



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Miriam Hippner-Kunicka

Wpływ ekspresji alfa-enolazy (ENO1) i jej izoformy MBP1
na metabolizm glukozy i tempo proliferacji wybranych linii
komórkowych ludzkiego czerniaka skóry

ROZPRAWA DOKTORSKA

Wykonana w:

Katedrze Patologii Klinicznej i Doświadczalnej
Wydziału Lekarskiego

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Pod kierunkiem promotora **dr. hab. n. med. Piotra Donizego, prof. UMW**

Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
Pod kierunkiem promotora **prof. dr. hab. Arkadiusza Miążka**

Wrocław 2023

Spis treści

1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską	3
2. Streszczenie.....	4
3. Abstract.....	6
4. Wprowadzenie	8
5. Cel pracy	13
6. Publikacja I	14
7. Suplement	31
8. Publikacja II.....	33
9. Podsumowanie.....	47
10. Wnioski	49
11. Bibliografia.....	50
12. Załączniki	55
12.1 Oświadczenia współautorów publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej ..	55
12.2 Opinia komisji Bioetycznej	69

1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

Impact Factor: 6.427

Liczba punktów MNiSW/KBN: 140

- I. Miriam Hippner, Michał Majkowski, Przemysław Biecek, Teresa Szkudlarek, Aleksandra Simiczyjew, Małgorzata Pieniążek, Dorota Nowak, Arkadiusz Miązek, Piotr Donizy.: Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma—An In Vitro and a Clinical Study

Diagnostics (Basel), 2022 Jan, Vol.12, no.2; p.254,
DOI: 10.3390/diagnostics12020254.

IF: 3,992; Pkt. MNiSW/KBN: 70

- II. Miriam Hippner-Kunicka, Agnieszka Łaskiewicz, Joanna Skrzymowska, Przemysław Biecek, Piotr Donizy, Arkadiusz Miązek.: Overexpression of c-MYC Promoter Binding Protein-1 Enhances Proliferation and Glucose Metabolism of Melanoma Cells Lines

Anticancer Research, 2023 Jun, Vol.43, no.6; p.2527-2538,
DOI: 10.21873/anticancerres.16420,

IF: 2,435; Pkt. MNiSW/KBN: 70

2. 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-1 Δ C) 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-1 Δ C w stabilnie transdukowanych liniach komórkowych, co sugeruje istnienie mechanizmu importu jądrowego, nieefektywnego w warunkach silnej nadekspresji lentiwirusowej. Niefizjologiczna ekspresja białek MBP-1 i MBP-1 Δ C w cytoplazmie ujawniła 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-1 Δ C zachowała także aktywność przeciwnowotworową, która była niezależna od jej lokalizacji jądrowej i która uwidoczniała się w teście zarastania rasy 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 ujawniła 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.

3. 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.

4. Wprowadzenie

Czerniak (cutaneous melanoma, CM) to agresywny nowotwór skóry, rozwijający się z melanocytów, czyli komórek pigmentowych skóry. Jest to jeden z najbardziej agresywnych klinicznie nowotworów złośliwych, a także główna przyczyna zgonów związanych z nowotworami skóry. Nowotwór ten cechuje się zdolnością do szybkiego rozwoju, rozprzestrzeniania się oraz tworzenia przerzutów, co utrudnia efektywne leczenie. W ciągu ostatnich dekad zaobserwowano dynamiczny wzrost liczby zachorowań na czerniaka skóry, zarówno w Polsce, jak i na świecie [1].

Badania epidemiologiczne wykazały, że istnieje wiele czynników ryzyka związanych z rozwojem tego nowotworu skóry, takich jak: predyspozycje genetyczne, czynniki środowiskowe, narażenie na promieniowanie ultrafioletowe (UV) oraz zróżnicowany fototyp skóry. Nadmierna ekspozycja na promieniowanie UV prowadzi do mutacji DNA w melanocytach skóry, co skutkuje niekontrolowanymi podziałami komórek i rozwojem nowotworu. Promieniowanie UV-B (280-315 nm) jest absorbowane przez warstwę ozonową i stanowi jedynie 5% całkowitego światła słonecznego docierającego na ziemię, odpowiadając za najbardziej karcynogenne długości fal. Natomiast promieniowanie UV-A (315–400 nm) reprezentuje pozostałe 95% ekspozycji, a jego zdolność do penetracji najgłębszych warstw skóry właściwej prowadzi do jej uszkodzeń. Warto zauważyć, że promieniowanie UV-B powoduje bezpośrednie uszkodzenia DNA, podczas gdy promieniowanie UV-A odpowiada za pośrednie działanie, poprzez generowanie reaktywnych form tlenu w obrębie skóry właściwej [2–6].

Wskaźnik zachorowalności na czerniaka różni się w zależności od szerokości geograficznej, co jest związane z różnym fenotypem skóry, jej pigmentacją oraz ekspozycją na promieniowanie UV [7–10]. Osoby o jasnej karnacji (fenotypy I-III) są bardziej podatne na uszkodzenia DNA wywołane przez promieniowanie UV co zwiększa ryzyko rozwoju czerniaka [11]. Najwyższy wskaźnik zachorowalności i śmiertelności na świecie występuje w Australii i Nowej Zelandii. Natomiast w Europie można zaobserwować gradient zachorowalności na czerniaka, z najwyższym współczynnikiem w krajach północnych i najniższym w krajach południowych [12,13]. Kraje o przeważającym fenotypie jasnej karnacji i okresowej ekspozycji na słońce wykazują 25-30 przypadków na 100 000 osób [14], natomiast w populacjach śródziemnomorskich wskaźnik zapadalności wynosi około 5-7 przypadków na

100 000 osób [7]. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2020 roku zarejestrowano ponad 300 000 nowych przypadków czerniaka skóry oraz 60 000 zgonów na całym świecie. W Polsce obserwuje się wzrost liczby zachorowań na czerniaka. Dane Głównego Urzędu Statystycznego (GUS) pokazują, że liczba nowych przypadków czerniaka wzrosła dwukrotnie w ciągu 19 lat - od 2000 roku, kiedy odnotowano 2 000 nowych przypadków, do 2019, w którym zarejestrowano 4 000 nowych przypadków [15,16]. Dane epidemiologiczne sugerują, że mężczyźni są około 1,2 razy (w liczbach bezwzględnych 32 385 mężczyzn i 24 658 kobiet) bardziej narażeni na rozwój choroby oraz 1,3 razy (w liczbach bezwzględnych 173 844 mężczyzn i 150 791 kobiet) bardziej narażeni na zgon z powodu czerniaka niż kobiety [13]. Wzrost liczby zachorowań na czerniaka jest związany z wiekiem; w grupie mężczyzn po 75 roku życia nowotwór ten występuje 3-krotnie częściej niż u kobiet [17]. Korelacja ta może być związana z dłuższym czasem ekspozycji na promieniowanie UV oraz osłabieniem układu odpornościowego [18].

Wysoka śmiertelność spowodowana czerniakiem skóry, wzrastająca wraz ze zmianami środowiskowymi, stawia przed naukowcami wyzwanie do poszukiwania nowych, bardziej efektywnych metod diagnostyki i leczenia.

