoza, GlcNAc - N-acetyloglukozamina) (Breitling i Aebi, 2013). Na tym etapie oligosacharyd musi zostać odpowiednio przycięty. Podczas tego procesu, usunięcie końcowej glukozy skutkuje wiązaniem malektyny a przycięcie drugiej glukozy skutkuje wiązaniem kalneksyny, lektyny związanej z błoną (Braakman i Hebert, 2013). Kalneksyna może oddysocjować od glikoproteiny po usunięciu trzeciej glukozy związanej z mannozą. Prawidłowe fałdowanie kontrolowane przez kalneksynę umożliwia dostarczenie klienta białkowego do punktów wyjściowych z siateczki śródplazmatycznej i dalszy transport do aparatu Golgi'ego, podczas gdy odcinanie reszt mannozy dostarcza nieprawidłowo sfałdowane białko do ERAD (Lederkremer, 2009). Kontrola jakości procesu fałdowania powinna zachodzić również po cytozolowej stronie białka transbłonowego. Wykazano, że cytozolowe C-końce białek błonowych, takich jak receptor adenylinowy A2A sprzężony z białkiem G (Keuerleber i wsp., 2011) czy innego członka rodziny SLC6, transportera serotoniny (SLC6A4/SERT) (El-Kasaby i wsp., 2014) oddziałują z cytozolowymi białkami szoku cieplnego przed związaniem coatomeru II (COPII) w celu opuszczenia siateczki śródplazmatycznej.

Ponieważ przeprowadzona wcześniej analiza proteomu SLC6A14 wykazała m. in. obecność białek szoku cieplnego (Tabela 1.3.), skoncentrowaliśmy się na roli tych białek w regulacji obecności transportera na powierzchni błony komórkowej. Poprzednie badania przeprowadzone w naszym laboratorium wykazały, że 24 godziny po transfekcji SLC6A14 jest zlokalizowany głównie w siateczce śródplazmatycznej i kolokalizuje z obecną na terenie siateczki lektyną i białkiem opiekuńczym - kalneksyną. Po nadekspresji SLC6A14, ponad połowę ilości tego białka można było wykryć w błonie plazmatycznej 48 godzin po transfekcji, co wykazano stosując technikę biotynylacji białek powierzchniowych i analizę immunofluorescencyjną (Kovalchuk i wsp., 2019). Kolokalizacja transportera z białkami HSP90-beta i HSP70 (HSPA14), obserwowana zarówno po nadekspresji SLC6A14, jak i z natywnym transporterem, pokazana w niniejszej pracy wskazuje, że interakcja między SLC6A14 i białkami HSP ma miejsce, gdy transporter nadal znajduje się w błonie siateczki śródplazmatycznej. Co więcej, redukcja poziomu SLC6A14 w błonie plazmatycznej, po traktowaniu inhibitorami HSP70 lub HSP90 wskazuje, że transporter jest substratem dla obu wspomnianych HSP i przechodzi proces dojrzewania dzięki kooperacji tych białek (Taipale i wsp., 2010). Należy również dodać, że HSP70, który bierze udział w procesie fałdowania nowopowstających polipeptydów, ponownym fałdowaniu nieprawidłowo sfałdowanych białek czy zapobieganiu powstawaniu toksycznych agregatów (Rosenzweig i wsp., 2019), pełni swoją funkcję przy pomocy różnych białek pomocniczych i ulega aktywacji przez białka HSP40, zawierające domeny J (Laufen i wsp., 1999). Co ciekawe, w proteomie SLC6A14 wykryliśmy dwa homologi HSP40/DnaJ (Tabela 1.3.), z których jeden należy do podrodziny C (DnaJC) oddziałującej z HSP70 podczas wiązania niedojrzałych białek, pojawiających się w

rybosomalnym tunelu wyjściowym (Mayer i Gierasch, 2019). Po dimeryzacji, HSP70 przenosi swój substrat dalej do HSP90 (Morgner i wsp., 2015), którego aktywność może być regulowana przez co najmniej 20 ko-chaperonów (Prodromou, 2016).

Białka HSP regulują przede wszystkim prawidłowe fałdowanie rozpuszczalnych białek, a zwłaszcza kilku kinaz białkowych, receptorów hormonów steroidowych oraz ligaz ubikwitynowych E3, aczkolwiek na przestrzeni lat, odkryto również wiele innych substratów, w tym czynniki transkrypcyjne, białka chromatynowe, telomerazową odwrotną transkryptazę czy śródbłonkową syntazę tlenu azotu (Schopf i wsp., 2017; Rutz i wsp., 2018). W ostatnim czasie pojawia się coraz więcej informacji, dotyczących roli białek HSP w kontrolowaniu konformacji białek błonowych, w szczególności receptorów i transporterów błony plazmatycznej. Jednak doniesienia na temat wpływu inhibicji HSP na fałdowanie białek błonowych i ich dalszy transport na powierzchnię komórki bywają sprzeczne. Wykazano, że wyciszenie HSP90-beta zwiększyło ilość transportera SLC6A4/SERT w błonie (El-Kasaby i wsp., 2014), podobną zależność zaobserwowano w przypadku SLC26A4, który jest stabilizowany przez hamowanie aktywności HSP90, aczkolwiek wykryto jedynie jego nieglikozylowane i niecałkowicie glikozylowane formy (Lee i wsp., 2012), co wskazuje na zatrzymanie transportera w siateczce śródplazmatycznej. Co ciekawe, zahamowanie HSP90-beta wykrytego w interaktomie SLC9A1/NHE-1 nie zmieniło ilości białka w błonie, ale wpłynęło na jego fosforylację przez kinazę AKT (Odunewu-Aderibigbe i Fliegel, 2017). Z kolei w innym badaniu, zahamowanie HSP90 skutkowało 53% spadkiem poziomu ko-transportera SLC12A3/NCC. W tym przypadku, skierowanie transportera SLC12A3 na ścieżkę degradacji i obserwowany spadek zarówno rdzeniowej, jak i w pełni glikozylowanej formy tego białka (Donnelly i wsp., 2013), pokrywało się z naszymi obserwacjami dotyczącymi wpływu inhibicji HSP90-beta i HSPA14 na SLC6A14. Ponadto, w niniejszej pracy wykazaliśmy, że funkcjonowanie szlaku ERAD, hamowanego przez inhibitor proteasomu – bortezomib, jest wspomagane przez aktywność dwóch ligaz ubikwitynowych E3 - TRIM25 i TRIM21 (Tabela 5.1.), należących do podrodziny białek z motywem trójdzielny C-IV (TRIM ang. tripartite motif family) (Hatakeyama, 2017), zidentyfikowanych wśród białek związanych z SLC6A14. Skierowanie SLC6A14 na szlak degradacji ERAD, po zahamowaniu obu białek HSP i nieprawidłowym fałdowaniu białka, skutkowało niższym poziomem transportera w błonie plazmatycznej. W tym momencie trudno wyjaśnić przeciwstawny wpływ inhibicji białek HSP, na obecność w błonie plazmatycznej, między transporterami SLC6A14 i SLC6A4. Warto dodać, że eksperymenty przeprowadzone z zastosowaniem chaperonów farmakologicznych (ang. pharmacochaperones) transportera SLC6A4/SERT wykazały, że tylko ligandy stabilizujące konformację skierowaną do wewnątrz działają jako skuteczne farmako-chaperony. To dowodzi, że trajektoria fałdowania SERT przebiega przez konformację białka skierowaną do wewnątrz w błonie siateczki śródplazmatycznej (Chiba i wsp., 2014). Niestety, nie mamy informacji na

temat konformacji SLC6A14 i wpływu ligandów na konformację skierowaną do wewnątrz i na zewnątrz.

Tabela 5.1. Ligazy ubikwitynowe wykryte w proteomie SLC6A14, w kategorii inne, czyli wśród białek nieprzyporządkowanych do żadnej głównej kategorii.

Numer białka	Nazwa wg bazy danych Mascot
Q9Y295	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1
Q00341	Vigilin
O60256	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2
Q8NB90	Spermatogenesis-associated protein 5
Q96C36	Proline-5-carboxylate reductase 2
Q13724	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase
P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide–protein glycosyltransferase subunit 2
Q9H8Y5	Ankyrin repeat and zinc finger domain-containing protein 1
Q14258	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25
O95340	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2
O94813	Slit homolog 2 protein
Q5T2N8	ATPase family AAA domain-containing protein 3C
P43686	26S protease regulatory subunit 6B
Q8N163	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase
Q9P258	Protein RCC2
Q9BRK5	45 kDa calcium-binding protein
P14923	Junction plakoglobin
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
P19474	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21
Q96A33	Coiled-coil domain-containing protein 47
Q06830	Peroxiredoxin-1
Q9NSI2	Protein FAM207A
P14618	Pyruvate kinase PKM
Q8IWZ3	Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1
Q9H7E9	UPF0488 protein C8orf33

*Analizę proteomiczną wykonał Łukasz Samluk wyniki z pracy (Rogała-Koziarska i wsp., 2019), suplement.

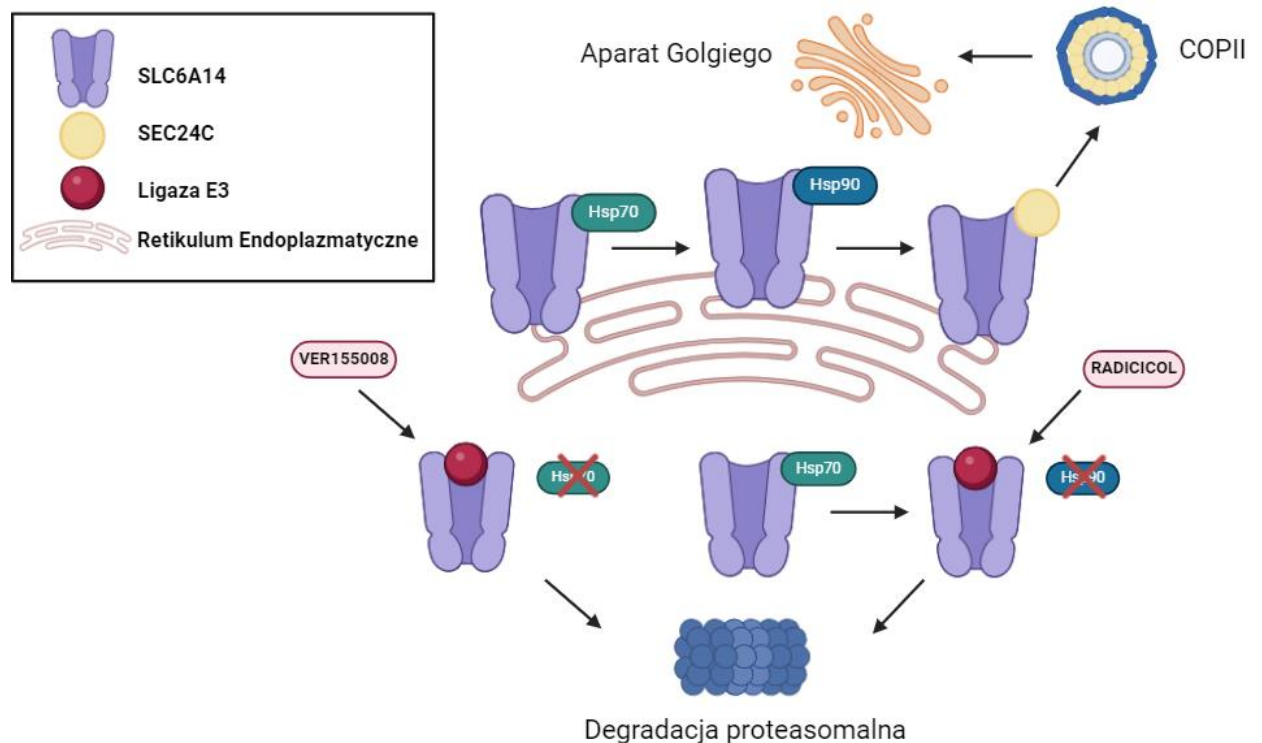
Podobnie jak wszyscy przedstawiciele rodziny SLC6, również SLC6A14 eksponuje jedynie niewielkie fragmenty do cytozolu i przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Wynika z tego, że proces fałdowania hydrofobowych helis transmembranowych jest kontrolowany w translokacji przez białko SEC61, podczas gdy pętle zewnątrzkomórkowe i stopień ich glikozylacji są kontrolowane przez domenę luminalną białka opiekuńczego lektyny/kalneksyny zlokalizowanej w siateczce śródplazmatycznej.

Wcześniejsze badania, przeprowadzone w naszym zespole, z permeabilizowanymi komórkami oraz nie poddawany permeabilizacji dowiodły, że zarówno N- jak i C-koniec transportera SLC6A14 są zlokalizowane po stronie cytoplazmatycznej (Samluk i wsp., 2010), a zatem są dostępne dla białek opiekuńczych zlokalizowanych w cytoplazmie. Dla receptora adenozynowego A2A zaproponowano model przekaźnikowy, w którym białka HSP są zaangażowane w procesie wychodzenia receptora z siateczki śródplazmatycznej (Keuerleber i wsp., 2011). Pierwszym etapem transportu białek do błony plazmatycznej jest ich eksport z siateczki do *cis*-Golgi'ego. Wyraźny spadek ekspresji powierzchniowej SLC6A14 po transfekcji mutantem o dominującym negatywnym efekcie - *SAR1* wskazuje, że SLC6A14 zależy od klasycznego szlaku COPII w transporcie do Golgi'ego. Proces ten obejmuje izoformę C SEC24 jako białko rozpoznające ładunek, wymagane do tworzenia pęcherzyków COPII (Kovalchuk i wsp., 2019). Należy dodać, że motyw RIIK, który wiąże białka SEC24C w transporterach neuroprzekaźników (Sucic i wsp., 2013), jest obecny również we fragmencie C-końca białka SLC6A14 i jak wykazano, oddziałuje on wyłącznie z izoformą SEC24C (Kovalchuk i wsp., 2019). Wykazano, że mutacje w C-końcowym fragmencie białka SLC6A4/SERT skutkują wadliwym procesem składania transportera (El-Kasaby i wsp., 2010). W tym samym badaniu, zaproponowano, że w procesie fałdowania transportera, C-koniec tego białka jest najpierw wiązany przez białka HSP, przed przyłączeniem komponentu płaszcza COPII - SEC24.

Do oceny funkcjonalności HSP90-beta zastosowaliśmy test *in vitro* mierzący aktywność ATPazy rekombinowanego, oczyszczonego białka HSP90-beta. Wprawdzie, aktywna katalitycznie, zamknięta konformacja tego białka jest osiągana znacznie szybciej w obecności ko-chaperonów (Li i wsp., 2012; Prodromou, 2016), to można ją również osiągnąć bez ich udziału (Prodromou, 2012). Pomiar aktywności ATPazy HSP90, bez pomocniczej aktywności ko-chaperonów, przeprowadzono również dla większych fragmentów białka takich jak domena wiążąca ligand receptora glukokortykoidowego (McLaughlin i wsp., 2002; Rutz i wsp., 2018). Dodatkowo, system *in vitro* nie pozwala na żadne modyfikacje potranslacyjne, które jak wiadomo regulują aktywność HSP90 *in vivo* (Mollapour i Neckers, 2012; Prodromou, 2016). W każdym razie, po dobraniu odpowiednich warunków, byliśmy w stanie monitorować tworzenie ADP w reakcji podatnej na działanie inhibitora HSP90 - radicicolu. Zastosowane przez nas dwa z trzech peptydów, wybrane z C-końca białka SLC6A14 - C1 i C11, zawierały sekwencję RIIK i oba wpływały na aktywność HSP90-beta. Co więcej, ani peptyd z N-końca - N11, ani dystalny fragment z C-końca - C36, nie zmieniały aktywności ATPazowej HSP90-beta. Na razie trudno jest nam wyjaśnić przeciwstawny wpływ C1 i C11. Należy zauważyć, że C1, wybrany z regionu zlokalizowanego najbliżej 12 TM, jest bardziej hydrofobowy. Może wiązać się z domeną HSP90 wiążącą substrat (SBD), co nie skutkuje jednak aktywacją HSP, do czego niezbędny wydaje się być mniej hydrofobowy peptyd C11. Nakładanie się sekwencji C1 i C11 z motywem RIIK sugeruje, że miejsce wiązania SEC24C jest również ważne przy wiązaniu HSP90-beta. Obszar SLC6A14 odpowiedzialny za wiązanie HSP70 nie został określony, jednak

aminokwasy na C-końcu 12 domeny transbłonowej (hydrofobowe i dodatnio naładowane) spełniałyby kryteria wiązania HSP70 (Mayer i Gierasch, 2019), dlatego można przypuszczać, że zarówno HSP, jak i SEC24C wiążą się z tym samym regionem transportera. Ponadto, inhibicja HSP70, podobnie jak miało to miejsce w przypadku HSP90-beta, również zmniejszyła powierzchniową obecność SLC6A14, wspierając w ten sposób propozycję przekaźnictwa cytozolowego HSP70/HSP90/SEC24 (Keuerleber i wsp., 2011) w procesie kontroli konformacji białek błonowych i ich eksportu z siateczki śródplazmatycznej.

