

Streszczenie

Alfa-enolaza (ENO1) to enzym szlaku glikolitycznego, którego nadekspresja obserwowana jest wielu nowotworach, promując proliferację oraz inwazję komórek nowotworowych. ENO1 pełni kluczową rolę w utrzymaniu efektu Warburga, w którym komórki nowotworowe czerpią energię z glikolizy tlenowej zamiast mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej, zarówno w warunkach niedotlenienia jak i przy prawidłowym poziomie tlenu. Eksperymentalne zmniejszenie ekspresji lub aktywności enzymatycznej ENO1 w komórkach nowotworowych prowadzi do supresji glikolizy, aktywacji metabolizmu tlenowego i obniżenia proliferacji, migracji i inwazji komórek, co czyni ENO1 atrakcyjnym celem terapeutycznym. Białko wiążące promotor *c-MYC* (MBP-1) jest produktem alternatywnej translacji mRNA kodującego ENO1. W przeciwieństwie do cytoplazmatycznej ekspresji ENO1, MBP-1 lokalizuje się w jądrze komórkowym, gdzie łącząc się z promotorem genu *c-MYC* hamuje transkrypcję. Skutkiem tego jest zmniejszenie proliferacji oraz wzrostu komórek nowotworowych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była analiza korelacji ekspresji białka ENO1 oznaczonej metodą immunohistochemiczną u 112 pacjentów z czerniakiem skóry ze szczegółowymi parametrami klinicznymi i histopatologicznymi oraz analiza ekspresji ENO1 i jej izoformy MBP-1 w przedklinicznych modelach *in vitro*. W przedstawionej pracy wykorzystano 4 linie komórkowe czerniaka skóry, pochodzące z guza pierwotnego (A375, WM1341D) oraz z przerzutów do węzłów chłonnych (WM9, Hs294T).

W pierwszej publikacji, analiza modeli klinicznych i komórkowych wykazała, że nadekspresja ENO1 zwiększa inwazyjność komórek czerniaka i koreluje z bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym. Nadekspresja ENO1 w komórkach nowotworowych u pacjentów z czerniakiem skóry była istotnie skorelowana z niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi, takimi jak grubość nacieku według skali Breslowa i Clarka, aktywnością mitotyczną oraz obecnością owrzodzenia. W liniach komórkowych czerniaka występował wyższy poziom ekspresji ENO1 w porównaniu do prawidłowych melanocytów. Linie komórkowe pochodzące z przerzutów (WM9 i Hs294T) wykazywały wyższy poziom aktywności enzymatycznej ENO1 w warunkach hipoksji w porównaniu do normoksji. Uzyskane obserwacje wskazują na istotną rolę ENO1 w adaptacji komórek nowotworowych do warunków niedotlenienia, które odzwierciedlają środowisko węzłów chłonnych i zapewniają przetrwanie komórkom przerzutującym.

W drugiej części rozprawy doktorskiej skoncentrowano się na zbadaniu wpływu nadekspresji białka MBP-1 i jego wariantu delecyjnego pozbawionego domeny C-końcowej (MBP-1ΔC) w 2 liniach czerniaka skóry (A375 i WM9), pozyskanych odpowiednio z guza pierwotnego oraz przerzutu do węzła chłonnego, na wybrane parametry komórkowe. Badanie immunofluorescencyjne uwidoczniało nieoczekiwaną lokalizację cytoplazmatyczną MBP-1 oraz MBP-1ΔC w stabilnie transdukowanych liniach komórkowych, co sugeruje istnienie mechanizmu importu jądrowego, nieefektywnego w warunkach silnej nadekspresji lentiwirusowej. Niefizjologiczna ekspresja białek MBP-1 i MBP-1ΔC w cytoplazmie ujawniała szereg ich funkcji, podobnych do ENO1, takich jak zwiększenie tempa proliferacji i glikolizy. Niemniej jednak, cząsteczka MBP-1, w przeciwieństwie do jej mutantu delecyjnego MBP-1ΔC zachowała także aktywność przeciwnowotworową, która była niezależna od jej lokalizacji jądrowej i która uwidoczniała się w teście zarastania rysy poprzez znaczące zmniejszenie tempa migracji komórek linii WM9.