Tradycyjne chemioterapie stosowane w leczeniu czerniaka, często wykazują ograniczoną skuteczność oraz powodują liczne działania niepożądane [19]. Chociaż takie podejście może przynieść korzyści dla niektórych pacjentów, to jednak istnieje pilna potrzeba opracowania bardziej selektywnych i skutecznych terapii. W ostatnich latach wprowadzono nowe metody leczenia czerniaka, takie jak terapia celowana z wykorzystaniem inhibitorów BRAF (kinazy serynowo-treoninowej) i MEK (kinaza, kinazy MAP), a także immunoterapia oparta na przeciwciałach monoklonalnych anti-PD-1 (receptor programowanej śmierci komórki) i anti-CTLA-4 (antygen - 4 cytotoksycznych limfocytów T) [19–21]. Inhibitory BRAF i MEK mają na celu blokadę szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za rozwój i przeżycie komórek nowotworowych, co prowadzi do zahamowania wzrostu i rozwoju czerniaka [22]. Niemniej jednak, terapie te często prowadzą do wystąpienia chemiooporności, co może ograniczyć ich długoterminową skuteczność [23]. Z kolei immunoterapia z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych ma na celu pobudzenie układu odpornościowego do atakowania komórek nowotworowych, ale jej skuteczność zależy od typu czerniaka [24]. Innym interesującym podejściem jest terapia genowa, mająca na celu wprowadzenie, naprawę lub zastąpienie uszkodzonych genów w komórkach nowotworowych. Terapia genowa może być wykorzystana do wprowadzenia genów mających na celu zahamowanie wzrostu guza, indukcję apoptozy,

zwiększenie odpowiedzi immunologicznej lub hamowanie angiogenezy [25]. Warto również wspomnieć o roli mikroRNA (miRNA) w kontekście terapii czerniaka. miRNA to krótkie, nielinowe fragmenty RNA, które są zaangażowane w regulację ekspresji genów i mogą mieć działanie zarówno onkogenne, jak i supresorowe. Badania nad miRNA jako celami terapeutycznymi lub biomarkerami w czerniaku mogą prowadzić do opracowania nowych strategii leczenia [26].

Jednym z potencjalnych celów terapeutycznych jest alfa-enolaza (ENO1, EC 4.2.1.11), białko wykazujące podwyższoną ekspresję w komórkach większości nowotworów [27]. Izoforma tego białka - białko wiążące promotor *c-MYC* (MBP-1), wykazuje działanie hamujące rozwój wybranych typów nowotworów [28]. Badania nad ich działaniem są obecnie przedmiotem zainteresowania w kontekście rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych. Zrozumienie mechanizmów, przez które ENO1 i MBP-1 wpływają na rozwój nowotworów, może prowadzić do identyfikacji nowych celów terapeutycznych i rozwoju skutecznych strategii leczenia.

ENO1 to ewolucyjnie konserwowany glikolityczny metaloenzym odpowiedzialny za odwracalną dehydratację 2-fosfo-D-glicerynianu do fosfoenolopirogronianu. ENO1 działa jako homodimer, jednakże posiada również zdolność do tworzenia supramolekularnych kompleksów z białkami cytoszkieletu, mitochondriów lub powierzchni komórek, wykazując tym samym aktywność o charakterze wielofunkcyjnym [29,30]. Zwiększona ekspresja ENO1 jest stwierdzana w przebiegu licznych nowotworów litych i hematologicznych oraz towarzyszy wielu chorobom nienowotworowym, m.in. reumatoidalnemu zapaleniu stawów, toczeniowi rumieniowatemu, twardzinie układowej oraz chorobie Alzheimera [31–36]. Podwyższony poziom ENO1 promuje migrację, proliferację oraz inwazję komórek nowotworowych oraz odgrywa kluczową rolę w podtrzymywaniu efektu Warburga. Obniżenie ekspresji ENO1 w komórkach nowotworowych prowadzi do zmniejszenia potencjału inwazyjnego, co czyni go atrakcyjnym celem terapeutycznym w zahamowaniu rozwoju i progresji nowotworu [37–39].

Mechanizmy zaangażowane w regulację ENO1, takie jak regulatory epigenetyczne (np. kompleks białkowy zawierający DEAH-box helikazę 33 (DHX33)) oraz czynniki transkrypcyjne (np. HIF-1 α (czynnik indukowany hipoksją 1 podjednostka alfa)), oddziałują na promotor ENO1, zwiększając jego transkrypcję w warunkach niedotlenienia, które są dominującym środowiskiem wzrostu nowotworów [40,41]. Wyciszenie ENO1 w komórkach ludzkich linii nowotworowych prowadzi do zmniejszenia szybkości glikolizy na korzyść fosforylacji oksydacyjnej przy utrzymującym się wysokim stężeniu glukozy. Skutkiem tego

jest aktywacja szlaku polioliowego, prowadzącego do zużycia komórkowego NADPH i generowania reaktywnych form tlenu, które uszkadzają struktury komórkowe i przyczyniają się do śmierci komórek nowotworowych [37]. Analiza dostępnych danych wskazuje na korelację pomiędzy podwyższonym poziomem ENO1 a złym rokowaniem pacjentów onkologicznych w przypadku raka płuc, jelita grubego, pęcherza moczowego, żołądka, trzustki i glejaka [42–49]. ENO1, poza kanoniczną funkcją, zwiększa inwazyjność komórek nowotworowych poprzez aktywację plazminogenu i degradację macierzy zewnątrzkomórkowej [27,50]. W związku z tym, badacze dążą do opracowania terapii ukierunkowanych na hamowanie ENO1, co może stanowić strategię leczenia różnych nowotworów, chociaż obecność ekspresji ENO1 w wielu prawidłowych typach komórek (m.in. w erytrocytach) stanowi poważne ograniczenie terapii opartych o hamowanie aktywności tego enzymu.

ENO1 może ulegać alternatywnej translacji skutkującej ekspresją skróconej, pozbawionej fragmentu N-końcowego ENO1, formy białka wiążącego promotor *c-MYC* (MBP-1) [51]. MBP-1 wykazuje wysoką homologię z cDNA ENO1 na poziomie 97%. Jako krótsza forma białka o masie 37 kDa, MBP-1 nie zawiera 96 aminokwasów N-końcowych [28]. Poziom ekspresji MBP-1 jest niski, bądź na granicy detekcji w wielu liniach komórek nowotworowych, natomiast występuje stosunkowo wysoki poziom MBP-1 w prawidłowych komórkach centralnego układu nerwowego, śledziony, wątroby i nerek [52,53]. Zwiększenie ekspresji MBP-1 może być indukowane przez różne czynniki, takie jak niedotlenienie, szlak sygnałowy AKT/eIF2a wywołany stresem komórkowym oraz hamowanie proteasomów [52,54,55].

W przeciwieństwie do cytoplazmatycznej lokalizacji ENO1, MBP-1 lokalizuje się w jądrze komórkowym, gdzie działa jako represor transkrypcji szeregu genów docelowych, w tym *c-MYC* i nie wykazuje aktywności enzymatycznej [28,56]. MBP-1 może łączyć się z promotorem *c-MYC*, blokując transkrypcję i prowadząc do zmniejszenia proliferacji i wzrostu komórek nowotworowych [28,51,56]. Ponadto, MBP-1 hamuje działanie co najmniej dwóch innych genów, które biorą udział w kancerogenezie: COX-2 hamując proliferację i przerzuty komórek raka żołądka oraz ERBB2 poprzez wiązanie białka HiDAC1 do promotora w komórkach raka piersi SKBR3 [57,58]. Poprzez interakcję z aktywatorami transkrypcji *c-MYC*, takimi jak wewnątrzkomórkowy Notch-1 (ICN) i długi niekodujący RNA LINC00239, MBP-1 moduluje poziomy *c-MYC*, przeciwdziałając powstawaniu nowotworów [59,60]. Ektopowa ekspresja MBP-1 została wywołana w różnych typach nowotworów, takich jak rak żołądka [57,61], rak piersi [62,63], rak przetyku [59], rak płuc [64,65], rak gruczołu krokowego

[66,67] oraz kostniakomięsak [28]. Zauważono zahamowanie proliferacji, migracji oraz inwazji komórek nowotworowych.