Podsumowując, SLC6A14 podlega procesowi kontroli jakości przez białka szoku cieplnego HSP70 i HSP90, jest to kluczowy etap poprzedzający dalszy eksport transportera z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgi'ego. Jeśli natomiast owa kontrola jest zakłócona, tak jak po inhibicji HSP, transporter SLC6A14 jest kierowany na ścieżkę degradacji (Ryc. 5.1.).



Ryc. 5.1. Schemat regulacji SLC6A14 przez białka HSP. Rycina przedstawia regulację SLC6A14 przez białka HSP, w procesie transportu SLC6A14, w pęcherzykach COPII z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgi'ego, jak opisano w (Rogała-Koziarska i wsp., 2019). Zahamowanie odpowiednio HSP70 lub HSP90 prowadzi do degradacji proteasomalnej – procesu wspomaganego przez ligazę ubiquitynową E3. Szczegóły zostały opisane w tekście.

Jak przedstawiono w Rozdziale 1.2., SLC6A14 jest silnie indukowany w guzach litych (Sikder i wsp., 2017): w raku okrężnicy (Gupta i wsp., 2005), raku

szyjki macicy (Gupta i wsp., 2006), guzach trzustki (Coothankandaswamy i wsp., 2016), w przypadku których wysoki poziom SLC6A14 został uznany za czynnik negatywnie wpływający na rokowania odnośnie przeżycia (Nałęcz, 2020). Należy dodać, że zahamowanie SLC6A14 za pomocą blokera α -metylotryptofanu (α -MT) (Karunakaran i wsp., 2008) lub nokaut jego genu zmniejszyło wzrost guza w badaniach ksenograficznych (Coothankandaswamy i wsp., 2016). Ponadto Karunakaran i wsp. wykazali podwyższoną ekspresję SLC6A14 w liniach komórkowych raka piersi, w których jest obecny receptor estrogenu oraz w tkankach raka piersi, a także zaobserwowali, że estradiol zwiększał ekspresję genu *SLC6A14*, podczas gdy leczenie antyestrogenami powodowało odwrotny efekt (Karunakaran i wsp., 2011).

Zahamowanie aktywności SLC6A14 powoduje pozbawienie komórek nowotworowych niezbędnych aminokwasów, wpływając tym samym na spadek ich proliferacji oraz powodując apoptotyczną śmierć komórkową (Karunakaran i wsp., 2011). Celowanie w białka szoku cieplnego, odpowiedzialne za kontrolę jakości procesu fałdowania tego transportera, mające na celu ograniczenie obecności SLC6A14 na powierzchni komórki może prowadzić do zmniejszenia przeżywalności komórek nowotworowych, ze względu na podwyższony poziom i aktywność białek HSP w tych komórkach. Wysoką ekspresję HSP zaobserwowano w różnych typach nowotworów, w których koreluje ona ze wzrostem przeżywalności komórek, poprzez zapobieganie agregacji białek (Lianos i wsp., 2015; Chatterjee i Burns, 2017). Poziom HSP90 jest podwyższony w raku trzustki, jajnika, macicy, jamy ustnej, gardła, komórkach raka płaskonabłonkowego, szpiczaku mnogim (Wu i wsp., 2017), jak również w agresywnych nowotworach piersi (Osada i wsp., 2017; Alberti i wsp., 2022). Ta wysoka ekspresja koreluje ze spadkiem apoptozy oraz wzrostem przerzutów i angiogenezy (Wu i wsp., 2017). W związku z tym skupiliśmy się na potencjalnej roli HSP90-beta w regulacji aktywności SLC6A14 w komórkach linii nowotworowych raka piersi ER- α^+ . Wykazaliśmy obecność SLC6A14 we wszystkich badanych liniach komórkowych, jednak pasmo o wysokiej masie cząsteczkowej zostało wykryte tylko w kontrolnych komórkach nabłonkowych (MCF-12A, MCF 10A) oraz w komórkach raka piersi, w których jest obecny receptor estrogenowy α (MCF7, T-47D, BT-474). Tak jak pokazano poprzednio, w eksperymentach z zastosowaniem biotynylacji powierzchniowej białek, właśnie to wysokocząsteczkowe pasmo pokazuje w pełni glikozylowaną formę transportera i jest zlokalizowane w błonie plazmatycznej (Kovalchuk i wsp., 2019).

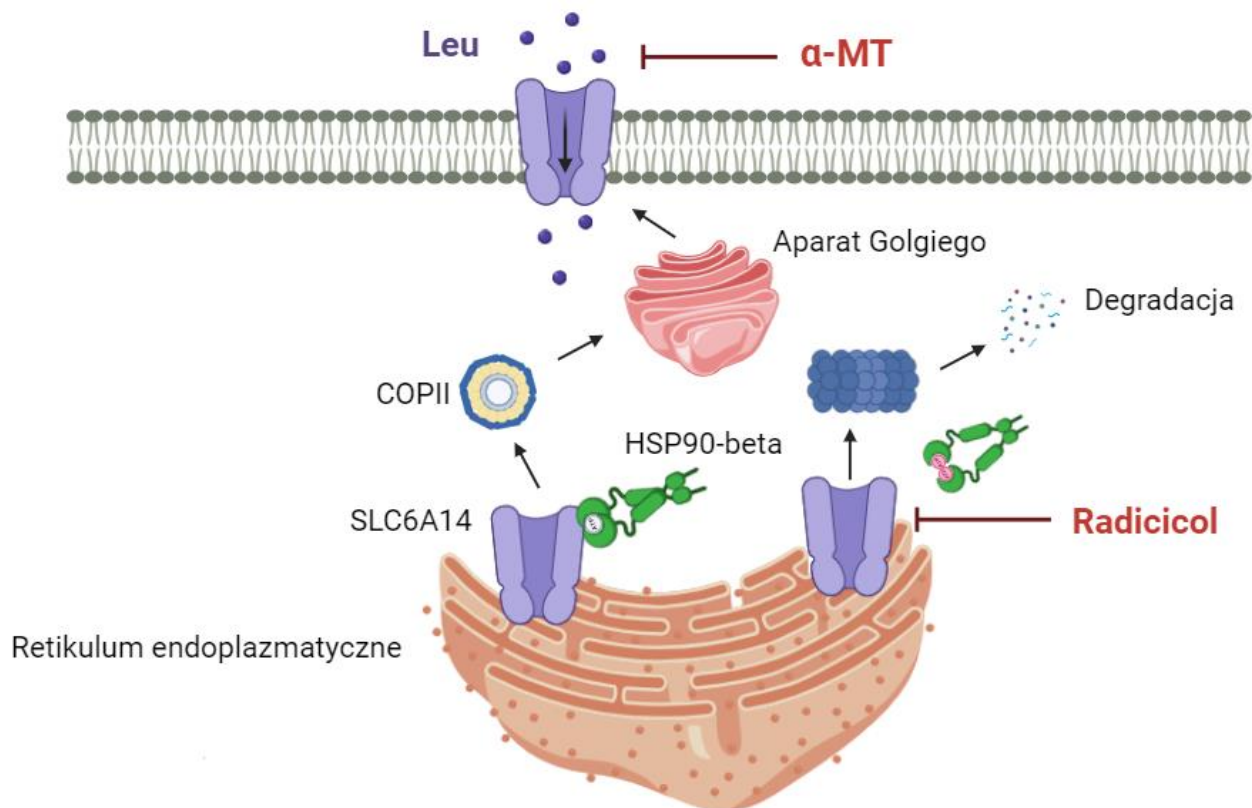
Linie komórkowe z obecnym w błonie SLC6A14 są zdolne do transportu leucyny, chociaż nasze badania pokazują, że akumulacja tego aminokwasu jest znacznie niższa w linii kontrolnej – MCF 10A w porównaniu z liniami nowotworowymi ER- α^+ . Aminokwasy, w tym leucyna, są niezbędne do syntezy białek a tym samym do wzrostu i proliferacji komórek, procesów intensyfikowanych w komórkach nowotworowych i kontrolowanych przez ścieżkę mTOR1, kompleks będący głównym regulatorem kinazy białkowej anabolicznego wzrostu i proliferacji komórek eukariotycznych. W związku z tym, transportery aminokwasów, w tym SLC6A14, odgrywają kluczową rolę w

regulacji tego szlaku (Duval i wsp., 2018; Cormerais i wsp., 2021). Warto dodać, że sygnalizacja mTOR1 jest również kontrolowana przez kinazę AKT (Winter i wsp., 2011). Jak wykazano w badaniach prowadzonych przez innych członków naszego zespołu, AKT fosforyluje SLC6A14, co wpływa na jego aktywność i przemieszczanie (Kovalchuk i Nałęcz, 2021). W niniejszej pracy, wykazaliśmy, że wychwytywanie radioaktywnej leucyny, w wybranych przez nas liniach komórkowych (MCF 10A, MCF7, T-47D, BT-474), w doświadczeniach prowadzonych w roztworze bez chloru był znacznie niższy, w porównaniu z badaniami prowadzonymi równolegle w roztworze z chlorem, co świadczy o istotnym udziale SLC6A14 w akumulacji tego aminokwasu i niewielkim udziale innych systemów transportujących leucynę (LAT). Na uwagę zasługują też fakt, że delecja *Slc6a14* nie była kompensowana przez wzrost ekspresji innych transporterów aminokwasów w gruczolakoraku przewodowym trzustki, a poziom niektórych z nich, takich jak SLC7A1, SLC7A5, SLC7A8 i SLC38A2 ulegał wręcz obniżeniu (Schniers i wsp., 2022). Ponieważ nasze wyniki pokazują, że transport leucyny, bez obecności jonów chloru, nie jest wrażliwy na działanie radicicolu, sugeruje to małą rotację tych transporterów i/lub niską szybkość ich syntezy. Wpływu radicicolu na akumulację leucyny nie zaobserwowano również w doświadczeniach z zastosowaniem buforu zawierającego chlor, przeprowadzonych na nienowotworowej linii MCF 10A, w której akumulacja leucyny była znacznie niższa niż w złośliwych liniach komórkowych. Wykazano natomiast, że w liniach komórkowych ER- α^+ , radicicol istotnie obniżał aktywność transportową SLC6A14. Radicicol, w zależności od linii komórkowej, przyczynia się do spadku o 15 do 50% całkowitej aktywności transportera, wskazując na różnice w syntezie SLC6A14 w wybranych przez nas liniach nowotworowych. W doświadczeniach, z zastosowaniem techniki PLA, zaobserwowano, że radicicol zmniejszał interakcję między SLC6A14 i HSP90-beta, w linii kontrolnej jak i we wszystkich liniach ER- α^+ , chociaż efekt ten był istotnie wyższy w liniach nowotworowych. Wyniki te sugerują, że synteza transportera jest niższa w komórkach nienowotworowych, a znacznie wyższa w komórkach nowotworowych, w których wykryliśmy efekt działania inhibitora na transport leucyny a tym samym zaangażowanie HSP90-beta w regulację aktywności SLC6A14.

Należy dodać, że SLC6A14, ze względu na niezwykle szeroką specyficzność substratową, transportuje również inne aminokwasy niezbędne do szybkiego wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych. Aminokwasy te są wykorzystywane nie tylko do syntezy białek, ale również do innych istotnych procesów, przykładowo glutamina do glutaminolizy i produkcji energii (Bhutia i wsp., 2015; Scalise i wsp., 2016), a seryna i glicyna do szlaków węglowych zaangażowanych w syntezę puryn i pirymidyn, regulowanych w nowotworach (Sniegowski i wsp., 2021). Co więcej, delecja *Slc6a14* w mysim modelu, w którym rak piersi powstawał spontanicznie, wykazała krytyczną rolę transportera w odżywianiu komórek nowotworowych, ponieważ skutkowałą głodem aminokwasowym, zmniejszoną sygnalizacją mTOR i obniżoną proliferacją (Babu i wsp., 2015). Ze względu na wysoką ekspresję w nowotworach HSP90 również jest celem w farmakologii, niestety większość

stosowanych leków posiada skutki uboczne, w tym też radicol (Sanchez i wsp., 2020). Obserwacje te nie powstrzymały jednak naukowców a badania przedkliniczne i kliniczne były powszechnie kontynuowane. We wrześniu 2021 r. japońska firma - Taiho Pharmaceutical, po ukończeniu III fazy badań klinicznych, złożyła wniosek do Ministerstwa Zdrowia Japonii o dopuszczenie doustnej postaci inhibitora TAS-116 (Pimitepib) do leczenia podścieliskowego guza przewodu pokarmowego GIST (ang. GastroIntestinal Stromal Tumors) (<https://www.taiho.co.jp/en/release/2021/20210914.html>). Pimitepib hamuje aktywność HSP90, poprzez destabilizację i redukcję białek takich jak KIT, PDGFRA, HER2 i EGFR, które mają udział we wzroście i przeżywalności komórek nowotworowych. Został on zatwierdzony przez PMDA w Japonii jako terapia dla GIST w czerwcu 2022 roku (Hoy, 2022).

Należy dodać, że terapie skojarzone ukierunkowane na więcej niż jedno białko wydają się być bardziej obiecujące w leczeniu raka (Birbo i wsp., 2021). Takie terapie pozwalają na obniżenie stężenia farmaceutyków a tym samym na mniejszą toksyczność dla pacjentów. W tym kontekście nasza obserwacja, że kombinacja niskich stężeń α -MT i radicolu wykazuje synergistyczny efekt cytotoksyczny, w liniach komórkowych złośliwych nowotworów piersi, wydaje się być potencjalną strategią dla terapii skojarzonej (Ryc. 5.2.), podobnie jak w przypadku komórek raka trzustki, gdy α -metylotryptofan połączono z chemioterapią cytostatyczną gemcytabiną (Cai i wsp., 2020).



Ryc. 5.2. Zahamowanie SLC6A14 i HSP90-beta. Schematyczne przedstawienie efektu inhibitorów α -MT i radicicolu, na SLC6A14. Inhibicja HSP90-beta, poprzez radicicol, prowadzi do skierowania nieprawidłowo sfałdowanego transportera na ścieżkę degradacji proteasomalnej. Natomiast bloker α -MT, wpływając bezpośrednio na transporter, uniemożliwia jego prawidłowe funkcjonowanie w błonie plazmatycznej. Jak opisano w pracy (Połosak i wsp., 2022) inhibitory dodane do komórek osobno spowodowały wzrost cytotoxycyzności komórek a synergistyczne działanie kombinacji tych dwóch związków istotnie wzmocniło ten efekt.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

- Proteom transportera aminokwasów SLC6A14 zawiera białka szoku cieplnego (HSP).
- SLC6A14 (poprzez swój C-koniec) bezpośrednio oddziałuje z HSP90-beta.
- Inhibitor HSP90-beta zmniejsza obecność SLC6A14 w wyniku kierowania transportera na ścieżkę degradacji proteasomalnej.
- Peptydy odpowiadające fragmentom wybranym z C-końcowej sekwencji aminokwasowej SLC6A14 wpływają na aktywność ATPazy HSP90-beta.
- Proces fałdowania białek błony plazmatycznej może być kontrolowany nie tylko przez chaperony siateczki śródplazmatycznej, ale także te zlokalizowane w cytoplazmie.
- Inhibicja HSP90-beta obniża aktywność transportową SLC6A14 w liniach nowotworowych raka piersi ER- α^+ .
- Synteza transportera jest niższa w kontrolnych liniach nienowotworowych, a znacznie wyższa w nowotworowych liniach ER- α^+ .
- Kombinacja inhibitorów SLC6A14/ α -MT i HSP90-beta/radicicol działa synergistycznie wywołując silnie cytotoksyczny efekt w komórkach.