Wyniki uzyskane w tej rozprawie stanowią oryginalną analizę korelacji pomiędzy ekspresją ENO1 oraz MBP-1 w liniach komórkowych czerniaka skóry a parametrami proliferacji, inwazyjności i metabolizmu glukozy. Ponadto przedstawiona nadekspresja izoformy ENO1 – MBP-1 lokalizująca się w cytoplazmie ujawniała nieoczekiwaną aktywność pronowotworową oraz aktywność przeciwnowotworową w liniach czerniaka skóry.

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej umożliwiają kontynuowanie badań nad ENO1, potencjalnym markerem prognostycznym oraz celem eksperymentalnych terapii czerniaka.

Abstract

Alpha-enolase (ENO1) is an enzyme of the glycolytic pathway, whose overexpression is observed in several cancers, promoting the proliferation and invasion of cancer cells. ENO1 plays an essential role in maintaining the Warburg effect, in which cancer cells derive energy from aerobic glycolysis instead of mitochondrial oxidative phosphorylation, both under hypoxic conditions and at normal oxygen levels. Experimental reduction of expression or enzymatic activity of ENO1 in cancer cells leads to suppression of glycolysis, activation of aerobic metabolism, and reduction of proliferation, migration, and invasion of cells, making ENO1 an attractive therapeutic target. The c-MYC promoter-binding protein (MBP-1) is a product of the alternative translation of the mRNA encoding ENO1. In contrast to the cytoplasmic expression of ENO1, MBP-1 is located in the cell nucleus, where, by binding to the c-MYC gene promoter, it inhibits transcription. The consequence is a reduction in the proliferation and growth of cancer cells.

This doctoral dissertation aimed to analyze the correlation of ENO1 protein expression, as determined by the immunohistochemical method, in 112 patients with skin melanoma with detailed clinical and histopathological parameters, and to analyze the expression of ENO1 and its MBP-1 isoform in preclinical *in vitro* models. Four skin melanoma cell lines derived from the primary tumor (A375, WM1341D) and from lymph node metastases (WM9, Hs294T) were used in this study.

In the first publication, the analysis of clinical and cellular models showed that overexpression of ENO1 enhances the invasiveness of melanoma cells and correlates with a more aggressive clinical course. Overexpression of ENO1 in cancer cells in patients with skin melanoma was significantly associated with unfavorable prognostic factors, such as Breslow thickness, Clark level, mitotic activity, and the presence of ulceration. Melanoma cell lines showed a higher level of ENO1 expression compared to normal melanocytes. Cell lines derived from metastases (WM9 and Hs294T) showed higher levels of ENO1 enzymatic activity under hypoxia compared to normoxia. These observations indicate the significant role of ENO1 in the adaptation of cancer cells to hypoxic conditions, which reflect the environment of lymph nodes and ensure the survival of metastasizing cells.

The second part of the doctoral dissertation focused on examining the impact of overexpression of the MBP-1 protein and its C-terminal deletion mutant (MBP-1 Δ C) in skin melanoma lines (A375 and WM9), derived respectively from the primary tumor and lymph node metastasis, on selected cell parameters. An immunofluorescent study revealed an

unexpected cytoplasmic location of MBP-1 and MBP-1 Δ C in stably transduced cell lines, suggesting the existence of a nuclear transport mechanism that is ineffective under conditions of strong lentiviral overexpression. Non-physiological expression of MBP-1 and MBP-1 Δ C proteins in the cytoplasm revealed a number of their functions, similar to ENO1, such as an increased rate of proliferation and glycolysis. Nevertheless, the MBP-1 molecule, unlike its deletion mutant MBP-1 Δ C, also retained its anti-cancer activity, which was independent of its nuclear location and was manifested in the wound healing assay by significantly reducing the rate of migration of WM9 cell line.

The results obtained in this dissertation constitute an original analysis of the correlation between the expression of ENO1 and MBP-1 in skin melanoma cell lines and parameters of proliferation, invasiveness, and glucose metabolism. Moreover, the presented overexpression of the ENO1 isoform - MBP-1, localized in the cytoplasm, revealed an unexpected pro-tumor activity as well as anti-tumor activity in skin melanoma lines, thereby increasing knowledge about the biology of this protein.

The results of the studies presented in this doctoral dissertation enable the continuation of research on ENO1, a potential prognostic marker, and target for experimental melanoma therapies.