Potencjalne zastosowania MBP-1 w terapii przeciwnowotworowej obejmują możliwość zwiększenia ekspresji tego białka w celu hamowania wzrostu i progresji guzów. Możliwe podejścia terapeutyczne mogą obejmować terapie genowe mające na celu wprowadzenie wektorów do ekspresji MBP-1 w komórkach nowotworowych, stosowanie małych cząsteczek modyfikujących ekspresję MBP-1 lub identyfikację czynników wpływających na ekspresję tego białka w kontekście terapii kombinacyjnej. Określenie potencjału terapeutycznego MBP-1 jako celu molekularnego w terapii przeciwnowotworowej wymaga dalszych badań. Niemniej jednak, przed wprowadzeniem MBP-1 jako terapii przeciwnowotworowej, konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań mających na celu lepsze zrozumienie mechanizmów działania tego białka, jak również ocenę potencjalnych efektów ubocznych związanych z manipulacją ekspresji MBP-1. Ponadto, istotne będzie opracowanie odpowiednich modeli doświadczalnych, które pozwolą na ocenę skuteczności terapii opartej na MBP-1 w różnych typach nowotworów.

Niemniej jednak, w aktualnej literaturze brakuje pełnej oceny znaczenia prognostycznego białka ENO1 oraz białka wiążącego promotor *c-MYC* (MBP-1) w kontekście czerniaka skóry.

5. Cel pracy

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie korelacji ekspresji białka ENO1 ze szczegółowymi parametrami klinicznymi i histopatologicznymi oraz analiza ekspresji ENO1 i jej izoformy MBP-1 w przedklinicznych modelach *in vitro*.

W pracy można wyróżnić cztery cele szczegółowe:

1. Analiza ekspresji i aktywności enzymatycznej alfa-enolazy w warunkach tlenowych i niedotlenienia komórek w czterech liniach czerniaka: dwóch pochodzących z pierwotnych zmian skórnych (A375, WM1341D) i dwóch z przerzutów do węzłów chłonnych (WM9, Hs294T).
2. Analiza korelacji ekspresji ENO1 oznaczonej metodą immunohistochemiczną u 112 pacjentów z czerniakiem skóry ze szczegółowymi parametrami klinicznymi i histopatologicznymi.
3. Badanie wpływu transdukcji linii komórkowych czerniaka za pomocą wektora lentiwirusowego na proliferację oraz metabolizm glukozy komórek.
4. Ocena wpływu lentiwirusowej nadekspresji MBP-1 w dwóch liniach komórkowych czerniaka pochodzących z pierwotnej zmiany nowotworowej (A375) oraz z przerzutów do węzłów chłonnych (WM9).

6. Publikacja I

Publikacja *Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma— An In Vitro and a Clinical Study*

Autorzy: Miriam Hippner, Michał Majkowski, Przemysław Biecek, Teresa Szkudlarek, Aleksandra Simiczyjew, Małgorzata Pieniazek, Dorota Nowak, Arkadiusz Miążek, Piotr Donizy.

Została opublikowana w 2022 roku w czasopiśmie **Diagnostics (IF: 3.992)**

Efekt Warburga, charakterystyczny dla komórek nowotworowych, promuje oddychanie anaerobowe co sprawia, że enzymy szlaku glikolitycznego stają się atrakcyjnym celem potencjalnych terapii nowotworowych. Alfa-enolaza (ENO1) oprócz pełnienia swojej kanonicznej funkcji w szlaku glikolitycznym, odgrywa kluczową rolę w procesach nowotworowych. Jednakże w literaturze, brak jest kompleksowej oceny klinicznej potencjału diagnostycznego i prognostycznego ENO1 w czerniaku skóry.

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono badanie ekspresji i aktywności enzymatycznej ENO1 w liniach komórkowych czerniaka, zarówno pochodzących z guza pierwotnego (A375, WM1341D) jak i z przerzutów do węzłów chłonnych (WM9 i Hs294T). Zastosowano techniki Western blot i immunofluorescencji, w celu określenia poziomu ekspresji ENO1 w komórkach czerniaka oraz jej lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Dodatkowo, oceniono aktywność ENO1, korzystając z interakcji z peroksydazą w pełnych lizatach komórkowych w warunkach normoksji oraz hipoksji. Przeprowadzono także analizę prognostyczną ekspresji ENO1 oznaczonej metodą immunohistochemiczną u 112 pacjentów z czerniakiem skóry ze szczegółowymi parametrami klinicznymi i histopatologicznymi.



Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na wyższą ekspresję ENO1 w liniach czerniaka w porównaniu z prawidłowymi melanocytami. W szczególności linia A375 pochodząca z pierwotnych zmian skórnych charakteryzująca się wysoką agresywnością, wykazywała najwyższy poziom ekspresji i aktywności ENO1. W liniach pochodzących z przerzutów do węzłów chłonnych (WM9 i Hs294T) zaobserwowano znacząco wyższy poziom aktywności ENO1 w hipoksji niż w normoksji, co sugeruje istotną rolę ENO1 w adaptacji komórek nowotworowych do warunków stresu oksydacyjnego. Analiza ekspresji ENO1 u pacjentów z

czerniakiem skóry wykazała istotną korelację między nadekspresją ENO1 a grubością nacieku według skali Breslowa i Clarka, aktywnością mitotyczną i obecnością owrzodzenia. Wysoki poziom ekspresji ENO1 był ściśle związany z gorszym rokowaniem u pacjentów z czerniakiem skóry. Nasze badania wykazały, że nadekspresja ENO1 sprzyja inwazyjności komórek czerniaka i koreluje z agresywnym przebiegiem klinicznym.

Wyniki analizy aktywności enzymatycznej ENO1 w liniach komórkowych czerniaka, przedstawione w niniejszym badaniu, otwierają drogę do dalszych poszukiwań potencjalnych celów prognostycznych i terapeutycznych w leczeniu czerniaka. Ponadto, przedstawione przez nas badanie stanowi pierwsze tego typu opracowanie, opisujące korelację między ekspresją ENO1 a szczegółowymi parametrami klinicznymi i patologicznymi w czerniaku.