BIBLIOGRAFIA

1. Abramson, J., i Wright, Ernest M. 2009. „Structure and Function of Na(+)-Symporters with Inverted Repeats”. *Current Opinion in Structural Biology* 19 (4): 425–32. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.06.002>.
2. Adams, J. M., i Cory, S. 2007. „The Bcl-2 Apoptotic Switch in Cancer Development and Therapy”. *Oncogene* 26 (9): 1324–37. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>.
3. Adams, J., Palombella, V. J., Sausville, E. A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D. D., Maas, J., Pien, C. S., Prakash, S., i Elliott, P. J. 1999. „Proteasome Inhibitors: A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents”. *Cancer Research* 59 (11): 2615–22.
4. Alberti, G., Vergilio, G., Paladino L., Barone, R., Cappello, F., Conway de Macario, E., Macario, A. J. L., Bucchieri, F., i Rappa, F. 2022. „The Chaperone System in Breast Cancer: Roles and Therapeutic Prospects of the Molecular Chaperones Hsp27, Hsp60, Hsp70, and Hsp90”. *International Journal of Molecular Sciences* 23 (14): 7792. <https://doi.org/10.3390/ijms23147792>.
5. Ali, M. U., Roe, S. M., Vaughan, C. K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P. W., Prodromou, C., i Pearl, L. H. 2006. „Crystal Structure of an Hsp90-Nucleotide-P23/Sba1 Closed Chaperone Complex”. *Nature* 440 (7087): 1013–17. <https://doi.org/10.1038/nature04716>.
6. Allan, R. K., Mok, D., Ward, B. K. i Ratajczak, T. 2006. „Modulation of Chaperone Function and Cochaperone Interaction by Novobiocin in the C-Terminal Domain of Hsp90: EVIDENCE THAT COUMARIN ANTIBIOTICS DISRUPT Hsp90 DIMERIZATION *”. *Journal of Biological Chemistry* 281 (11): 7161–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512406200>.
7. Al-Ostoot, F. H., Salah, S., Khamees, H. A., i Ara Khanum, S. 2021. „Tumor Angiogenesis: Current Challenges and Therapeutic Opportunities”. *Cancer Treatment and Research Communications* 28:100422. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100422>.
8. Andersson, R., Aho A., Nilsson, B. I., Peters, G. J., Pastor-Anglada, M., Rasch, W., i Sandvold M. L. 2009. „Gemcitabine Chemoresistance in Pancreatic Cancer: Molecular Mechanisms and Potential Solutions”. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 44 (7): 782–86. <https://doi.org/10.1080/00365520902745039>.
9. Aragón, C., i López-Corcuera, B. 2005. „Glycine Transporters: Crucial Roles of Pharmacological Interest Revealed by Gene Deletion”. *Trends in Pharmacological Sciences* 26 (6): 283–86. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.04.007>.
10. Ashkenazi, A., Fairbrother, W. J., Leverson, J. D., i Souers, A. J. 2017. „From Basic Apoptosis Discoveries to Advanced Selective BCL-2 Family Inhibitors”. *Nature Reviews. Drug Discovery* 16 (4): 273–84. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.253>.
11. Avruch, J., Long, X., Ortiz-Vega, S., Rapley, J., Papageorgiou, A., i Dai, N. 2009. „Amino acid regulation of TOR complex 1”. *American Journal of*

- Physiology-Endocrinology and Metabolism* 296 (4): E592–602. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90645.2008>.
12. Babu, E., Bhutia Y. D., Ramachandran, S., Gnanaprakasam, J. P., Prasad, P. D., Thangaraju, M., i Ganapathy, V. 2015. „Deletion of the amino acid transporter Slc6a14 suppresses tumour growth in spontaneous mouse models of breast cancer”. *Biochemical Journal* 469 (1): 17–23. <https://doi.org/10.1042/BJ20150437>.
 13. Baeriswyl, V., i Christofori, G. 2009. „The angiogenic switch in carcinogenesis”. *Seminars in Cancer Biology, Angiogenesis in malignancy*, 19 (5): 329–37. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.05.003>.
 14. Bakthisaran, R., Tangirala, R., i Rao, C. M.. 2015. „Small Heat Shock Proteins: Role in Cellular Functions and Pathology”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1854 (4): 291–319. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.019>.
 15. Bala, P. A., Foster, J., Carvelli, L., i Henry, L. K. 2013. „SLC6 Transporters: Structure, Function, Regulation, Disease Association and Therapeutics”. *Molecular aspects of medicine* 34 (2–3): 197–219. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.002>.
 16. Balchin, D., Miličić, G., Strauss, M., Hayer-Hartl, M., i Hartl, F. U. 2018. „Pathway of Actin Folding Directed by the Eukaryotic Chaperonin TRiC”. *Cell* 174 (6): 1507-1521.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.006>.
 17. Baluk, P., Hashizume, H., i McDonald, D. M. 2005. „Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer”. *Current Opinion in Genetics & Development, Oncogenes and cell proliferation*, 15 (1): 102–11. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.12.005>.
 18. Bascos, N. A. D., i Landry, S. J. 2015. „Structural Rigidity Regulates Functional Interactions in the Hsp40-Hsp70 Molecular Machine”. *Biophysical Journal* 108 (2): 210a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.1160>.
 19. Basha, E., O’Neill, H., i Vierling, E. 2012. „Small Heat Shock Proteins and α -Crystallins: Dynamic Proteins with Flexible Functions”. *Trends in Biochemical Sciences* 37 (3): 106–17. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.005>.
 20. Bender, A., i Klopstock, T. 2016. „Creatine for Neuroprotection in Neurodegenerative Disease: End of Story?” *Amino Acids* 48 (8): 1929–40. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2165-0>.
 21. Bergers, G., i Benjamin, L. E. 2003. „Tumorigenesis and the Angiogenic Switch”. *Nature Reviews Cancer* 3 (6): 401–10. <https://doi.org/10.1038/nrc1093>.
 22. Bernardes de Jesus, B., i Blasco, M. A. 2013. „Telomerase at the Intersection of Cancer and Aging”. *Trends in Genetics: TIG* 29 (9): 513–20. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.007>.
 23. Berx, G., i van Roy, F. 2009. „Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (6): a003129. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003129>.
 24. Beuming, T., Shi, L., Javitch, J. A., i Weinstein, H. 2006. „A Comprehensive Structure-Based Alignment of Prokaryotic and Eukaryotic Neurotransmitter/Na⁺ Symporters (NSS) Aids in the Use of the LeuT

- Structure to Probe NSS Structure and Function". *Molecular Pharmacology* 70 (5): 1630–42. <https://doi.org/10.1124/mol.106.026120>.
25. Bhowmick, N. A., Neilson, E. G. i Moses, H. L. 2004. „Stromal Fibroblasts in Cancer Initiation and Progression". *Nature* 432 (7015): 332–37. <https://doi.org/10.1038/nature03096>.
 26. Bhutia, Y. D., Babu, E., Ramachandran, S., i Ganapathy, V. 2015. „Amino Acid Transporters in Cancer and Their Relevance to “Glutamine Addiction”: Novel Targets for the Design of a New Class of Anticancer Drugs". *Cancer Research* 75 (9): 1782–88. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3745>.
 27. Bhutia, Y. D., i Ganapathy, V. 2016. „Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Channels and transporters in cell metabolism*, 1863 (10): 2531–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.12.017>.
 28. Bhutia, Y. D., Wai Hung, S., Patel, B., Lovin, D., i Govindarajan, R. 2011. „CNT1 Expression Influences Proliferation and Chemosensitivity in Drug-Resistant Pancreatic Cancer Cells". *Cancer Research* 71 (5): 1825–35. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2736>.
 29. Bhutia, Y. D., Mathew, M., Sivaprakasam, S., Ramachandran, S., i Ganapathy, V. 2022. „Unconventional Functions of Amino Acid Transporters: Role in Macropinocytosis (SLC38A5/SLC38A3) and Diet-Induced Obesity/Metabolic Syndrome (SLC6A19/SLC6A14/SLC6A6)". *Biomolecules* 12 (2): 235. <https://doi.org/10.3390/biom12020235>.
 30. Birbo, B., Madu, E. E., Madu, C. O., Jain, A., i Lu, Y. 2021. „Role of HSP90 in Cancer". *International Journal of Molecular Sciences* 22 (19): 10317. <https://doi.org/10.3390/ijms221910317>.
 31. Blackburn, E. H., Epel, E. S., i Lin, J. 2015. „Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection". *Science* 350 (6265): 1193–98. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>.
 32. Blagg, B. S. J., i Kerr, T. D. 2006. „Hsp90 Inhibitors: Small Molecules That Transform the Hsp90 Protein Folding Machinery into a Catalyst for Protein Degradation". *Medicinal Research Reviews* 26 (3): 310–38. <https://doi.org/10.1002/med.20052>.
 33. Blasco, M. A. 2005. „Telomeres and Human Disease: Ageing, Cancer and Beyond". *Nature Reviews Genetics* 6 (8): 611–22. <https://doi.org/10.1038/nrg1656>.
 34. Bosia, M., Anselmetti, S., Pirovano, A., Ermoli, E., Marino, E., Bramanti, P., Smeraldi, E., i Cavallaro, R. 2010. „HTTLPR Functional Polymorphism in Schizophrenia: Executive Functions vs. Sustained Attention Dissociation". *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 34 (1): 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.10.001>.
 35. Botha, M., Pesce, E.-R., i Blatch, G. L. 2007. „The Hsp40 Proteins of Plasmodium Falciparum and Other Apicomplexa: Regulating Chaperone Power in the Parasite and the Host". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (10): 1781–1803. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.02.011>.
 36. Braakman, I., i Hebert, D. N. 2013. „Protein Folding in the Endoplasmic

- Reticulum". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (5): a013201. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013201>.
37. Brehmer, D., Rüdiger, S., Gässler, C. S., Klostermeier, D., Packschies, L., Reinstein, J., Mayer, M. P., i Bukau, B. 2001. „Tuning of Chaperone Activity of Hsp70 Proteins by Modulation of Nucleotide Exchange". *Nature Structural Biology* 8 (5): 427–32. <https://doi.org/10.1038/87588>.
 38. Breitling, J., i Aebi, M. 2013. „N-Linked Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (8): a013359. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013359>.
 39. Brocchieri, L., Conway de Macario, E., i Macario, A. J. L.. 2008. „Hsp70 Genes in the Human Genome: Conservation and Differentiation Patterns Predict a Wide Array of Overlapping and Specialized Functions". *BMC Evolutionary Biology* 8: 19. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-19>.
 40. Bröer, A., Tietze, N., Kowalczyk, S., Chubb, S., Munzinger, M., Bak, L. K., i Bröer, S. 2006. „The Orphan Transporter V7-3 (Slc6a15) Is a Na⁺-Dependent Neutral Amino Acid Transporter (B0AT2)". *The Biochemical Journal* 393 (Pt 1): 421–30. <https://doi.org/10.1042/BJ20051273>.
 41. Bröer, S. 2008. „Apical Transporters for Neutral Amino Acids: Physiology and Pathophysiology". *Physiology (Bethesda, Md.)* 23: 95–103. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2007>.
 42. Bröer, S., Bailey, C. G., Kowalczyk, S., Ng, C., Vanslambrouck, J. M., Rodgers, H., Auray-Blais, C., Cavanaugh, J. A., Bröer, A., i Rasko, J. E. J. 2008. „Iminoglycinuria and Hyperglycinuria Are Discrete Human Phenotypes Resulting from Complex Mutations in Proline and Glycine Transporters". *The Journal of Clinical Investigation* 118 (12): 3881–92. <https://doi.org/10.1172/JCI36625>.
 43. Bröer, S., i Gether, U. 2012. „The Solute Carrier 6 Family of Transporters". *British Journal of Pharmacology* 167 (2): 256–78. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01975.x>.
 44. Bröer, S., i Palacín, M. 2011. „The Role of Amino Acid Transporters in Inherited and Acquired Diseases". *The Biochemical Journal* 436 (2): 193–211. <https://doi.org/10.1042/BJ20101912>.
 45. Budakoti, M., Shikhar Panwar, A., Molpa, D., Singh, R. K., Büsselberg, D., Mishra, A. P., Melo Coutinho, H. D., i Nigam, M. 2021. „Micro-RNA: The Darkhorse of Cancer". *Cellular Signalling* 83 :109995. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.109995>.
 46. Bukau, B., Weissman, J., i Horwich A. 2006. „Molecular Chaperones and Protein Quality Control". *Cell* 125 (3): 443–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.014>.
 47. Burkhart, D. L., Morel, K. L., Sheahan, A. V., Richards, Z. A., i Ellis, L. 2019. „The Role of RB in Prostate Cancer Progression". *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1210:301–18. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32656-2_13.
 48. Burkhart, D. L., i Sage, J. 2008. „Cellular Mechanisms of Tumour Suppression by the Retinoblastoma Gene". *Nature Reviews Cancer* 8 (9): 671–82. <https://doi.org/10.1038/nrc2399>.
 49. Cady, S. G., i Sono, M. 1991. „1-Methyl-DL-Tryptophan, Beta-(3-Benzofuranyl)-DL-Alanine (the Oxygen Analog of Tryptophan), and Beta-[3-

- Benzo(b)Thienyl]-DL-Alanine (the Sulfur Analog of Tryptophan) Are Competitive Inhibitors for Indoleamine 2,3-Dioxygenase". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 291 (2): 326–33. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90142-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90142-6).
50. Cai, A., Zheng, H., Chen, Z., Lin, X., Li, C., Yao, Q., Bhutia, Y. D., Ganapathy, V., Chen, R., i Kou, L. 2020. „Synergism between SLC6A14 Blockade and Gemcitabine in Pancreatic Cancer: A 1H-NMR-Based Metabolomic Study in Pancreatic Cancer Cells". *The Biochemical Journal* 477 (10): 1923–37. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200275>.
 51. Cairns, R. A., Harris, I. S., i Mak, T. W. 2011. „Regulation of Cancer Cell Metabolism". *Nature Reviews. Cancer* 11 (2): 85–95. <https://doi.org/10.1038/nrc2981>.
 52. Calderwood, S. K. 2013. „Molecular Cochaperones: Tumor Growth and Cancer Treatment". *Scientifica* 2013:217513. <https://doi.org/10.1155/2013/217513>.
 53. Camarda, R., Zhou, A. Y., Kohnz, R. A., Balakrishnan, S., Mahieu, C., Anderton, B., Eyob, H., Kajimura, S., Tward, A., Krings, G., Nomura, D. K., Goga, A. 2016. „Inhibition of Fatty Acid Oxidation as a Therapy for MYC-Overexpressing Triple-Negative Breast Cancer". *Nature Medicine* 22 (4): 427–32. <https://doi.org/10.1038/nm.4055>.
 54. Camargo, S. M. R., Singer, D., Makrides, V., Huggel, K., Pos, K. M., Wagner, C. A., Kuba, K., Danilczyk, U., Skovby, F., Kleta, R., Penninger, J. M., Verrey, F. 2009. „Tissue-Specific Amino Acid Transporter Partners ACE2 and Collectrin Differentially Interact With Hartnup Mutations". *Gastroenterology* 136 (3): 872-882.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.055>.
 55. Cappello, F., Conway de Macario, E., Marasà, L., Zummo, G., i Macario, A. J. L. 2008. „Hsp60 Expression, New Locations, Functions and Perspectives for Cancer Diagnosis and Therapy". *Cancer Biology & Therapy* 7 (6): 801–9. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.6.6281>.
 56. Carmeliet, P. 2005. „VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer". *Oncology* 69 (Suppl. 3): 4–10. <https://doi.org/10.1159/000088478>.
 57. Carracedo, A., Cantley, L. C., i Pandolfi, P. P. 2013. „Cancer Metabolism: Fatty Acid Oxidation in the Limelight". *Nature Reviews Cancer* 13 (4): 227–32. <https://doi.org/10.1038/nrc3483>.
 58. Cha, Y. J., Eun-Sol K., i Ja Seung K. 2018. „Amino Acid Transporters and Glutamine Metabolism in Breast Cancer". *International Journal of Molecular Sciences* 19 (3): 907. <https://doi.org/10.3390/ijms19030907>.
 59. Chatterjee, N., Rollins, J., Mahowald, A. P., i Bazinet, C. 2011. „Neurotransmitter Transporter-Like: A Male Germline-Specific SLC6 Transporter Required for Drosophila Spermiogenesis". *PloS One* 6 (1): e16275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016275>.
 60. Chatterjee, S., i Burns, T. F. 2017. „Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach". *International Journal of Molecular Sciences* 18 (9): 1978. <https://doi.org/10.3390/ijms18091978>.
 61. Chen, L., Liu, S., i Tao, Y. 2020. „Regulating Tumor Suppressor Genes: Post-Translational Modifications". *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 90. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0196-9>.