Article

Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma—An In Vitro and a Clinical Study

Miriam Hippner ^{1,2}, Michal Majkowski ³, Przemyslaw Biecek ⁴, Teresa Szkudlarek ¹, Aleksandra Simiczyjew ⁵, Malgorzata Pieniazek ⁶, Dorota Nowak ⁵, Arkadiusz Miazek ^{2,7,t} and Piotr Donizy ^{1,*,t}

- ¹ Department of Clinical and Experimental Pathology, Division of Clinical Pathology, Wrocław Medical University, 50-556 Wrocław, Poland; miriam.hippner@gmail.com (M.H.); teresa.szkudlarek@umed.wroc.pl (T.S.)
- ² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 50-375 Wrocław, Poland; arkadiusz.miazek@upwr.edu.pl
- ³ Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, 50-383 Wrocław, Poland; michal.majkowski@uwr.edu.pl
- ⁴ Faculty of Mathematics and Information Science, Warsaw University of Technology, 00-662 Warsaw, Poland; przemyslaw.biecek@gmail.com
- ⁵ Department of Cell Pathology, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, 50-383 Wrocław, Poland; aleksandra.simiczyjew@uwr.edu.pl (A.S.); dorota.nowak@uwr.edu.pl (D.N.)
- ⁶ Department of Oncology and Division of Surgical Oncology, Wrocław Medical University, 53-413 Wrocław, Poland; malgorzatapieniazek@interia.pl
- ⁷ Department of Tumor Immunology, Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, 53-114 Wrocław, Poland
- * Correspondence: piotr.donizy@umed.wroc.pl
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Hippner, M.; Majkowski, M.; Biecek, P.; Szkudlarek, T.; Simiczyjew, A.; Pieniazek, M.; Nowak, D.; Miazek, A.; Donizy, P. Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma—An In Vitro and a Clinical Study. *Diagnostics* **2022**, *12*, 254. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12020254>

Academic Editor: Stamatiou E. Theocharis

Received: 24 November 2021

Accepted: 14 January 2022

Published: 20 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Alpha-enolase (ENO1) undergoes accentuated overexpression in several solid cancers, but little is known about its status in cutaneous melanoma. The aim of this study was to investigate the prognostic significance of ENO1 in surgical resections from melanoma patients and to assess its expression and enzymatic activity in several melanoma cell lines. In clinical analysis, the overexpression of ENO1 in melanoma cells was significantly correlated with advanced clinical stage, presence of metastases in regional lymph nodes, and shorter cancer-specific overall survival and disease-free survival. We also demonstrated high expression of ENO1 in melanoma cell lines compared with normal melanocytes. Our study, which extends previous in vitro research, makes the alpha-enolase a candidate for a promising diagnostic and therapeutic target for various types of cancers. Consequently, additional testing of ENO1 as a target for melanoma therapy is necessary.

Abstract: Alpha-enolase (ENO1) is a glycolytic metalloenzyme, and its overexpression occurs in numerous cancers, contributing to cancer cell survival, proliferation, and maintenance of the Warburg effect. Patients with an overexpression of ENO1 have a poor prognosis. The aim of the present study was to investigate the prognostic significance of ENO1 in surgical resections from 112 melanoma patients and to assess its expression and enzymatic activity in normoxia and hypoxia in several melanoma cell lines. Overexpression of ENO1 in tumor cells from patients was correlated with unfavorable prognosticators such as Breslow thickness, Clark level, mitotic activity, and the presence of ulceration. The expression of ENO1 also positively correlated with a greater thickness of the neoplastic infiltrate and a worse long-term prognosis for patients with cutaneous melanoma. We report significantly higher expression of ENO1 in melanoma cell lines in comparison to normal melanocytes. To conclude, our in vitro and clinical models showed that overexpression of ENO1 promotes invasiveness of melanoma cells and correlates with aggressive clinical behavior. These observations open the way to further search of a potential prognostic and therapeutic target in cutaneous melanoma.

Keywords: ENO1; cutaneous melanoma; melanoma cell lines; immunohistochemistry

1. Introduction

Cutaneous melanoma (CM) is an aggressive skin cancer whose incidence varies considerably between racial and ethnic groups of people. It is generally lower in people with highly pigmented skin chronically exposed to the sun. In Europe, this pattern is typical of the Mediterranean population, where the incidence approximates 5–7 cases/100,000 people [1]. In contrast, in Scandinavian countries and Switzerland, which have a prevalently fair-skin population and intermittent sun exposure, the incidence approximates 25–30 cases/100,000 people [2,3]. The mean CM incidence for the entire EU was 25 cases/100,000 people [4]. The major risk factor of CM, UV irradiation, not only depends on the geographical latitude, but also on the ozone layer depletion. A correlation is reported between a rise in CM incidence and a local thinning of ozone layer [5]. The mortality rate of CM is high, and it further raises with current environmental and lifestyle changes. Apart from cytostatic chemotherapies, new options for CM metastatic tumor treatment including BRAF (B-Raf protooncogene) and MEK (mitogen-activated protein kinase) inhibitors or their combination are available, but they often lead to appearance of chemoresistance [6]. Immunotherapy with anti-CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) or anti-PD-1 (programmed cell death 1) antibodies is generally superior to conventional chemotherapy, although its efficacy depends on the subtype of CM. For example, an anti-PD-1 therapy of uveal, acral, and mucosal melanoma had only limited efficacy with approximately 7%, 23%, and 32% of objective response rates, respectively [7,8]. Therefore, characterizing novel therapeutic targets involved in CM resistance to chemo- and immunotherapies may help to design new therapeutic strategies. One of such promising targets is alpha-enolase (ENO1, EC 4.2.1.11) [9]. It is an evolutionary conserved, glycolytic metalloenzyme responsible for the reversible dehydration of 2-phospho-D-glycerate to phosphoenolpyruvate. It functions as a homodimer, but may also assemble in supramolecular complexes with cytoskeletal, mitochondrial, or cell surface proteins displaying catalytic and “moonlighting” activities [10]. Despite being ubiquitous, ENO1 overexpression often reflects pathophysiological and metabolic status of the cell. An increase in ENO1 expression accompanies numerous human diseases (e.g., rheumatoid arthritis, systemic sclerosis, lupus erythematosus, Alzheimer’s disease), including over 18 classes of solid and hematological cancers [11–15].

Accumulated evidence demonstrates that, in the majority of cancers, ENO1 overexpression contributes to cancerous cell survival, proliferation, and the maintenance of the Warburg effect [9]. Mechanistically, both epigenetic regulators (e.g., DEAH-box helicase 33 (DHX33)-containing protein complex) and transcription factors (e.g., HIF-1 α (hypoxia inducible factor 1 subunit alpha)) operate on an ENO1 promoter to increase ENO1 transcription during hypoxia—a predominant growth milieu of many cancers [16,17]. In ENO1-silenced tumor cell lines, the glycolysis rate diminishes in favor of the oxidative phosphorylation, but glucose influx remains high. This leads to the activation of the polyol pathway consuming cellular NADPH and results in reactive oxygen species formation, which damage cell structures and contribute to the cancer cell senescence and death [18]. The available clinical data points to the poor prognosis and a worse overall survival of patients with increased ENO1 expression in glioma, pancreatic, lung, breast, colon, and bladder cancers [19]. However, in non-small cell lung cancers, ENO1 is downregulated at the protein level, whereas its expression on mRNA level remains elevated [20].

To our knowledge, comprehensive clinical assessment of ENO1 diagnostic and prognostic potential in cutaneous melanoma is not available in the literature. Previously, it was found that in five human skin melanoma cell lines (A375, MeWo, MEL-HO, Colo-800, and Colo-853), the RNA expression levels for ENO1 were upregulated 8–16 fold. Additionally, in the MeWo cell line treated with ascorbate, a reduction of ENO1 protein expression was documented [21]. The ascorbate-induced downregulation of ENO1 correlated with the reduced cell viability and in vitro migration capacity.

The aim of the present study was to investigate the prognostic significance of ENO1 in surgical resections from 112 melanoma patients and to assess its expression and enzymatic activity in normoxia and hypoxia in several melanoma cell lines.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

Human epidermal melanocytes, adult (HEMa, 104–05A) and primary human epidermal melanocytes (lightly pigmented) (HEMn-LP, C0025C) were purchased from Cell Applications Inc (San Diego, CA, USA), and Cascade Biologics/Gibco (Carlsbad, CA, USA), respectively. Human melanoma cells lines Hs294T (HTB–140), A375 (CRL–1619), and WM9 (WM9–01–0001), WM1341D (WM1341D–01–0001) were acquired from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, Porton Down, UK), and Rockland Immunochemicals, Inc. (Pottstown, PA, USA), respectively. A375 cells were cultured in DMEM (Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences—HIIET, PAS, Wrocław, Poland) containing 1 g/L glucose, 1.5 g/mL NaHCO₃, 2 mM glutamine with 15% fetal bovine serum (FBS, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Hs294T, WM9 and WM1341D cells were cultured in DMEM (4.5 g/L glucose, 1.5 g/mL NaHCO₃, 4 mM glutamine) (HIIET, PAS, Wrocław, Poland) with 10% FBS (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Human epidermal melanocytes were grown in melanocyte growth medium (Cell Applications Inc, San Diego, CA, USA). All cells were cultured in 75 cm² cell culture flasks (GoogLab Scientific, Rokocin, Poland) and were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were passaged twice a week using 0.25%/0.05% trypsin/EDTA solution (HIIET, PAS, Wrocław, Poland). Cells were cultured either at normoxia (37 °C, 20.9% O₂, and 5% CO₂) or hypoxia (37 °C, 1% O₂, and 5% CO₂).

2.2. Cell Lysis

Human epidermal melanocytes and melanoma cells were trypsinized and washed twice with phosphate buffered saline (PBS). Next, the cells were resuspended in radioimmunoprecipitation lysis buffer—RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X–100, 0.25% Sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) supplemented with protease inhibitor cocktail (04693116001, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EASYpack, Roche, Mannheim, Germany). After 30 min of incubation on ice, cell extracts were centrifuged at 16,000× g for 20 min at 4 °C. Supernatants were transferred into fresh tubes. The protein concentration in cell lysates was measured using BCA method (71285 Millipore, Burlington, MA, USA).

2.3. Western Blotting

Supernatants containing 5 µg of total protein were denatured at 95 °C for 5 min with a Laemmli sample buffer containing 5% β-mercaptoethanol. Samples were separated using SDS-PAGE and transferred to the PVDF membranes (Millipore, Burlington, MA, USA). Next, the membranes were blocked with 5% skimmed milk in Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST) overnight at 4 °C. Then, membranes were incubated for 1.5 h at room temperature (RT) with primary rabbit antibodies directed against ENO1 (PA5–13459 dilution 1:1000, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and 1/2/3 Akt (sc–8312, H–136, dilution 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Then, after three washes with TBST (Wash buffer), membranes were incubated for 1h at RT with the secondary anti-rabbit antibodies conjugated with horseradish peroxidase. Immunoblots were visualized using the G-Box gel doc system (Syngene, Frederick, MD, USA) and analyzed using ImageJ software (ver 1.53e, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.4. Immunofluorescence

Melanoma cells were seeded on Millicell EZ slide (PEZGS0416, Millipore, Burlington, MA, USA) and after 12 h were fixed in 4% formaldehyde (FA) for 10 min at RT. Subsequently the cells were permeabilized with 0.1% Triton X–100 for 10 min at RT and then blocked with 2% BSA in PBS for 1h. Slides were incubated for 1h at RT with primary antibodies directed against ENO1 (dilution 1:50). The slides were then washed in PBS and incubated for 45 min with secondary anti-Goat IgG antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate

(FITC) (554020, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and DAPI. The slides were washed in PBS and mounted with polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO (10981 Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA).

A Stellaris 8 laser confocal scanning microscope equipped with 63x NA1.4 oil objective (Leica) was used to image samples. All images were taken at the same settings and further analyzed using FIJI software [22]. Images were filtered to remove noise (Median filter, radius = 2), then a triangle threshold was applied to segment cells from which mean fluorescence signals were measured. Data were exported to Excel software and analyzed with a *t*-test.

2.5. Enolase Activity Assay

Enolase activity was tested using the Enolase Activity Assay Kit (MAK178–1KT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were cultured on 6-well-plates, and were then homogenized according to the manufacturer’s instructions. Cell lysates were diluted and combined with a Reaction Mix. The plate was then incubated at 25 °C for 5–10 min, then the absorbance at 570 nm was measured using a Wallac Victor 2 1420 multi-label counter spectrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) every 2–3 min, until the values approached the maximal value of standard curve. The calculation of the enzyme activity was conducted using the manufacturer’s instructions.

2.6. Immunohistochemistry

Tissue microarrays (TMAs) composed of three 1.5 mm tissue cores from each tumor were automatically constructed (TMA Grand Master, Sysmex, Warsaw, Poland). Immunohistochemical analysis was performed using rabbit polyclonal anti-ENO1 antibody (dilution 1:500) on 4- μ m-thick paraffin sections mounted on silanized slides (Agilent DAKO, Santa Clara, CA, USA). The slides underwent automated dewaxing, rehydration, and heat-induced epitope retrieval with EnVision Target Retrieval Solution (Agilent DAKO, Santa Clara, CA, USA) for 30 min at 97 °C in PT Link Pre-Treatment Module for Tissue Specimens (DAKO). Liquid Permanent Red (Agilent DAKO, Santa Clara, CA, USA) was utilized as a detection system. Human breast and pancreatic adenocarcinomas were stained as positive controls. Negative controls were processed using FLEX Rabbit Negative Control, Ready-to-Use (Agilent DAKO, Santa Clara, CA, USA) in place of the primary antibody.

Scoring of ENO1 immunostains was performed using the H-score [(percentage at 1+) \times 1 + (percentage at 2+) \times 2 + (percentage at 3+) \times 3], which integrates the intensity and percentage of positive cells into a combined score. The median H-score (200) was used as a cut-off value for high (H-score > 200) and low ENO1 (H-score \leq 200) expression [23].

2.7. Patients

We analyzed 112 cutaneous melanoma patients treated at the Regional Oncology Centre in Opole, Poland, diagnosed between 2005 and 2010. Patients were enrolled in this study based on the availability of medical documentation and paraffin blocks with primary tumors. Comprehensive clinical data were retrieved from the archival medical records (Regional Oncology Centre, Opole, Poland).

This study was reviewed and approved by the ethics committee of the Wrocław Medical University, Wrocław, Poland (No. 277/2020). The patients did not personally participate in the study, and the results of these investigations did not have any influence on the original treatment of patients since it had already finished. All investigations were performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

Clinical parameters included in this study were age, gender, location of the primary tumor, regional nodal status (including the information of sentinel lymph node biopsy (SLNB) procedures), presence or absence of distant metastases, and information concerning disease recurrence. Based on hematoxylin and eosin (H&E) staining from sections of archival formalin-fixed paraffin-embedded tumor specimens, we evaluated detailed histopathologic parameters: Breslow thickness, Clark level, histological type, mitotic rate

method. ENO1 H-scores ranged from 30 to 300, and the mean H-score value was 194 (± 63.34), median: 202. In all positive cases, we observed predominantly cytoplasmic ENO1 subcellular distribution (Figure 4). For the statistical analysis, we divided the study group into two subgroups: (1) low ENO1 expression (defined as an H-score ≤ 200), and (2) high ENO1 expression (defined as an H-score >200). Low ENO1 immunoreactivity was observed in 56 patients (50%), and ENO1 overexpression was observed also in 56 patients (50%).

3.4. Analysis of Correlations between ENO1 Expression and Clinical Parameters

Overexpression of ENO1 in melanoma cells was significantly correlated with advanced stage of the disease—81% of patients with high expression of ENO1 were classified as pT3 or pT4 ($p < 0.001$). Low ENO1 immunoreactivity was strongly associated with lack of metastases in regional lymph nodes ($p = 0.007$) and lack of recurrence ($p = 0.018$) (Table 1). Moreover, 79% of patients (30/38) diagnosed at stage I according to the AJCC (8th edition) were characterized by low ENO1 immunoreactivity in melanoma cells ($p < 0.001$) (Figure 5).