62. Chène, P. 2002. „ATPases as Drug Targets: Learning from Their Structure”. *Nature Reviews. Drug Discovery* 1 (9): 665–73. <https://doi.org/10.1038/nrd894>.
63. Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., i Moses, H. L. 2008. „Transforming Growth Factor- β Signaling–Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion”. *Molecular Cancer Research* 6 (10): 1521–33. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2203>.
64. Chiba, P., Freissmuth, M., i Stockner, T. 2014. „Defining the blanks – Pharmacochaperoning of SLC6 transporters and ABC transporters”. *Pharmacological Research, Pharmacological Chaperones: On the Frontier of 21st Century Therapeutics*, 83: 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.009>.
65. Christensen, H. N. 1990. „Role of Amino Acid Transport and Countertransport in Nutrition and Metabolism”. *Physiological Reviews* 70 (1): 43–77. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.1.43>.
66. Christensen, H. N., Albritton, L. M., Kakuda, D. K., i MacLeod, C. L. 1994. „Gene-Product Designations for Amino Acid Transporters”. *The Journal of Experimental Biology* 196: 51–57. <https://doi.org/10.1242/jeb.196.1.51>.
67. Clausen, R. P., Madsen, K., Larsson, O. M., Frølund, B., Krogsgaard-Larsen, P., i Schousboe, A. 2006. „Structure-Activity Relationship and Pharmacology of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Transport Inhibitors”. *Advances in Pharmacology* (San Diego, Calif.) 54: 265–84. [https://doi.org/10.1016/s1054-3589\(06\)54011-6](https://doi.org/10.1016/s1054-3589(06)54011-6).
68. Coleman, J. A., Green, E. M., i Gouaux, E. 2016. „X-Ray Structures and Mechanism of the Human Serotonin Transporter”. *Nature* 532 (7599): 334–39. <https://doi.org/10.1038/nature17629>.
69. Coothankandaswamy, V., Cao, S., Xu, Y., Prasad, P. D., Singh, P. K., Reynolds, C. P., Yang, S., Ogura, J., Ganapathy, V., i Bhutia, Y. D. 2016. „Amino Acid Transporter SLC6A14 Is a Novel and Effective Drug Target for Pancreatic Cancer”. *British Journal of Pharmacology* 173 (23): 3292–3306. <https://doi.org/10.1111/bph.13616>.
70. Cordeiro, Q., Siqueira-Roberto, J., i Vallada, H. 2010. „Association between the SLC6A3 A1343G Polymorphism and Schizophrenia”. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 68: 716–19. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2010000500008>.
71. Cormerais, Y., Vučetić, M., Parks, S. K., i Pouyssegur, S. K. 2021. „Amino Acid Transporters Are a Vital Focal Point in the Control of mTORC1 Signaling and Cancer”. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (1): 23. <https://doi.org/10.3390/ijms22010023>.
72. Czeredys, M., Samluk, Ł., Michalec, K., Tułodziecka, K., Skowronek, K., i Nałęcz, K. A. 2013. „Caveolin-1—a Novel Interacting Partner of Organic Cation/Carnitine Transporter (Octn2): Effect of Protein Kinase C on This Interaction in Rat Astrocytes”. *PloS One* 8 (12): e82105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082105>.
73. Daugaard, M., Rohde, M., i Jäättelä, M. 2007. „The Heat Shock Protein 70 Family: Highly Homologous Proteins with Overlapping and Distinct Functions”. *FEBS Letters* 581 (19): 3702–10.

- <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.039>.
74. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., i Thompson, C. B. 2008. „The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation”. *Cell Metabolism* 7 (1): 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>.
 75. Deng, X., Sagata, N., Takeuchi, N., Tanaka, M., Ninomiya, H., Iwata, N., Ozaki, N., Shibata, H., i Fukumaki, Y. 2008. „Association Study of Polymorphisms in the Neutral Amino Acid Transporter Genes SLC1A4, SLC1A5 and the Glycine Transporter Genes SLC6A5, SLC6A9 with Schizophrenia”. *BMC Psychiatry* 8: 58. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-8-58>.
 76. Deshpande, A., Sicinski, P., i Hinds, P. W. 2005. „Cyclins and Cdks in Development and Cancer: A Perspective”. *Oncogene* 24 (17): 2909–15. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208618>.
 77. Donati, B., i Ciarrocchi, A. 2019. „Telomerase and Telomeres Biology in Thyroid Cancer”. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (12): 2887. <https://doi.org/10.3390/ijms20122887>.
 78. Donnelly, B. F., Needham, P. G., Snyder, A. C., Roy, A., Khadem, S., Brodsky, J. L., i Subramanya, A. R. 2013. „Hsp70 and Hsp90 Multichaperone Complexes Sequentially Regulate Thiazide-Sensitive Cotransporter Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and Biogenesis *”. *Journal of Biological Chemistry* 288 (18): 13124–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455394>.
 79. Du, D., Liu, C., Qin, M., Zhang, X., Xi, T., Yuan, S., Hao, H., i Xiong, J. 2022. „Metabolic dysregulation and emerging therapeutical targets for hepatocellular carcinoma”. *Acta Pharmaceutica Sinica*. B 12 (2): 558–80. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.09.019>.
 80. Duval, A. P., Jeanneret, C., Santoro, T., i Dormond, O. 2018. „mTOR and Tumor Cachexia”. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (8): 2225. <https://doi.org/10.3390/ijms19082225>.
 81. Easton, D. P., Kaneko, Y., i Subjeck, J. R. 2000. „The Hsp110 and Grp170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s”. *Cell Stress & Chaperones* 5 (4): 276–90.
 82. Eggen, T., Sager, G., Arnes, M., Pettersen, I., i Ørbo, A. 2011. „Expression of iNOS—a Favourable Prognostic Marker for Early-Stage Carcinoma of the Uterine Cervix”. *Anticancer Research* 31 (6): 2319–25.
 83. El-Kasaby, A., Just, H., Malle, E., Stolt-Bergner, P. C., Sitte, H. H., Freissmuth, M., i Kudlacek, O. 2010. „Mutations in the Carboxyl-Terminal SEC24 Binding Motif of the Serotonin Transporter Impair Folding of the Transporter *”. *Journal of Biological Chemistry* 285 (50): 39201–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118000>.
 84. El-Kasaby, A., Koban, F., Sitte, H. H., Freissmuth, M., i Sucic, S. 2014. „A Cytosolic Relay of Heat Shock Proteins HSP70-1A and HSP90 β Monitors the Folding Trajectory of the Serotonin Transporter”. *The Journal of Biological Chemistry* 289 (42): 28987–0. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.595090>.
 85. Elorza, A., Soro-Arnáiz, I., Meléndez-Rodríguez, F., Rodríguez-Vaello, V., Marsboom, G., de Cárcer, G., Acosta-Iborra, B., Albacete-Albacete, L.,

- Ordóñez, A., Serrano-Oviedo, L., Giménez-Bachs, J. M., Vara-Vega, A., Salinas, A., Sánchez-Prieto, R., del Río, R. M., Sánchez-Madrid, F., Malumbres, M., Landázuri, M. O., i Aragonés, J. 2012. „HIF2 α Acts as an mTORC1 Activator through the Amino Acid Carrier SLC7A5”. *Molecular Cell* 48 (5): 681–91. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.017>.
86. Evan, G., i Littlewood, T. 1998. „A Matter of Life and Cell Death”. *Science* 281 (5381): 1317–22. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1317>.
87. Falsone, S. F., Gesslbauer, B., Tirk, F., Piccinini, A. M., i Kungl, A. J. 2005. „A Proteomic Snapshot of the Human Heat Shock Protein 90 Interactome”. *FEBS Letters* 579 (28): 6350–54. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.020>.
88. Fernández-Fernández, M. R., Gragera, M., Ochoa-Ibarrola, L., Quintana-Gallardo, L., i Valpuesta, J. M. 2017. „Hsp70 - a Master Regulator in Protein Degradation”. *FEBS Letters* 591 (17): 2648–60. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12751>.
89. Ferrari, S. M., Fallahi, P., Galdiero, M. R., Ruffilli, I., Elia, G., Ragusa, F., Rosaria Paparo, S., Patrizio, A., Mazzi, V., Varricchi, G., Marone, G., Antonelli, A. 2019. „Immune and Inflammatory Cells in Thyroid Cancer Microenvironment”. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (18): 4413. <https://doi.org/10.3390/ijms20184413>.
90. Fidler, I. J. 2003. „The Pathogenesis of Cancer Metastasis: The «seed and Soil» Hypothesis Revisited”. *Nature Reviews Cancer* 3 (6): 453–58. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>.
91. Foster, J. D., i Vaughan, R. A. 2011. „Palmitoylation Controls Dopamine Transporter Kinetics, Degradation, and Protein Kinase C-Dependent Regulation”. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (7): 5175–86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187872>.
92. Fotiadis, D., Kanai, Y., i Palacín, M. 2013. „The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters”. *Molecular Aspects of Medicine, The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series)*, 34 (2): 139–58. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.007>.
93. Foulds, L. 1954. „The Experimental Study of Tumor Progression: A Review”. *Cancer Research* 14 (5): 327–39.
94. Freissmuth, M., Stockner, T., i Sucic, S. 2018. „SLC6 Transporter Folding Diseases and Pharmacochaperoning”. *Handbook of Experimental Pharmacology* 245: 249–70. https://doi.org/10.1007/164_2017_71.
95. Ganapathy, M. E., i Ganapathy, V. 2005. „Amino Acid Transporter ATB0,+ as a Delivery System for Drugs and Prodrugs”. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders* 5 (4): 357–64. <https://doi.org/10.2174/156800805774912953>.
96. Ganapathy, V., Inoue, K., Prasad, P. D., i Ganapathy, M. E. 2003. „Cellular uptake of amino acids: Systems and regulation”. *W Metabolic and Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition, Second Edition*, 63–78. CRC Press.
97. Ganapathy, V., Thangaraju, M., i Prasad, P. D. 2009. „Nutrient Transporters in Cancer: Relevance to Warburg Hypothesis and Beyond”. *Pharmacology & Therapeutics* 121 (1): 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.09.005>.

98. Ganapathy-Kanniappan, S., i Geschwind, J-F. H. 2013. „Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects”. *Molecular Cancer* 12 (12): 152. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-152>.
99. Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T-C., Lee, Y-S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K. I., De Marzo, A. M., Van Eyk, J. E., Mendell, J. T., Dang, C. V. 2009. „C-Myc Suppression of miR-23a/b Enhances Mitochondrial Glutaminase Expression and Glutamine Metabolism”. *Nature* 458 (7239): 762–65. <https://doi.org/10.1038/nature07823>.
100. Ghane ShahrbaF, F., i Assadi, F. 2015. „Drug-Induced Renal Disorders”. *Journal of Renal Injury Prevention* 4 (3): 57–60. <https://doi.org/10.12861/jrip.2015.12>.
101. Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., i Baradaran, B. 2015. „Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment”. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 16 (6): 2129–44. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.6.2129>.
102. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., i Nairn, R. 1977. „Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5”. *The Journal of General Virology* 36 (1): 59–74. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>.
103. Gupta, N., Miyauchi, S., Martindale, R. G., Herdman, A. V., Podolsky, R., Miyake, K., Mager, S., Prasad, P. D., Ganapathy, M. E., i Ganapathy, V. 2005. „Upregulation of the Amino Acid Transporter ATB_{0,+} (SLC6A14) in Colorectal Cancer and Metastasis in Humans”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1741 (1–2): 215–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.04.002>.
104. Gupta, N., Prasad, P. D., Ghamande, S., Moore-Martin, P., Herdman, A. V., Martindale, R. G., Podolsky, R., Mager, S., Ganapathy, M. E., i Ganapathy, V. 2006. „Up-Regulation of the Amino Acid Transporter ATB_{0,+} (SLC6A14) in Carcinoma of the Cervix”. *Gynecologic Oncology* 100 (1): 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.08.016>.
105. Gutierrez, L. S., i Gutierrez, J. 2021. „Thrombospondin 1 in Metabolic Diseases”. *Frontiers in Endocrinology* 12: 638536. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.638536>.
106. Gvozdenov, Z., Kolhe, J., i Freeman, B. C. 2019. „The Nuclear and DNA-Associated Molecular Chaperone Network”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11 (10): a034009. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034009>.
107. Hahn, M. K., i Blakely, R. D. 2007. „The Functional Impact of SLC6 Transporter Genetic Variation”. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47: 401–41. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105242>.
108. Halushka, M. K., Fan, J-B., Bentley, K., Hsie, L., Shen, N., Weder, A., Cooper, R., Lipshutz, R., i Chakravarti, A. 1999. „Patterns of Single-Nucleotide Polymorphisms in Candidate Genes for Blood-Pressure Homeostasis”. *Nature Genetics* 22 (3): 239–47. <https://doi.org/10.1038/10297>.
109. Hanahan, D., i Weinberg, R. A. 2000. „The Hallmarks of Cancer”. *Cell* 100 (1): 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).
110. Hanahan, D. 2022. „Hallmarks of Cancer: New Dimensions”. *Cancer Discovery* 12 (1): 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

111. Hanahan, D., i Folkman, J. 1996. „Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis”. *Cell* 86 (3): 353–64. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80108-7).
112. Hanahan, D., i Weinberg, R. A. 2011. „Hallmarks of Cancer: The next Generation”. *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
113. Hartl, F. U., Bracher, A., i Hayer-Hartl, M. 2011. „Molecular Chaperones in Protein Folding and Proteostasis”. *Nature* 475 (7356): 324–32. <https://doi.org/10.1038/nature10317>.
114. Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D., i Buchner, J. 2005. „Some like It Hot: The Structure and Function of Small Heat-Shock Proteins”. *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (10): 842–46. <https://doi.org/10.1038/nsmb993>.
115. Hassin, O., i Oren, M. 2023. „Drugging P53 in Cancer: One Protein, Many Targets”. *Nature Reviews. Drug Discovery* 22 (2): 127–44. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00571-8>.
116. Hatakeyama, S. 2017. „TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis”. *Trends in Biochemical Sciences* 42 (4): 297–311. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.002>.
117. Hatanaka, T., Nakanishi, T., Huang, W., Leibach, F. H., Prasad, P. D., Ganapathy, V., i Ganapathy, M. E. 2001. „Na⁺ - and Cl⁻ -Coupled Active Transport of Nitric Oxide Synthase Inhibitors via Amino Acid Transport System B(0,+).” *The Journal of Clinical Investigation* 107 (8): 1035–43. <https://doi.org/10.1172/JCI12060>.
118. Hatanaka, T., Haramura, M., Fei, Y.-J. , Miyauchi, S., Bridges, C. C., Ganapathy, P. S., Smith, S. B., Ganapathy, V., i Ganapathy, M. E. 2004. „Transport of Amino Acid-Based Prodrugs by the Na⁺- and Cl⁽⁻⁾ -Coupled Amino Acid Transporter ATB0,+ and Expression of the Transporter in Tissues Amenable for Drug Delivery”. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308 (3): 1138–47. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.057109>.
119. Hatanaka, T., Huang, W., Nakanishi, T., Bridges, C. C., Smith, S. B., Prasad, P. D., Ganapathy, M. E., i Ganapathy, V. 2002. „Transport of d-Serine via the Amino Acid Transporter ATB0,+ Expressed in the Colon”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291 (2): 291–95. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6441>.
120. Hayashi, K., Jutabha, P., Endou, H., i Anzai, N. 2012. „C-Myc Is Crucial for the Expression of LAT1 in MIA Paca-2 Human Pancreatic Cancer Cells”. *Oncology Reports* 28 (3): 862–66. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1878>.
121. Hediger, M. A., Clémenton, B., Burrier, R. E., i Bruford, E. A. 2013. „The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction”. *Molecular Aspects of Medicine, The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series)*, 34 (2): 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.009>.
122. Hoter, A., El-Sabban, M. E., i Naim, H. Y. 2018. „The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease”. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (9): 2560. <https://doi.org/10.3390/ijms19092560>.

123. Hou, D-Y., Muller, A. J., Sharma, M. D., DuHadaway, J., Banerjee, T., Johnson, M., Mellor, A. L., Prendergast, G. C., i Munn, D. H. 2007. „Inhibition of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Dendritic Cells by Stereoisomers of 1-Methyl-Tryptophan Correlates with Antitumor Responses”. *Cancer Research* 67 (2): 792–801. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2925>.
124. Hoy, S. M. 2022. „Pimipib: First Approval”. *Drugs* 82 (13): 1413–18. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01764-6>.
125. Hsu, P. P., i Sabatini, D. M. 2008. „Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond”. *Cell* 134 (5): 703–7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.021>.
126. Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., Mei, H., Liu, J., Wang, W., i Liu, Q. 2022. „Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities”. *MedComm* 3 (3): e161. <https://doi.org/10.1002/mco2.161>.
127. Huang, Y., Dai, Z., Barbacioru, C., i Sadée, W. 2005. „Cystine-Glutamate Transporter SLC7A11 in Cancer Chemosensitivity and Chemoresistance”. *Cancer Research* 65 (16): 7446–54. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4267>.
128. Hynes, N. E., i MacDonald, G. 2009. „ErbB receptors and signaling pathways in cancer”. *Current Opinion in Cell Biology, Cell regulation*, 21 (2): 177–84. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.010>.
129. Infantino, V., Santarsiero, A., Convertini, P., Todisco, S., i Lacobazzi, V. 2021. „Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target”. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 5703. <https://doi.org/10.3390/ijms22115703>.
130. Iqbal, Z., Willemsen, M. H., Papon, M. A., Musante, L., Benevento, B., Hu, H., Venselaar, H., Wissink-Lindhout, W. M., Vulto-van Silfhout, A. T., Vissers, L. E. L. M., de Brouwer, A. P. M., Marouillat, S., Wienker, T. F. , Ropers, H. H., Kahrizi, K., Kasri, N. N., Najmabadi, H., Laumonnier, F., Kleefstra, T., van Bokhoven, H. 2015. „Homozygous SLC6A17 Mutations Cause Autosomal-Recessive Intellectual Disability with Progressive Tremor, Speech Impairment, and Behavioral Problems”. *American Journal of Human Genetics* 96 (3): 386–96. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.01.010>.
131. Isaacs, J. S., Xu, W., i Neckers, L. 2003. „Heat Shock Protein 90 as a Molecular Target for Cancer Therapeutics”. *Cancer Cell* 3 (3): 213–17. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00029-1).
132. Ishida, R., Okamoto, T., Motojima, F., Kubota, H., Takahashi, H., Tanabe, M., Oka, T., Kitamura, A., Kinjo, M., Yoshida, M., Otaka, M., Grave, E., Itoh, H. 2018. „Physicochemical Properties of the Mammalian Molecular Chaperone HSP60”. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2): 489. <https://doi.org/10.3390/ijms19020489>.
133. Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, T., Oshima, H., Oshima, M., Ikeda, T., Asaba, R., Yagi, H., Masuko, T., Shimizu, T., Ishikawa, T., Kai, K., Takahashi, E., Imamura, Y., Baba, Y., Ohmura, M., Suematsu, M., Baba, H., Saya, H. 2011. „CD44 Variant Regulates Redox Status in Cancer Cells by Stabilizing the xCT Subunit of System Xc(-) and Thereby Promotes Tumor Growth”. *Cancer Cell* 19 (3): 387–400. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.038>.

134. Jain-Vakkalagadda, B., Pal, D., Gunda, S., Nashed, Y., Ganapathy, V., i Mitra, A. K. 2004. „Identification of a Na⁺-Dependent Cationic and Neutral Amino Acid Transporter, B(0,+), in Human and Rabbit Cornea”. *Molecular Pharmaceutics* 1 (5): 338–46. <https://doi.org/10.1021/mp0499499>.
135. Javitt, D. C. 2009. „Glycine Transport Inhibitors for the Treatment of Schizophrenia: Symptom and Disease Modification”. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 12 (4): 468–78.
136. Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P., i Duhr, S. 2011. „Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis”. *Assay and Drug Development Technologies* 9 (4): 342–53. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.0380>.
137. Jhaveri, K., Ochiana, S. O., Dunphy, M. PS., Gerecitano, J. F., Corben, A. D., Peter, R. I., Janjigian, Y. Y., Gomes-DaGama, E. M., Koren 3rd, J., Modi, S., Chiosis, G. 2014. „Heat shock protein 90 inhibitors in the treatment of cancer: current status and future directions”. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 23 (5): 611–28. <https://doi.org/10.1517/13543784.2014.902442>.
138. Jiang, X., Xin, H., Ren, Q., Gu, J., Zhu, L., Du, F., Feng, C., Xie, Y., Sha, X., i Fang, X. 2014. „Nanoparticles of 2-Deoxy-D-Glucose Functionalized Poly(Ethylene Glycol)-Co-Poly(Trimethylene Carbonate) for Dual-Targeted Drug Delivery in Glioma Treatment”. *Biomaterials* 35 (1): 518–29. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.094>.
139. Johnson, J. L. 2012. „Evolution and Function of Diverse Hsp90 Homologs and Cochaperone Proteins”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823 (3): 607–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.020>.
140. Jones, R. G., i Thompson, C. B. 2009. „Tumor Suppressors and Cell Metabolism: A Recipe for Cancer Growth”. *Genes & Development* 23 (5): 537–48. <https://doi.org/10.1101/gad.1756509>.
141. Judasz, E., Lisiak, N., Kopczyński, P., Taube, M., i Rubiś, B. 2022. „The Role of Telomerase in Breast Cancer’s Response to Therapy”. *International Journal of Molecular Sciences* 23 (21): 12844. <https://doi.org/10.3390/ijms232112844>.
142. Junttila, M. R., i Evan, G. I. 2009. „P53 — a Jack of All Trades but Master of None”. *Nature Reviews Cancer* 9 (11): 821–29. <https://doi.org/10.1038/nrc2728>.
143. Juraszek, B., Czarnecka-Herok, J., i Nałęcz, K. A. 2021. „Glioma Cells Survival Depends Both on Fatty Acid Oxidation and on Functional Carnitine Transport by SLC22A5”. *Journal of Neurochemistry* 156 (5): 642–57. <https://doi.org/10.1111/jnc.15124>.
144. Juraszek, B., i Nałęcz, K. A. 2020. „SLC22A5 (OCTN2) Carnitine Transporter—Indispensable for Cell Metabolism, a Jekyll and Hyde of Human Cancer”. *Molecules* 25 (1): 14. <https://doi.org/10.3390/molecules25010014>.
145. Just, H., Sitte, H. H., Schmid, J. A., Freissmuth, M., i Kudlacek, O. 2004. „Identification of an Additional Interaction Domain in Transmembrane Domains 11 and 12 That Supports Oligomer Formation in the Human Serotonin Transporter”. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (8): 6650–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306092200>.

146. Kaira, K., Oriuchi, N., Imai, H., Shimizu, K., Yanagitani, N., Sunaga, N., Hisada, T., Tanaka, S., Ishizuka, T., Kanai, Y., Endou, H., Nakajima, T., Mori, M. 2008. „L-Type Amino Acid Transporter 1 and CD98 Expression in Primary and Metastatic Sites of Human Neoplasms”. *Cancer Science* 99 (12): 2380–86. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00969.x>.
147. Kandasamy, P., Gyimesi, G., Kanai, Y., i Hediger, M. A. 2018. „Amino Acid Transporters Revisited: New Views in Health and Disease”. *Trends in Biochemical Sciences* 43 (10): 752–89. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.05.003>.
148. Kanner, B. I. 2006. „Structure and Function of Sodium-Coupled GABA and Glutamate Transporters”. *The Journal of Membrane Biology* 213 (2): 89–100. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0877-5>.
149. Karunakaran, S., Ramachandran, S., Coothankandaswamy, V., Elangovan, S., Babu, E., Periyasamy-Thandavan, S., Gurav, A., Gnanaprakasam, J. P., Singh, N., Schoenlein, P. V., Prasad, P. D., Thangaraju, M., Ganapathy, V. 2011. „SLC6A14 (ATB0,+) Protein, a Highly Concentrative and Broad Specific Amino Acid Transporter, Is a Novel and Effective Drug Target for Treatment of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer”. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (36): 31830–38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229518>.
150. Karunakaran, S., Umopathy, N. S., Thangaraju, M., Hatanaka, T., Itagaki, S., Munn, D. H., Prasad, P. D., i Ganapathy, V. 2008. „Interaction of tryptophan derivatives with SLC6A14 (ATB0,+) reveals the potential of the transporter as a drug target for cancer chemotherapy”. *Biochemical Journal* 414 (3): 343–55. <https://doi.org/10.1042/BJ20080622>.
151. Kazerounian, S., K., Yee, O., i Lawler, J. 2008. „Thrombospondins: From Structure to Therapeutics”. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (5): 700. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7486-z>.
152. Kessenbrock, K., Plaks, V., i Werb, Z. 2010. „Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment”. *Cell* 141 (1): 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>.
153. Keuerleber, S., Gsandtner, I., i Freissmuth M. 2011. „From Cradle to Twilight: The Carboxyl Terminus Directs the Fate of the A(2A)-Adenosine Receptor”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808 (5): 1350–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.05.009>.
154. Khabirova, E., Moloney, A., Marciniak, S. J., Williams, J., Lomas, D. A., Oliver, S. G., Favrin, G., Sattelle, D. B., i Crowther, D. C. 2014. „The TRiC/CCT Chaperone Is Implicated in Alzheimer’s Disease Based on Patient GWAS and an RNAi Screen in A β -Expressing *Caenorhabditis Elegans*”. *PloS One* 9 (7): e102985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102985>.
155. Kido, Y., Tamai, I., Ohnari, A., Sai, Y., Kagami, T., Nezu, J., Nikaido, H., Hashimoto, N., Asano, M., i Tsuji, A. 2001. „Functional Relevance of Carnitine Transporter OCTN2 to Brain Distribution of L-Carnitine and Acetyl-L-Carnitine across the Blood-Brain Barrier”. *Journal of Neurochemistry* 79 (5): 959–69. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00621.x>.
156. Kim, C. H., Hahn, M. K., Joung, Y., Anderson, S. L., Steele, A. H., Mazei-

- Robinson, M. S., Gizer, I., Teicher, M. H., Cohen, B. M., Robertson, D., Waldman, I. D., Blakely, R. D., Kim, K. S. 2006. „A polymorphism in the norepinephrine transporter gene alters promoter activity and is associated with attention-deficit hyperactivity disorder”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (50): 19164–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510836103>.
157. Kim, J. H., Cheong, H. S., Park, B. L., Bae, J. S., Jung, S., Yoon, S. H., Park, J. S., Jang, A. S., Park, S. W., Uh, S. T., Kim, Y. H., Hwang, H. K., Park, C. S., Shin, H. D. 2010. „A New Association between Polymorphisms of the SLC6A7 Gene in the Chromosome 5q31-32 Region and Asthma”. *Journal of Human Genetics* 55 (6): 358–65. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.34>.
158. Kim, J., Lee, J., i Iyer, V. R. 2008. „Global Identification of Myc Target Genes Reveals Its Direct Role in Mitochondrial Biogenesis and Its E-Box Usage In Vivo”. *PLOS ONE* 3 (3): e1798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001798>.
159. Kim, R. 2007. „Chapter 2 - Cancer Immunoediting: From Immune Surveillance to Immune Escape”. *W Cancer Immunotherapy*, zredagowane przez George C. Prendergast i Elizabeth M. Jaffee, 9–27. Burlington: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012372551-6/50066-3>.
160. Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., i Hartl, F. U. 2013. „Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis”. *Annual Review of Biochemistry* 82: 323–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>.
161. Kityk, R., Kopp, J., i Mayer, M. P. 2018. „Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones”. *Molecular Cell* 69 (2): 227-237.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.003>.
162. Kityk, R., Kopp, J., Sinning, I., i Mayer, M. P. 2012. „Structure and Dynamics of the ATP-Bound Open Conformation of Hsp70 Chaperones”. *Molecular Cell* 48 (6): 863–74. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.023>.
163. Kohli, M. A., Lucae, S., Saemann, P. G., Schmidt, M. V., Demirkan, A., Hek, K., Czamara, D., Alexander, M., Salyakina, D., Ripke, S., Hoehn, D., Specht, M., Menke, A., Hennings, J., Heck, A., Wolf, C., Ising, M., Schreiber, S., Czisch, M., Müller, M. B., Uhr, M., Bettecken, T., Becker, A., Schramm, J., Rietschel, M., Maier, W., Bradley, B., Ressler, K. J., Nöthen, M. M., Cichon, S., Craig, I. W., Breen, G., Lewis, C. M., Hofman, A., Tiemeier, H., van Duijn, C. M., Holsboer, F., Müller-Myhsok, B., Binder, E. B. 2011. „The Neuronal Transporter Gene SLC6A15 Confers Risk to Major Depression”. *Neuron* 70 (2): 252–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.005>.
164. Kou, L., Yao, Q., Sun, M., Wu, C., Wang, J., Luo, Q., Wang, G., Du, Y., Fu, Q., Wang, J., He, Z., Ganapathy, V., i Sun, J. 2017. „Cotransporting Ion Is a Trigger for Cellular Endocytosis of Transporter-Targeting Nanoparticles: A Case Study of High-Efficiency SLC22A5 (OCTN2)-Mediated Carnitine-Conjugated Nanoparticles for Oral Delivery of Therapeutic Drugs”. *Advanced Healthcare Materials* 6 (17): 1700165. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700165>.
165. Kovalchuk, V., i Nałęcz, K. A. 2021. „Trafficking to the Cell Surface of Amino Acid Transporter SLC6A14 Upregulated in Cancer Is Controlled by Phosphorylation of SEC24C Protein by AKT Kinase”. *Cells* 10 (7): 1800.