3.5. Analysis of Correlations between ENO1 Expression and Histopathologic Parameters of Primary Tumors

Advanced primary tumors according to Breslow's and Clark's scales were characterized by overexpression of ENO1 ($p < 0.001$ for both scales). Furthermore, enhanced ENO1 immunoreactivity in melanoma cells was strongly correlated with high mitotic activity and presence of ulceration ($p < 0.001$, and $p = 0.013$, respectively). High tumoral immunologic response was predominantly observed in patients with reduced cytoplasmic ENO1 expression—64% of patients with brisk tumor-infiltrating lymphocytes were characterized by low ENO1 reactivity in melanoma cells ($p = 0.039$). Nodular melanomas, a histologic subtype of cutaneous melanoma with a worse outcome, revealed the highest level of ENO1 expression in comparison to superficial spreading and acral lentiginous melanomas ($p < 0.001$) (Table 2).

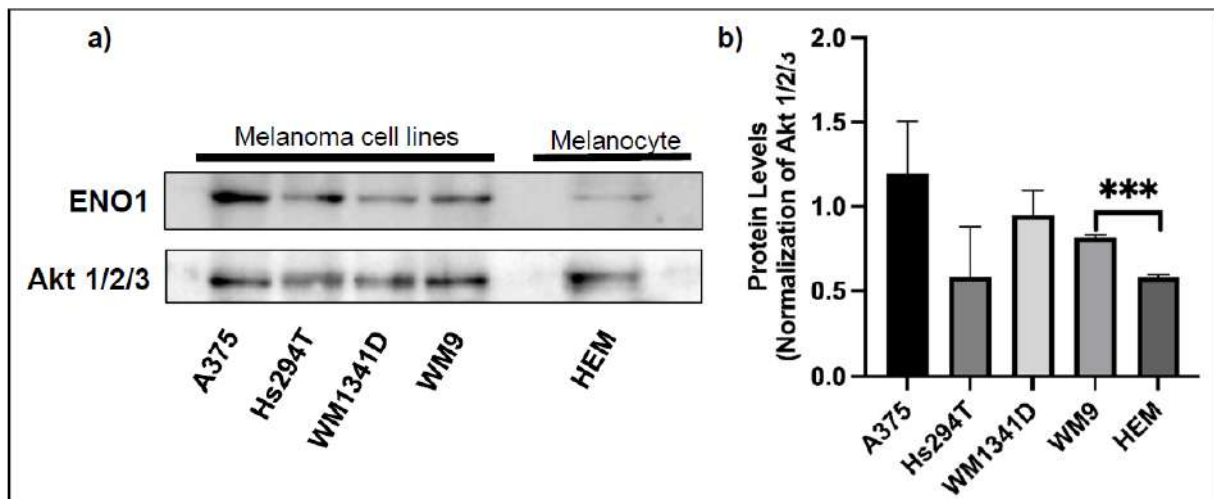


Figure 1. The expression level of ENO1 in the cell lysates from primary melanocytes and melanoma cell lines. Representative Western blots showing ENO1 and Akt 1/2/3 expression (for normalization) in protein lysates obtained from the primary human melanocytes (HEM) and indicated melanoma cell lines (a). Densitometric ENO1/Akt ratios are shown as mean values ($n = 3$ except for HEM, $n = 2$) \pm standard error of the mean (SEM) (b). The significance level was set at $p = 0.001$ – 0.0001 (***).

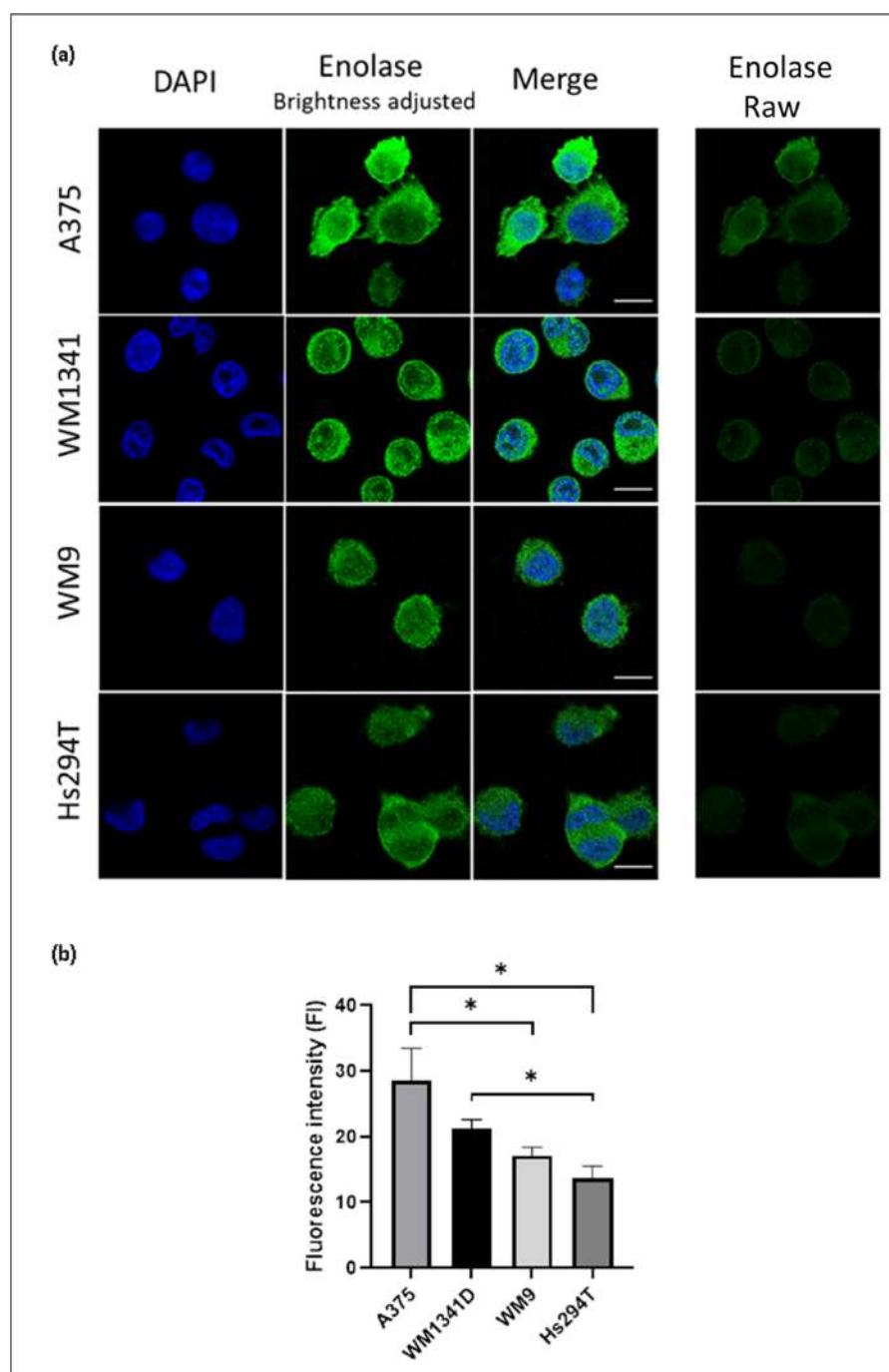


Figure 2. Enolase expression in melanoma cell lines determined by indirect immunofluorescence and confocal microscopy. (a) Single optical sections showing cells stained for ENO1 (green) and DAPI (blue). In the second column ENO1 signal was enhanced by brightness adjustment for the sake of better visualization. Raw images (shown in the last column) were subjected to fluorescence signal intensity analysis. Bar—15 μ m. (b) Fluorescence signal intensity of the ENO1 presented as a mean \pm standard deviation. The significance level was set at $p = 0.05$ – 0.01 (*). Subsequent number of cells were analyzed: A375—40 cells, WM1341D—71 cells, WM9—25 cells, Hs294T—45 cells.