- <https://doi.org/10.3390/cells10071800>.
166. Kovalchuk, V., Samluk, Ł., Juraszek, B., Jurkiewicz-Trząska, D., Sucic, S., Freissmuth, M., i Nałęcz, K. A. 2019. „Trafficking of the Amino Acid Transporter B0,+ (SLC6A14) to the Plasma Membrane Involves an Exclusive Interaction with SEC24C for Its Exit from the Endoplasmic Reticulum”. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1866 (2): 252–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.11.005>.
 167. Kriegenburg, F., Ellgaard, L., i Hartmann-Petersen, R. 2012. „Molecular Chaperones in Targeting Misfolded Proteins for Ubiquitin-Dependent Degradation”. *The FEBS Journal* 279 (4): 532–42. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08456.x>.
 168. Kristensen, A. S., Andersen, J., Jørgensen, T. N., Sørensen, L., Eriksen, J., Loland, C. J., Strømgaard, K., i Gether, U. 2011. „SLC6 Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation”. *Pharmacological Reviews* 63 (3): 585–640. <https://doi.org/10.1124/pr.108.000869>.
 169. Kurian, M. A., Zhen, J., Cheng, S. Y., Li, Y., Mordekar, S. R., Jardine, P., Morgan, N. V., Meyer, E., Tee, L., Pasha, S., Wassmer, E., Heales, S. J. R., Gissen, P., Reith, M. E. A., Maher, E. R. 2009. „Homozygous loss-of-function mutations in the gene encoding the dopamine transporter are associated with infantile parkinsonism-dystonia”. *The Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1595–1603. <https://doi.org/10.1172/JCI39060>.
 170. Laemmli, U. K. 1970. „Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4”. *Nature* 227 (5259): 680–85. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
 171. Lang, Florian. 2007. „Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation”. *Journal of the American College of Nutrition* 26 (5 Suppl): 613S-623S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2007.10719667>.
 172. Laufen, T., Mayer, M. P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J., i Bukau, B. 1999. „Mechanism of Regulation of Hsp70 Chaperones by DnaJ Cochaperones”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10): 5452–57. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5452>.
 173. Lederkremer, G. Z. 2009. „Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation”. *Current Opinion in Structural Biology, Carbohydrates and glycoconjugates / Biophysical methods*, 19 (5): 515–23. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.06.004>.
 174. Lee, J. S., Oh, J. T., Kim, J. H., Seo, J. M., Kim, D. Y., Park, K. W., Kim, H. Y., Jung, K., Park, B. L., Koh, I., Shin, H. D. 2016. „Association Analysis of SLC6A20 Polymorphisms With Hirschsprung Disease”. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 62 (1): 64–70. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000880>.
 175. Lee, K., Hong, T. J. , i Hahn, J. S. 2012. „Roles of 17-AAG-induced molecular chaperones and Rma1 E3 ubiquitin ligase in folding and degradation of Pendrin”. *FEBS Letters* 586 (16): 2535–41. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.023>.
 176. Lee, S. T., Muralidharan, V., Tebbutt, N., Wong, P., Fang, C., Liu, Z., Gan, H., Sachinidis, J., Pathmaraj, K., Christophi, C., Scott, A. M. 2021. „Prevalence of Hypoxia and Correlation with Glycolytic Metabolism and Angiogenic

- Biomarkers in Metastatic Colorectal Carcinoma". *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 48 (5): 1585–92. <https://doi.org/10.1007/s00259-020-05074-5>.
177. Lewerenz, J., Hewett, S. J., Huang, Y., Lambros, M., Gout, P. W., Kalivas, P. W., Massie, A., Smolders, I., Methner, A., Pergande, M., Smith, S. B., Ganapathy, V., i Maher, P. 2013. „The Cystine/Glutamate Antiporter System xc⁻ in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities". *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (5): 522–55. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4391>.
 178. Li, J., Soroka, J., i Buchner J. 2012. „The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823 (3): 624–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.003>.
 179. Li, L., Di, X., Zhang, S., Kan, Q., Liu, H., Lu, T., Wang, Y., Fu, Q., Sun, J., i He, Z. 2016. „Large Amino Acid Transporter 1 Mediated Glutamate Modified Docetaxel-Loaded Liposomes for Glioma Targeting". *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 141: 260–67. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.041>.
 180. Liang, Z., Cho, H. T., Williams, L., Zhu, A., Liang, K., Huang, K., Wu, H., Jiang, C., Hong, S., Crowe, R., Goodman, M. M., Shim, H. 2011. „Potential Biomarker of L-type Amino Acid Transporter 1 in Breast Cancer Progression". *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 45 (2): 93–102. <https://doi.org/10.1007/s13139-010-0068-2>.
 181. Lianos, G. D., Alexiou, G. A., Mangano, A., Mangano, A., Rausei, S., Boni, L., Dionigi, G., i Roukos, D. H. 2015. „The role of heat shock proteins in cancer". *Cancer Letters* 360 (2): 114–18. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.026>.
 182. Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C., i Zylicz, M. 1991. „Escherichia Coli DnaJ and GrpE Heat Shock Proteins Jointly Stimulate ATPase Activity of DnaK". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (7): 2874–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.7.2874>.
 183. Ling, Y., van Herpt, T. T. W., van Hoek, M., Dehghan, A., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., Jiang, S., Lieverse, A. G., Bravenboer, B., Lu, D., van Duijn, C. M., Gao, X., Sijbrands, E. J. G. 2014. „A Genetic Variant in SLC6A20 Is Associated with Type 2 Diabetes in White-European and Chinese Populations". *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 31 (11): 1350–56. <https://doi.org/10.1111/dme.12528>.
 184. Lisanti, S., Tavecchio, M., Chae, Y. C., Liu, Q., Brice, A. K., Thakur, M. L., Languino, L. R., i Altieri, D. C. 2014. „Deletion of the Mitochondrial Chaperone TRAP-1 Uncovers Global Reprogramming of Metabolic Networks". *Cell Reports* 8 (3): 671–77. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.061>.
 185. Locasale, J. W. 2013. „Serine, Glycine and One-Carbon Units: Cancer Metabolism in Full Circle". *Nature Reviews Cancer* 13 (8): 572–83. <https://doi.org/10.1038/nrc3557>.
 186. Lord, C., Ferro-Novick, S., i Miller, E. A. 2013. „The Highly Conserved COPII Coat Complex Sorts Cargo from the Endoplasmic Reticulum and Targets

- It to the Golgi". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (2): a013367. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013367>.
187. Lowe, S. W., Cepero, E., i Evan, G. 2004. „Intrinsic Tumour Suppression". *Nature* 432 (7015): 307–15. <https://doi.org/10.1038/nature03098>.
 188. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., i Randall, R. J. 1951. „Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent". *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265–75.
 189. Luo, Q., Gong, P., Sun, M., Kou, L., Ganapathy, V., Jing, Y., He, Z., i Sun, J. 2016. „Transporter Occluded-State Conformation-Induced Endocytosis: Amino Acid Transporter ATB0,+Mediated Tumor Targeting of Liposomes for Docetaxel Delivery for Hepatocarcinoma Therapy". *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 243 (12):370–80. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.10.031>.
 190. Lyons, S. A., Joon Chung, W., Weaver, A. K., Ogunrinu, T., i Sontheimer, H. 2007. „Autocrine Glutamate Signaling Promotes Glioma Cell Invasion". *Cancer Research* 67 (19): 9463–71. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2034>.
 191. Ma, Y., Temkin, S. M., Hawkrige, A. M., Guo, C., Wang, W., Wang, X. Y., i Fang, X. 2018. „Fatty Acid Oxidation: An Emerging Facet of Metabolic Transformation in Cancer". *Cancer Letters* 435: 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.08.006>.
 192. Machado-Silva, A., Perrier, S., i Bourdon, J. C. 2010. „p53 family members in cancer diagnosis and treatment". *Seminars in Cancer Biology* 20 (1): 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.02.005>.
 193. Madsen, K. K., White, H. S., i Schousboe, A. 2010. „Neuronal and Non-Neuronal GABA Transporters as Targets for Antiepileptic Drugs". *Pharmacology & Therapeutics* 125 (3): 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.11.007>.
 194. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., i Balkwill, F. 2008. „Cancer-Related Inflammation". *Nature* 454 (7203): 436–44. <https://doi.org/10.1038/nature07205>.
 195. Marzec, M., Eletto, D., i Argon, Y. 2012. „GRP94: An HSP90-like Protein Specialized for Protein Folding and Quality Control in the Endoplasmic Reticulum". *Biochimica et Biophysica Acta* 1823 (3): 774–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.10.013>.
 196. Massey, A. J., Williamson, D. S., Browne, H., Murray, J. B., Dokurno, P., Shaw, T., Macias, A. T., Daniels, Z., Geoffroy, S., Dopson, M., Lavan, P., Matassova, N., Francis, G. L., Graham, C. J., Parsons, R., Wang, Y., Padfield, A., Comer, M., Drysdale, M. J., i Wood, M. 2010. „A Novel, Small Molecule Inhibitor of Hsc70/Hsp70 Potentiates Hsp90 Inhibitor Induced Apoptosis in HCT116 Colon Carcinoma Cells". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 66 (3): 535–45. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1194-3>.
 197. Matsui, T., Sekiguchi, M., Hashimoto, A., Tomita, U., Nishikawa, T., i Wada, K. 1995. „Functional Comparison of D-Serine and Glycine in Rodents: The Effect on Cloned NMDA Receptors and the Extracellular Concentration". *Journal of Neurochemistry* 65 (1): 454–58. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65010454.x>.

198. Matsumoto, K., Shimodaira, M., Nakagawa, T., Nakayama, T., Nakazato, T., Izumi, Y., Soma, M., Matsumoto, K., Sato, N., i Aoi, N. 2011. „Association study: SLC6A18 gene and myocardial infarction”. *Clinical Biochemistry* 44 (10): 789–94. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.03.031>.
199. Mayer, M. P., i Gierasch, L. M. 2019. „Recent Advances in the Structural and Mechanistic Aspects of Hsp70 Molecular Chaperones”. *Journal of Biological Chemistry* 294 (6): 2085–97. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002810>.
200. McLaughlin, S. H., Smith, H. W., i Jackson, S. E. 2002. „Stimulation of the Weak ATPase Activity of Human Hsp90 by a Client Protein”. *Journal of Molecular Biology* 315 (4): 787–98. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5245>.
201. Mehrotra, S., i Mittra, I. 2020. „Origin of Genome Instability and Determinants of Mutational Landscape in Cancer Cells”. *Genes* 11 (9): 1101. <https://doi.org/10.3390/genes11091101>.
202. Melincovici, C. S., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I. M., Roman, A. L., i Mişu, C. M. 2018. „Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - Key Factor in Normal and Pathological Angiogenesis”. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie* 59 (2): 455–67.
203. Mendonsa, A. M., Na, T. Y., i Gumbiner, B. M. 2018. „E-Cadherin in Contact Inhibition and Cancer”. *Oncogene* 37 (35): 4769–80. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0304-2>.
204. Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S. M., Panaretou, B., Piper, P. W., i Pearl, L. H. 2003. „Structural and Functional Analysis of the Middle Segment of Hsp90: Implications for ATP Hydrolysis and Client Protein and Cochaperone Interactions”. *Molecular Cell* 11 (3): 647–58. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00065-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00065-0).
205. Michalec, K., Mysiorek, C., Kuntz, M., Bérézowski, V., Szczepankiewicz, A. A., Wilczyński, G. M., Cecchelli, R., i Nałęcz, K. A. 2014. „Protein Kinase C Restricts Transport of Carnitine by Amino Acid Transporter ATB(0,+)
Apically Localized in the Blood-Brain Barrier”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 554: 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.006>.
206. Minoia, M., Grit, C., i Kampinga, H. H. 2014. „HSPA1A-Independent Suppression of PARK2 C289G Protein Aggregation by Human Small Heat Shock Proteins”. *Molecular and Cellular Biology* 34 (19): 3570–78. <https://doi.org/10.1128/MCB.00698-14>.
207. Misselwitz, B., Staeck, O., i Rapoport, T. A. 1998. „J Proteins Catalytically Activate Hsp70 Molecules to Trap a Wide Range of Peptide Sequences”. *Molecular Cell* 2 (5): 593–603. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80158-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80158-6).
208. Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Langen, H., i Bukau, B. 1999. „Identification of thermolabile Escherichia coli proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB.” *The EMBO Journal* 18 (24): 6934–49. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.6934>.
209. Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H. Y., Lin, L. T., Siegelin, M. D., Fimognari, C., Kumar, N. B., Dou, Q. P., Yang, H., Samadi, A. K., Russo, G. L., Spagnuolo, C., Ray, S. K., Chakrabarti, M., Morre, J. D.,

- Coley, H. M., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S. S., Helferich, W. G., Yang, X., Boosani, C. S., Guha, G., Bhakta, D., Ciriolo, M. R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S. I., Keith, W. N., Bilisland, A., Halicka, D., Nowsheen, S., Azmi, A. S., 2015. „Broad Targeting of Resistance to Apoptosis in Cancer”. *Seminars in Cancer Biology* 35 Suppl (0): S78–103. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.001>.
210. Mollapour, M., i Neckers, L. 2012. „Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Heat Shock Protein 90 (Hsp90), 1823 (3): 648–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.07.018>.
211. Monaco, M. E. 2017. „Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes”. *Oncotarget* 8 (17): 29487–500. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15494>.
212. Morgner, N., Schmidt, C., Beilsten-Edmands, V., Ebong, I-o., Patel, N. A., Clerico, E. M., Kirschke, E., Daturpalli, S., Jackson, S. E., Agard, D., Robinson, C. V., 2015. „Hsp70 Forms Antiparallel Dimers Stabilized by Post-translational Modifications to Position Clients for Transfer to Hsp90”. *Cell Reports* 11 (5): 759–69. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.063>.
213. Munck, B. G., i Schultz, S. G. 1969. „Interactions between leucine and lysine transport in rabbit ileum”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 183 (1): 182–93. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(69\)90142-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(69)90142-4).
214. Murphy, M. E. 2013. „The HSP70 family and cancer”. *Carcinogenesis* 34 (6): 1181–88. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt111>.
215. Murshid, A., Prince, T. L., Lang, B., i Calderwood, S. K. 2018. „Role of Heat Shock Factors in Stress-Induced Transcription”. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1709: 23–34. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_2.
216. Nakamura, M. T., Yudell, B. E., i Loor, J. J. 2014. „Regulation of Energy Metabolism by Long-Chain Fatty Acids”. *Progress in Lipid Research* 53: 124–44. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.12.001>.
217. Nakanishi, T., Hatanaka, T., Huang, W., Prasad, P. D., Leibach, F. H., Ganapathy, M. E., i Ganapathy, V. 2001. „Na⁺- and Cl⁻-Coupled Active Transport of Carnitine by the Amino Acid Transporter ATB(0,+)₁ from Mouse Colon Expressed in HRPE Cells and Xenopus Oocytes”. *The Journal of Physiology* 532 (Pt 2): 297–304. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0297f.x>.
218. Nałęcz, K. A., Bolli, R., Wojtczak, L., i Azzi, A. 1986. „The Monocarboxylate Carrier from Bovine Heart Mitochondria: Partial Purification and Its Substrate-Transporting Properties in a Reconstituted System”. *Biochimica et Biophysica Acta* 851 (1): 29–37. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(86\)90245-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(86)90245-8).
219. Nałęcz, K. A. 2020. „Amino Acid Transporter SLC6A14 (ATB0,+)₁ - A Target in Combined Anti-Cancer Therapy”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:594464. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.594464>.