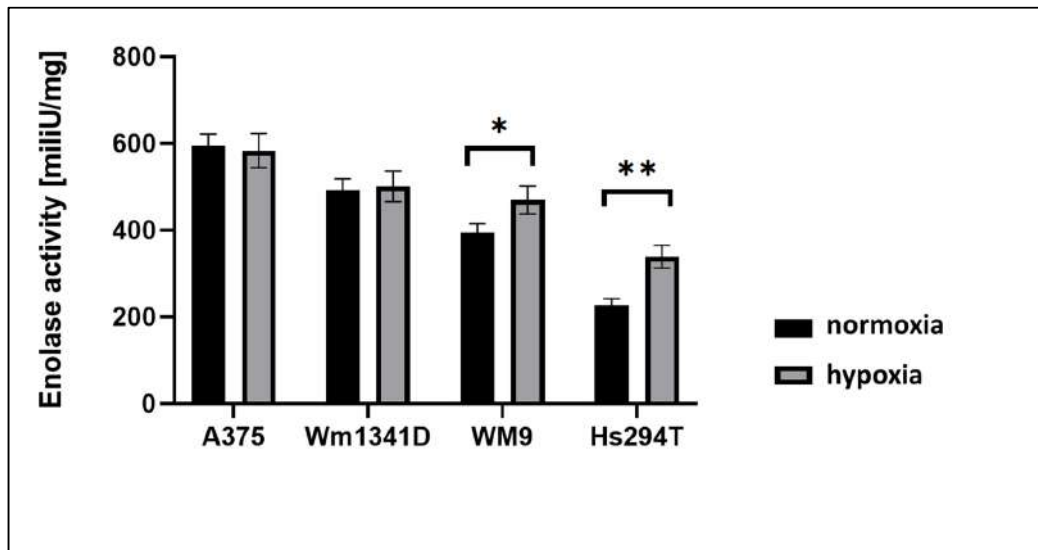


Figure 3. The enolase activity in protein lysates prepared from A375, Hs294T, WM1341D, and WM9 melanoma cells cultured under normoxia or hypoxia. Bars represent mean values ($n = 4$) \pm standard error of the mean (SEM). The significance level was set at $p = 0.05$ – 0.01 (*), $p = 0.01$ – 0.001 (**).

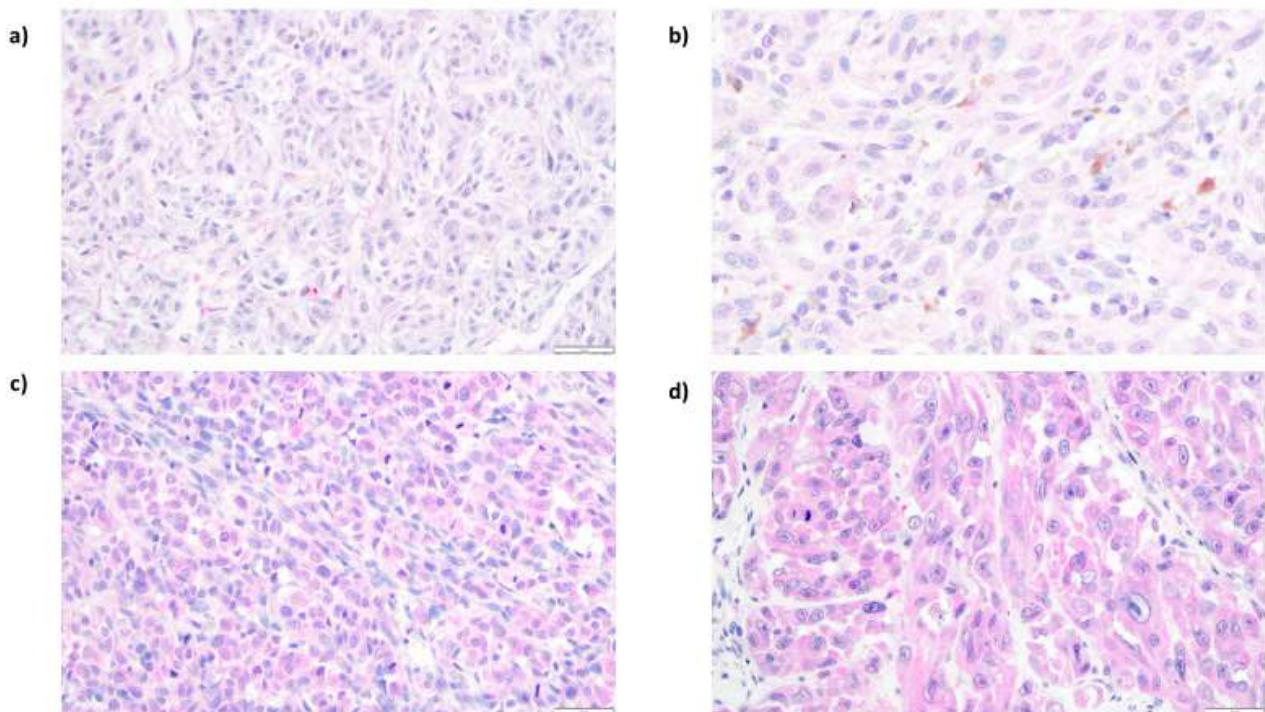


Figure 4. Representative results of immunohistochemical analysis of ENO1 expression in cutaneous melanoma patients. Low cytoplasmic ENO1 immunoreactivity in melanoma cells ((a), 200 \times ; (b), 400 \times). High expression of ENO1 in tumoral cells ((c), 200 \times ; (d), 400 \times).

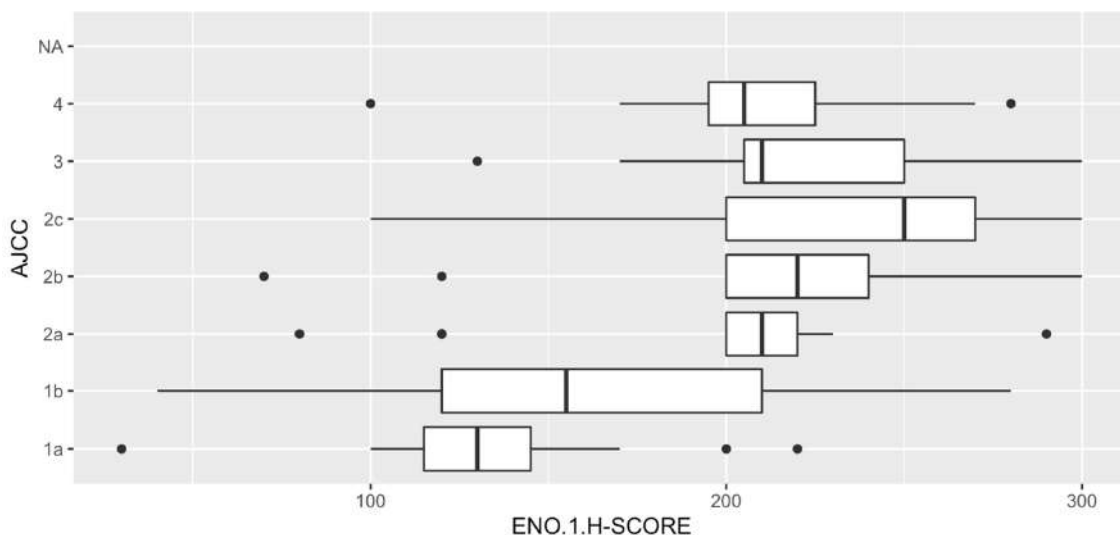


Figure 5. ENO1 expression and AJCC (American Joint Committee on Cancer) staging. The lowest ENO1 expression in tumoral cells was observed in patients with stage I cutaneous melanoma. In stages II-IV, it was observed a significant increasing of ENO1 immunoreactivity in neoplastic cells.