220. Negrini, S., Gorgoulis, V. G., i Halazonetis T. D. 2010. „Genomic Instability – an Evolving Hallmark of Cancer”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (3): 220–28. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>.
221. Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V. E., MacKeigan, J. P., Porter, J. A., Wang, Y. K., Cantley, L. C., Finan, P. M., Murphy, L. O. 2009. „Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy”. *Cell* 136 (3): 521–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.044>.
222. Njunge, J. M., Mandal, P., Przyborski, J. M., Boshoff, A., Pesce, E. R., i Blatch, G. L. 2015. „PFB0595w Is a Plasmodium Falciparum J Protein That Co-Localizes with PfHsp70-1 and Can Stimulate Its in Vitro ATP Hydrolysis Activity”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 62: 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.02.008>.
223. Oakes, S. A., i Papa, F. R. 2015. „The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology”. *Annual Review of Pathology* 10: 173–94. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104649>.
224. Odunewu-Aderibigbe, A., i Fliegel, L. 2017. „Protein mediated regulation of the NHE1 isoform of the Na⁺/H⁺ exchanger in renal cells. A regulatory role of Hsp90 and AKT kinase”. *Cellular Signalling* 36: 145–53. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.05.003>.
225. Osada, T., Kaneko, K., Gwin, W. R., Morse, M. A., Hobeika, A., Pogue, B. W., Hartman, Z. C., Hughes, P. F., Haystead, T., i Lysterly, H. K. 2017. „In Vivo Detection of HSP90 Identifies Breast Cancers with Aggressive Behavior”. *Clinical Cancer Research* 23 (24): 7531–42. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1453>.
226. Ostermann, J., A., Horwich, L., Neupert, W., i Hartl, F. U. 1989. „Protein Folding in Mitochondria Requires Complex Formation with Hsp60 and ATP Hydrolysis”. *Nature* 341 (6238): 125–30. <https://doi.org/10.1038/341125a0>.
227. Palazzolo, L., Paravicini, C., Laurenzi, T., Adobati, S., Saporiti, S., Guerrini, U., Gianazza, E., Indiveri, C., Anderson, C. M. H., Thwaites, D. T., i Eberini, I. 2019. „SLC6A14, a Pivotal Actor on Cancer Stage: When Function Meets Structure”. *SLAS Discovery* 24 (9): 928–38. <https://doi.org/10.1177/2472555219867317>.
228. Papierniak-Wyglądała, A., Lamch, W., Jurewicz, E., i Nałęcz, K. A. 2023. „The activity and surface presence of organic cation/carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5) in breast cancer cells depends on AKT kinase”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 742 (lipiec):109616. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2023.109616>.
229. Parra, L. A., Baust, T., El Mestikawy, S., Quiroz, M., Hoffman, B., Haflett, J. M., Yao, J. K., i Torres, G. E. 2008. „The Orphan Transporter Rxt1/NTT4 (SLC6A17) Functions as a Synaptic Vesicle Amino Acid Transporter Selective for Proline, Glycine, Leucine, and Alanine”. *Molecular Pharmacology* 74 (6): 1521–32. <https://doi.org/10.1124/mol.108.050005>.
230. Patel, K., Wen, J., Magliocca, K., Muller, S., Liu, Y., Chen, Z. G., Saba, N., i Diaz, R. 2014. „Heat Shock Protein 90 (HSP90) Is Overexpressed in P16-Negative Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma, and Its Inhibition in Vitro Potentiates the Effects of Chemoradiation”. *Cancer Chemotherapy*

- and Pharmacology* 74 (5): 1015–22. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2584-8>.
231. Pavlova, N. N., Zhu, J., i Thompson, C. B. 2022. „The Hallmarks of Cancer Metabolism: Still Emerging”. *Cell Metabolism* 34 (3): 355–77. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.01.007>.
 232. Penheiter, A. R., Erdogan, S., Murphy, S. J., Hart, S. N., Lima, J. F., Rohakhtar, F. R., O'Brien, D. R., Bamlet, W. R., Wuertz, R. E., Smyrk, T. C., Couch, F. J., Vasmatazis, G., Bender, C. E., i Carlson, S. K. 2015. „Transcriptomic and Immunohistochemical Profiling of SLC6A14 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma”. *BioMed Research International* 2015: 593572. <https://doi.org/10.1155/2015/593572>.
 233. Perazella, M. A. 2003. „Drug-Induced Renal Failure: Update on New Medications and Unique Mechanisms of Nephrotoxicity”. *The American Journal of the Medical Sciences* 325 (6): 349–62. <https://doi.org/10.1097/00000441-200306000-00006>.
 234. Perona, R. 2006. „Cell Signalling: Growth Factors and Tyrosine Kinase Receptors”. *Clinical and Translational Oncology* 8 (2): 77–82. <https://doi.org/10.1007/s12094-006-0162-1>.
 235. Phang, J. M., Liu, W., Hancock, C. N., i Fischer, J. W. 2015. „Proline metabolism and cancer: emerging links to glutamine and collagen”. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 18 (1): 71–77. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000121>.
 236. Piotrowski, I., Kulcenty, K., i Suchorska, W. 2020. „Interplay between Inflammation and Cancer”. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy: Journal of Great Poland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology* 25 (3): 422–27. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2020.04.004>.
 237. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., i D'Orazi, G. 2016. „Apoptosis as Anticancer Mechanism: Function and Dysfunction of Its Modulators and Targeted Therapeutic Strategies”. *Aging* 8 (4): 603–19. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>.
 238. Pizzagalli, M. D., Bensimon, A., i Superti-Furga, G. 2021. „A guide to plasma membrane solute carrier proteins”. *The Febs Journal* 288 (9): 2784–2835. <https://doi.org/10.1111/febs.15531>.
 239. Połosak, K., Papierniak-Wyglądała, A., i Nałęcz, K. A. 2022. „Regulation of SLC6A14 trafficking in breast cancer cells by heat shock protein HSP90 β ”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 614: 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.05.011>.
 240. Prasad, H. C., Steiner, J. A., Sutcliffe, J. S., i Blakely, R. D. 2009. „Enhanced Activity of Human Serotonin Transporter Variants Associated with Autism”. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 364 (1514): 163–73. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0143>.
 241. Preising, M. N., Görg, B., Friedburg, C., Qvarthava, N., Budde, B. S., Bonus, M., Toliat, M. R., Pfleger, C., Altmüller, J., Herebian, D., Beyer, M., Zöllner, H. J., Wittsack, H. J., Schaper, J., Klee, D., Zechner, U., Nürnberg, P., Schipper, J., Schnitzler, A., Gohlke, H., Lorenz, B., Häussinger, D., i Bolz, H. J. 2019. „Biallelic Mutation of Human SLC6A6 Encoding the Taurine

- Transporter TAUT Is Linked to Early Retinal Degeneration". *The FEBS Journal* 33 (10): 11507–27. <https://doi.org/10.1096/fj.201900914RR>.
242. Prodromou, C. 2012. „The ‘active life’ of Hsp90 complexes". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Heat Shock Protein 90 (Hsp90), 1823 (3): 614–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.07.020>.
243. Prodromou, C. 2016. „Mechanisms of Hsp90 Regulation". *The Biochemical Journal* 473 (16): 2439–52. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160005>.
244. Raica, M., Cimpean, A. M., i Ribatti, D. 2009. „Angiogenesis in pre-malignant conditions". *European Journal of Cancer* 45 (11): 1924–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.04.007>.
245. Ramamoorthy, S., Shippenberg, T. S., i Jayanthi, L. D. 2011. „Regulation of Monoamine Transporters: Role of Transporter Phosphorylation". *Pharmacology & Therapeutics* 129 (2): 220–38. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.09.009>.
246. Raviol, H., Sadlish, H., Rodriguez, F., Mayer, M. P., i Bukau, B. 2006. „Chaperone Network in the Yeast Cytosol: Hsp110 Is Revealed as an Hsp70 Nucleotide Exchange Factor". *The EMBO Journal* 25 (11): 2510–18. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601139>.
247. Rees, M. I., Harvey, K., Pearce, B. R., Chung, S. K., Duguid, I. C., Thomas, P., Beatty, S., Graham, G. E., Armstrong, L., Shiang, R., Abbott, K. J., Zuberi, S. M., Stephenson, J. B. P., Owen, M. J., Tijssen, M. A. J., van den Maagdenberg, A. M. J. M., Smart, T. G., Supplisson, S., i Harvey, R. J. 2006. „Mutations in the Gene Encoding GlyT2 (SLC6A5) Define a Presynaptic Component of Human Startle Disease". *Nature Genetics* 38 (7): 801–6. <https://doi.org/10.1038/ng1814>.
248. Reid, K. M., Spaul, R., Salián, S., Barwick, K., Meyer, E., Zhen, J., Hirata, H., Sheipouri, D., Benkerroum, H., Gorman, K. M., Papandreou, A., Simpson, M. A., Hirano, Y., Farabella, I., Topf, M., Grozeva, D., Carss, K., Smith, M., Pall, H., Lunt, P., De Gressi, S., Kamsteeg, E. J., Haack, T. B., Carr, L., Guerreiro, R., Bras, J., Maher, E. R., Scott, R. H., Vandenberg, R. J., Raymond, F. L., Chong, W. K., Sudhakar, S., Mankad, K., Reith, M. E., Campeau, P. M., Harvey, R. J., i Kurian, M. A. 2022. „MED27, SLC6A7, and MPPE1 Variants in a Complex Neurodevelopmental Disorder with Severe Dystonia". *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 37 (10): 2139–46. <https://doi.org/10.1002/mds.29147>.
249. Ren, X., Li, T., Zhang, W., i Yang, X. 2022. „Targeting Heat-Shock Protein 90 in Cancer: An Update on Combination Therapy". *Cells* 11 (16): 2556. <https://doi.org/10.3390/cells11162556>.
250. Renan, M. J. 1993. „How Many Mutations Are Required for Tumorigenesis? Implications from Human Cancer Data". *Molecular Carcinogenesis* 7 (3): 139–46. <https://doi.org/10.1002/mc.2940070303>.
251. Roe, S. M., Ali, M. M. U., Meyer, P., Vaughan, C. K., Panaretou, B., Piper, P. W., Prodromou, C., i Pearl, L. H. 2004. „The Mechanism of Hsp90 Regulation by the Protein Kinase-Specific Cochaperone P50(Cdc37)". *Cell* 116 (1): 87–98. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01027-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01027-4).
252. Rogala-Koziarska, K., Samluk, Ł., i Nałęcz, K. A. 2019. „Amino Acid Transporter SLC6A14 Depends on Heat Shock Protein HSP90 in

- Trafficking to the Cell Surface". *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1866 (10): 1544–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.07.009>.
253. Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., i Bukau, B. 2019. „The Hsp70 Chaperone Network". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 20 (11): 665–80. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3>.
254. Royse, K. E., Zhi, D., Conner, M. G., Clodfelder-Miller, B., Srinivasasainagendra, V., Vaughan, L. K., Skibola, C. F., Crossman, D. K., Levy, S., i Shrestha, S. 2014. „Differential Gene Expression Landscape of Co-Existing Cervical Pre-Cancer Lesions Using RNA-Seq". *Frontiers in Oncology* 4: 339. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00339>.
255. Ruan, R., Li, L., Li, X., Huang, C., Zhang, Z., Zhong, H., Zeng, S., Shi, Q., Xia, Y., Zeng, Q., Wen, Q., Chen, J., Dai, X., Xiong, J., Xiang, X., Lei, W., i Deng, J. 2023. „Unleashing the Potential of Combining FGFR Inhibitor and Immune Checkpoint Blockade for FGF/FGFR Signaling in Tumor Microenvironment". *Molecular Cancer* 22 (1): 60. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01761-7>.
256. Rubtsova, S. N., Zhitnyak, I. Y., i Gloushankova, N. A. 2022. „Dual Role of E-Cadherin in Cancer Cells". *Tissue Barriers* 10 (4): 2005420. <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.2005420>.
257. Rutz, D. A., Luo, Q., Freiburger, L., Madl, T., Kaila, V. R. I., Sattler, M., i Buchner, J. 2018. „A Switch Point in the Molecular Chaperone Hsp90 Responding to Client Interaction". *Nature Communications* 9 (1): 1472. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03946-x>.
258. Salmaso, S., Pappalardo, J. S., Sawant, R. R., Musacchio, T., Rockwell, K., Caliceti, P., i Torchilin, V. P. 2009. „Targeting Glioma Cells in Vitro with Ascorbate-Conjugated Pharmaceutical Nanocarriers". *Bioconjugate Chemistry* 20 (12): 2348–55. <https://doi.org/10.1021/bc900369d>.
259. Samluk, Ł., Czeredys, M., Skowronek, K., i Nałęcz, K. A. 2012. „Protein Kinase C Regulates Amino Acid Transporter ATB(0,+)". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 422 (1): 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.106>.
260. Samluk, Ł., Czeredys, M., i Nałęcz, K. A. 2010. „Regulation of Amino Acid/Carnitine Transporter B0,+ (ATB0,+) in Astrocytes by Protein Kinase C: Independent Effects on Raft and Non-Raft Transporter Subpopulations". *Journal of Neurochemistry* 115 (6): 1386–97. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07040.x>.
261. Samudio, I., Harmancey, R., Fiegl, M., Kantarjian, H., Konopleva, M., Korchin, B., Kaluarachchi, K., Bornmann, W., Duvvuri, S., Taegtmeier, H., i Andreeff, M. 2010. „Pharmacologic Inhibition of Fatty Acid Oxidation Sensitizes Human Leukemia Cells to Apoptosis Induction". *The Journal of Clinical Investigation* 120 (1): 142–56. <https://doi.org/10.1172/JCI38942>.
262. Sanchez, J., Carter, T. R., Cohen, M. S., i Blagg, B. S. J. 2020. „Old and New Approaches to Target the Hsp90 Chaperone". *Current Cancer Drug Targets* 20 (4): 253–70. <https://doi.org/10.2174/1568009619666191202101330>.
263. Sarangi, U., Singh, M. K., Abhijanya, K. V. V., Reddy, L. P. A., Prasad, B. S., Pitke, V. V., Paithankar, K., i Sreedhar, A. S. 2013. „Hsp60 Chaperonin Acts as Barrier to Pharmacologically Induced Oxidative Stress Mediated

- Apoptosis in Tumor Cells with Differential Stress Response". *Drug Target Insights* 7: 35–51. <https://doi.org/10.4137/DTI.S12513>.
264. Scalise, M., Pochini, L., Galluccio, M., Console, L., i Indiveri, C. 2020. „Glutamine Transporters as Pharmacological Targets: From Function to Drug Design". *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 15 (2): 207–19. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.02.005>.
265. Scalise, M., Pochini, P., Galluccio, M., i Indiveri, C. 2016. „Glutamine Transport. From Energy Supply to Sensing and Beyond". *Biochimica et Biophysica Acta* 1857 (8): 1147–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.006>.
266. Scalise, M., Pochini, L., Pingitore, P., Hedfalk, K., i Indiveri, C. 2015. „Cysteine Is Not a Substrate but a Specific Modulator of Human ASCT2 (SLC1A5) Transporter". *FEBS Letters* 589 (23): 3617–23. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.10.011>.
267. Schlaepfer, I. R., Rider, L., Rodrigues, L. U., Gijón, M. A., Pac, C. T., Romero, L., Cimic, A., Sirintrapun, S. J., Glodé, L. M., Eckel, R. H., i Cramer, S. D. 2014. „Lipid Catabolism via CPT1 as a Therapeutic Target for Prostate Cancer". *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (10): 2361–71. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0183>.
268. Schniers, B. K., Wachtel, M. S., Sharma, M., Korac, K., Rajasekaran, D., Yang, S., Sniegowski, T., Ganapathy, V., i Bhutia, Y. D. 2022. „Deletion of Slc6a14 reduces cancer growth and metastatic spread and improves survival in KPC mouse model of spontaneous pancreatic cancer". *Biochemical Journal* 479 (5): 719–30. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210855>.
269. Schopf, F. H., Biebl, M. M., i Buchner, J. 2017. „The HSP90 Chaperone Machinery". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (6): 345–60. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.20>.
270. Schousboe, A., i Madsen, K. K. 2017. „Delineation of the Role of Astroglial GABA Transporters in Seizure Control". *Neurochemical Research* 42 (7): 2019–23. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2188-x>.
271. Schousboe, A., Sarup, A., Larsson, O. M., i White, H. S. 2004. „GABA transporters as drug targets for modulation of GABAergic activity". *Biochemical Pharmacology, Six Decades of GABA*, 68 (8): 1557–63. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.06.041>.
272. Schousboe, A., Wellendorph, P., Frølund, B., Clausen, R. P., i Krogsgaard-Larsen, P. 2017. „Astrocytic GABA Transporters: Pharmacological Properties and Targets for Antiepileptic Drugs". *Advances in Neurobiology* 16: 283–96. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55769-4_14.
273. Schuermann, J. P., Jiang, J., Cuellar, J., Llorca, O., Wang, L., Gimenez, L. E., Jin, S., Taylor, A. B., Demeler, B., Morano, K. A., Hart, P. J., Valpuesta, J. M., Lafer, E. M., i Sousa, R. 2008. „Structure of the Hsp110:Hsc70 Nucleotide Exchange Machine". *Molecular Cell* 31 (2): 232–43. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.006>.
274. Schulte, T. W., Akinaga, S., Soga, S., Sullivan, W., Stensgard, B., Toft, D., i Neckers, L. M. 1998. „Antibiotic Radicicol Binds to the N-Terminal Domain of Hsp90 and Shares Important Biologic Activities with Geldanamycin". *Cell Stress & Chaperones* 3 (2): 100–108. <https://doi.org/10.1379/1466->

- 1268(1998)003<0100:arbtt>2.3.co;2.
275. Schwenk, R. W., Holloway, G. P., Luiken, J. J. F. P., Bonen, A., i Glatz, J. F. C. 2010. „Fatty Acid Transport across the Cell Membrane: Regulation by Fatty Acid Transporters”. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 82 (4–6): 149–54. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.02.029>.
 276. Semenza, G. L. 2010. „HIF-1: Upstream and Downstream of Cancer Metabolism”. *Current Opinion in Genetics & Development* 20 (1): 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.10.009>.
 277. Senga, S. S., i Grose, R. P. 2021. „Hallmarks of Cancer-the New Testament”. *Open Biology* 11 (1): 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>.
 278. Seow, H. F., Bröer, S., Bröer, A., Bailey, C. G., Potter, S. J., Cavanaugh, J. A., i Rasko, J. E. J. 2004. „Hartnup Disorder Is Caused by Mutations in the Gene Encoding the Neutral Amino Acid Transporter SLC6A19”. *Nature Genetics* 36 (9): 1003–7. <https://doi.org/10.1038/ng1406>.
 279. Shafqat, S., Velaz-Faircloth, M., Henzi, V. A., Whitney, K. D., Yang-Feng, T. L., Seldin, M. F., i Fremeau, R. T. 1995. „Human Brain-Specific L-Proline Transporter: Molecular Cloning, Functional Expression, and Chromosomal Localization of the Gene in Human and Mouse Genomes”. *Molecular Pharmacology* 48 (2): 219–29.
 280. Shannon J. R., Flattem N. L., Jens, J., Giris, J., Black B. K., Biaggioni I., Blakely R. D., i Robertson D. 2000. „Orthostatic Intolerance and Tachycardia Associated with Norepinephrine-Transporter Deficiency”. *New England Journal of Medicine* 342 (8): 541–49. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002243420803>.
 281. Shay, J. W., i Wright, W. E. 2000. „Hayflick, His Limit, and Cellular Ageing”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1 (1): 72–76. <https://doi.org/10.1038/35036093>.
 282. Shennan, D. B., Thomson, J., Barber, M. C., i Travers, M. T. 2003. „Functional and Molecular Characteristics of System L in Human Breast Cancer Cells”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1611 (1–2): 81–90. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(03\)00028-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(03)00028-2).
 283. Sherr, C. J., i DePinho, R. A. 2000. „Cellular Senescence: Minireview Mitotic Clock or Culture Shock?” *Cell* 102 (4): 407–10. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00046-5).
 284. Sherr, C. J., i McCormick, F. 2002. „The RB and p53 pathways in cancer”. *Cancer Cell* 2 (2): 103–12. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00102-2).
 285. Sikder, M. O. F., Sivaprakasam, S., Brown, T. P., Thangaraju, M., Bhutia, Y. D., i Ganapathy, V. 2020. „SLC6A14, a Na⁺/Cl⁻-Coupled Amino Acid Transporter, Functions as a Tumor Promoter in Colon and Is a Target for Wnt Signaling”. *The Biochemical Journal* 477 (8): 1409–25. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200099>.
 286. Sikder, M. O. F., Yang, S., Ganapathy, V., i Bhutia, Y. D. 2017. „The Na⁺/Cl⁻-Coupled, Broad-Specific, Amino Acid Transporter SLC6A14 (ATB0,+): Emerging Roles in Multiple Diseases and Therapeutic Potential for Treatment and Diagnosis”. *The AAPS Journal* 20 (1): 12. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0164-7>.

287. Sloan, J. L., i Mager S. 1999. „Cloning and Functional Expression of a Human Na⁺ and Cl⁻-Dependent Neutral and Cationic Amino Acid Transporter B⁰⁺”. *Journal of Biological Chemistry* 274 (34): 23740–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.23740>.
288. Sniegowski, T., Korac, K., Bhutia, Y. D., i Ganapathy, V. 2021. „SLC6A14 and SLC38A5 Drive the Glutaminolysis and Serine–Glycine–One-Carbon Pathways in Cancer”. *Pharmaceuticals* 14 (3): 216. <https://doi.org/10.3390/ph14030216>.
289. Soti, C., Vermes, A., Haystead, T. A. J., i Csermely, P. 2003. „Comparative Analysis of the ATP-Binding Sites of Hsp90 by Nucleotide Affinity Cleavage: A Distinct Nucleotide Specificity of the C-Terminal ATP-Binding Site”. *European Journal of Biochemistry* 270 (11): 2421–28. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03610.x>.
290. Srinivas, S. R., Prasad, P. D., Umapathy, N. S., Ganapathy, V., i Shekhawat, P. S. 2007. „Transport of Butyryl-L-Carnitine, a Potential Prodrug, via the Carnitine Transporter OCTN2 and the Amino Acid Transporter ATB(0,+)”. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 293 (5): G1046-1053. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00233.2007>.
291. Steiber, A., Kerner, J., i Hoppel, C. L. 2004. „Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective”. *Molecular Aspects of Medicine, Carnitine*, 25 (5): 455–73. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.06.006>.
292. Stepulak, A., Rola, R., Polberg, K., i Ikonomidou, C. 2014. „Glutamate and Its Receptors in Cancer”. *Journal of Neural Transmission* 121 (8): 933–44. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1182-6>.
293. Sucic, S., Koban, F., El-Kasaby, A., Kudlacek, O., Stockner, T., Sitte, H. H., i Freissmuth, M. 2013. „Switching the Clientele”. *Journal of Biological Chemistry* 288 (8): 5330–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.408237>.
294. Supplisson, S., i Roux, M. J. 2002. „Why Glycine Transporters Have Different Stoichiometries”. *FEBS Letters* 529 (1): 93–101. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03251-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03251-9).
295. Taipale, M., Jarosz, D. F., i Lindquist, S. 2010. „HSP90 at the Hub of Protein Homeostasis: Emerging Mechanistic Insights”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (7): 515–28. <https://doi.org/10.1038/nrm2918>.
296. Talmadge, J. E., i Fidler, I. J. 2010. „AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective”. *Cancer Research* 70 (14): 5649–69. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>.
297. Tarnok, Z., Ronai, Z., Gervai, J., Kereszturi, E., Gadoros, J., Sasvari-Szekely, M., i Nemoda, Z. 2007. „Dopaminergic Candidate Genes in Tourette Syndrome: Association between Tic Severity and 3' UTR Polymorphism of the Dopamine Transporter Gene”. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 144B (7): 900–905. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30517>.
298. Taylor, P. M. 2014. „Role of amino acid transporters in amino acid sensing1234”. *The American Journal of Clinical Nutrition* 99 (1): 223S-230S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.070086>.
299. Tittelmeier, J., Sandhof, C. A., Ries, H. M., Druffel-Augustin, S., Mogk, A., Bukau, B., i Nussbaum-Krammer, C. 2020. „The HSP110/HSP70

- Disaggregation System Generates Spreading-Competent Toxic α -Synuclein Species". *The EMBO Journal* 39 (13): e103954. <https://doi.org/10.15252/embj.2019103954>.
300. Toledo, R. A., Jimenez, C., Armaiz-Pena, G., Arenillas, C., Capdevila, J., i Dahia, P. L. M. 2023. „Hypoxia-Inducible Factor 2 Alpha (HIF2 α) Inhibitors: Targeting Genetically Driven Tumor Hypoxia". *Endocrine Reviews* 44 (2): 312–22. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnac025>.
301. Tsutsumi, S., Mollapour, M., Prodromou, C., Lee, C. T., Panaretou, B., Yoshida, S., Mayer, M. P., i Neckers, L. M. 2012. „Charged Linker Sequence Modulates Eukaryotic Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Chaperone Activity". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (8): 2937–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114414109>.
302. Ugawa, S., Sunouchi, Y., Ueda, T., Takahashi, E., Saishin, Y., i Shimada, S. 2001. „Characterization of a Mouse Colonic System B(0+) Amino Acid Transporter Related to Amino Acid Absorption in Colon". *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 281 (2): G365-370. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.2.G365>.
303. Umapathy, N. S., Ganapathy, V., i Ganapathy, M. E. 2004. „Transport of Amino Acid Esters and the Amino-Acid-Based Prodrug Valganciclovir by the Amino Acid Transporter ATB(0,+)". *Pharmaceutical Research* 21 (7): 1303–10. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000033019.49737.28>.
304. Vander H., Matthew G., Cantley, L. C., i Thompson, C. B. 2009. „Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation". *Science (New York, N.Y.)* 324 (5930): 1029–33. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.
305. Vaupel, P., Schmidberger, H., i Mayer, A. 2019. „The Warburg Effect: Essential Part of Metabolic Reprogramming and Central Contributor to Cancer Progression". *International Journal of Radiation Biology* 95 (7): 912–19. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1589653>.
306. Verschoor, M. L., i Singh, G. 2013. „Ets-1 regulates intracellular glutathione levels: key target for resistant ovarian cancer". *Molecular Cancer* 12 (1): 138. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-138>.
307. Voyiaziakis, E., Evgrafov, O., Li, D., Yoon, H.-J., Tabares, P., Samuels, J., Wang, Y., Riddle, M. A., Grados, M. A., Bienvenu, O. J., Shugart, Y. Y., Liang, K.-Y., Greenberg, B. D., Rasmussen, S. A., Murphy, D. L., Wendland, J. R., McCracken, J. T., Piacentini, J., Rauch, S. L., Pauls, D. L., Nestadt, G., Fyer, A. J., i Knowles, J. A. 2011. „Association of SLC6A4 Variants with Obsessive-Compulsive Disorder in a Large Multicenter US Family Study". *Molecular Psychiatry* 16 (1): 108–20. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.100>.
308. Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., i Schlattner, S. 2011. „The Creatine Kinase System and Pleiotropic Effects of Creatine". *Amino Acids* 40 (5): 1271–96. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0877-3>.
309. Wang, Z., Baker, D. G., Harrer, J., Hamner, M., Price, M., i Amstadter, A. 2011. „The Relationship between Combat-Related Posttraumatic Stress Disorder and the 5-HTTLPR/Rs25531 Polymorphism". *Depression and Anxiety* 28 (12): 1067–73. <https://doi.org/10.1002/da.20872>.
310. Warburg, O. 1956. „On the Origin of Cancer Cells". *Science (New York,*

- N.Y.) 123 (3191): 309–14. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.
311. Whitesell, L., i Lindquist, S. L. 2005. „HSP90 and the Chaperoning of Cancer”. *Nature Reviews. Cancer* 5 (10): 761–72. <https://doi.org/10.1038/nrc1716>.
312. Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D., i Duhr, S. 2010. „Protein-Binding Assays in Biological Liquids Using Microscale Thermophoresis”. *Nature Communications* 1 :100. <https://doi.org/10.1038/ncomms1093>.
313. Williamson, J. R., i Corkey, B. E. 1969. „Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods”. *Methods in Enzymology* 13: 434–513. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(69\)13072-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(69)13072-4).
314. Willis, S. N., i Adams, J. M. 2005. „Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis”. *Current Opinion in Cell Biology, Cell division, growth and death / Cell differentiation*, 17 (6): 617–25. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.10.001>.
315. Winkle, L. J. V., Christensen, H. N., i Campione, A. L. 1985. „Na⁺-Dependent Transport of Basic, Zwitterionic, and Bicyclic Amino Acids by a Broad-Scope System in Mouse Blastocysts.” *Journal of Biological Chemistry* 260 (22): 12118–23. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38994-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38994-9).
316. Winter, J. N., Jefferson, L. S., i Kimball, S. R. 2011. „ERK and Akt signaling pathways function through parallel mechanisms to promote mTORC1 signaling”. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300 (5): C1172–80. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00504.2010>.
317. Wise, D. R., DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H. K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S. B., i Thompson, C. B. 2008. „Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (48): 18782–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810199105>.
318. Wise, D. R., i Thompson, C. B. 2010. „Glutamine Addiction: A New Therapeutic Target in Cancer”. *Trends in Biochemical Sciences* 35 (8): 427–33. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.003>.
319. Witsch, E., Sela, M., i Yarden, Y. 2010. „Roles for Growth Factors in Cancer Progression”. *Physiology* 25 (2): 85–101. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009>.
320. Wolosker, H., Blackshaw, S., i Snyder, S. H. 1999. „Serine Racemase: A Glial Enzyme Synthesizing D-Serine to Regulate Glutamate-N-Methyl-D-Aspartate Neurotransmission”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23): 13409–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13409>.
321. Wu, J., Liu, T., Rios, Z., Mei, Q., Lin, X., i Cao, S. 2017. „Heat Shock Proteins and Cancer”. *Trends in Pharmacological Sciences* 38 (3): 226–56. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.009>.
322. Yamamoto, T., Seino, Y., Fukumoto, H., Koh, G., Yano, H., Inagaki, N., Yamada, Y., Inoue, K., Manabe, T., i Imura, H. 1990. „Over-Expression of Facilitative Glucose Transporter Genes in Human Cancer”. *Biochemical*

- and Biophysical Research Communications* 170 (1): 223–30. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)91263-r](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)91263-r).
323. Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y., i Gouaux, E. 2005. „Crystal Structure of a Bacterial Homologue of Na⁺/Cl⁻-Dependent Neurotransmitter Transporters”. *Nature* 437 (7056): 215–23. <https://doi.org/10.1038/nature03978>.
324. Yang, Z.-Q., Liu, Y.-J., i Zhou, X.-L. 2020. „An Integrated Microarray Analysis Reveals Significant Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Cancer”. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 26: e921769. <https://doi.org/10.12659/MSM.921769>.
325. Young, J. D. 2016. „The SLC28 (CNT) and SLC29 (ENT) Nucleoside Transporter Families: A 30-Year Collaborative Odyssey”. *Biochemical Society Transactions* 44 (3): 869–76. <https://doi.org/10.1042/BST20160038>.
326. Yu, M., Yongzhi, H., Chen, S., Luo, X., Lin, Y., Zhou, Y., Jin, H., Hou, B., Deng, Y., Tu, L., i Jian, Z. 2017. „The Prognostic Value of GLUT1 in Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis”. *Oncotarget* 8 (26): 43356–67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17445>.
327. Zaia, K. A., i Reimer, R. J. 2009. „Synaptic Vesicle Protein NTT4/XT1 (SLC6A17) Catalyzes Na⁺-Coupled Neutral Amino Acid Transport *”. *Journal of Biological Chemistry* 284 (13): 8439–48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806407200>.
328. Zhang, H., Herbert, B.-S., Pan, K.-H., Shay, J. W., i Cohen, S. N. 2004. „Disparate Effects of Telomere Attrition on Gene Expression during Replicative Senescence of Human Mammary Epithelial Cells Cultured under Different Conditions”. *Oncogene* 23 (37): 6193–98. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207834>.
329. Zhang, H.-S., Du, G.-Y., Zhang, Z.-G., Zhou, Z., Sun, H.-L., Yu, X.-Y., Shi, Y.-T., Xiong, D.-N., Li, H., i Huang, Y.-H. 2018. „NRF2 Facilitates Breast Cancer Cell Growth via HIF1 α -Mediated Metabolic Reprogramming”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 95: 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.12.016>.
330. Zierer, B. K., Rübhelke, M., Tippel, F., Madl, T., Schopf, F. H., Rutz, D. A., Richter, K., Sattler, M., i Buchner J. 2016. „Importance of Cycle Timing for the Function of the Molecular Chaperone Hsp90”. *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (11): 1020–28. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3305>.
331. Zininga, T., Ramatsui, L., i Shonhai, A. 2018. „Heat Shock Proteins as Immunomodulators”. *Molecules* 23 (11): 2846. <https://doi.org/10.3390/molecules23112846>.
332. Zou, X., Zhang, G., Cheng, Z., Yin, D., Du, T., Ju, G., Miao, S., Liu, G., Lu, M., i Zhu, Y. 2014. „Microvesicles Derived from Human Wharton’s Jelly Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats by Suppressing CX3CL1”. *Stem Cell Research & Therapy* 5 (2): 40. <https://doi.org/10.1186/scrt428>.
333. Zuehlke, A., i Johnson, J. L. 2010. „Hsp90 and Co-Chaperones Twist the Functions of Diverse Client Proteins”. *Biopolymers* 93 (3): 211–17. <https://doi.org/10.1002/bip.21292>.

SPIS PUBLIKACJI

1. „*Amino Acid Transporter SLC6A14 Depends on Heat Shock Protein HSP90 in Trafficking to the Cell Surface*”. **Rogala-Koziarska, K.**, Samluk, Ł., i Nałęcz, K. A. 2019. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1866 (10): 1544–55.
2. „*Regulation of SLC6A14 trafficking in breast cancer cells by heat shock protein HSP90 β* ”. **Połosak, K.**, Papierniak-Wyglądała, A., i Nałęcz, K. A. 2022. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 614: 41–46.