Table 1. Correlations between ENO1 expression and clinical parameters of cutaneous melanoma patients.

Clinical Parameters	ENO1 Expression		p Value
	Low (H-Score ≤200) (N = 56)	High (H-Score >200) (N = 56)	
Age (18–86 years) ^a	64 (52–73)	65 (54–74)	0.40
Gender ^b			1.00
Female	29 (52%)	28 (50%)	
Male	27 (48%)	28 (50%)	
Primary tumor location ^c			0.063
Head/neck	2 (4%)	9 (16%)	
Extremities	22 (39%)	24 (43%)	
Trunk	31 (55%)	21 (38%)	
Hand/foot	1 (2%)	2 (4%)	
Primary tumor (pT) ^a			<0.001
pT1	20 (36%)	5 (9%)	
pT2	13 (23%)	6 (11%)	
pT3	11 (20%)	16 (29%)	
pT4	12 (21%)	29 (52%)	
Sentinel lymph node biopsy status (SNLB) ^b			0.042
No metastases (SNLB–)	19 (76%)	11 (44%)	
Metastases present (SNLB+)	6 (24%)	14 (56%)	
Regional lymph nodes status (pN) ^b			0.007
Metastases absent (pN–)	49 (88%)	36 (64%)	
Metastases present (pN+)	7 (12%)	20 (36%)	
Distant metastases (pM) ^b			0.53
No metastases (pM–)	52 (93%)	49 (88%)	
Metastases present (pM+)	4 (7%)	7 (12%)	
AJCC (8th edition) stage ^a			<0.001
I	30 (54%)	8 (14%)	
II	17 (30%)	25 (45%)	
III	5 (9%)	16 (29%)	
IV	4 (7%)	7 (12%)	
Recurrence ^b			0.018
No	42 (75%)	29 (52%)	
Yes	14 (25%)	27 (48%)	

^a p value of Wilcoxon two sample test; ^b p value of Fisher’s exact test; ^c p value of chi² test.; statistically significant results (p < 0.05) are given in bold; American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Table 2. Correlations between ENO1 expression and histopathological parameters in primary tumors of cutaneous melanoma patients.

Histopathological Parameters	ENO1 Expression		p Value
	Low (H-Score ≤200) (N = 56)	High (H-Score >200) (N = 56)	
Breslow thickness^a			<0.001
≤1 mm	20 (36%)	5 (9%)	
1.01–2.00 mm	13 (23%)	6 (11%)	
2.01–4.00 mm	11 (20%)	16 (29%)	
>4 mm	12 (21%)	29 (52%)	
Clark level^a			<0.001
I	0 (0%)	0 (0%)	
II	24 (43%)	5 (9%)	
III	17 (30%)	24 (43%)	
IV	11 (20%)	20 (36%)	
V	4 (7%)	7 (12%)	
Histological type^c			<0.001
Superficial spreading melanoma	35 (62%)	13 (23%)	
Nodular melanoma	20 (36%)	41 (73%)	
Acral lentiginous melanoma	1 (2%)	2 (4%)	
Mitotic rate^a			<0.001
0	22 (39%)	2 (4%)	
1–2	11 (20%)	5 (9%)	
>2	23 (41%)	49 (87%)	
Ulceration^c			0.013
No	39 (70%)	25 (45%)	
Yes	17 (30%)	21 (55%)	
Lymphangioinvasion^c			1.0
No	54 (96%)	52 (93%)	
Yes	2 (4%)	4 (7%)	
Tumor-infiltrating lymphocytes^c			0.039
No	5 (9%)	2 (4%)	
Non-brisk	28 (50%)	41 (73%)	
Brisk	23 (41%)	13 (23%)	
Microsatellitosis^c			1.00
No	54 (96%)	54 (96%)	
Yes	2 (4%)	2 (4%)	
Regression^c			1.00
No	53 (95%)	54 (96%)	
Yes	3 (5%)	2 (4%)	

^a p of Wilcoxon two sample test; ^b p value of Fisher's exact test; ^c p value of chi² test; statistically significant results (p < 0.05) are given in bold.

3.6. Impact of ENO1 Expression of Long-Term Prognosis of Cutaneous Melanoma Patients

Overexpression of ENO1 in tumor cells significantly correlated with shorter cancer-specific overall survival (p = 0.023) and disease-free survival (p = 0.001) (Figure 6). In univariate Cox regression model high ENO1 immunoreactivity had an important unfavorable impact on long-term survival (HR = 2.4, p = 0.027 for CSOS; and HR = 2.8, p = 0.002 for DFS) (Table 3).

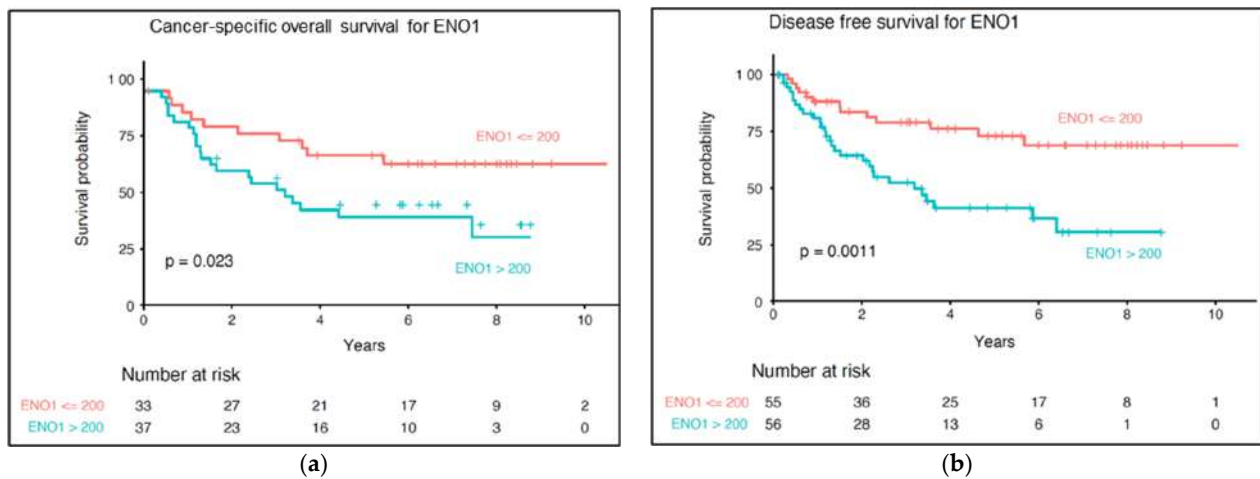


Figure 6. Kaplan–Meier analysis of the prognostic significance of ENO1 expression in cutaneous melanoma patients. Overexpression of ENO1 correlated with shorter cancer-specific overall survival (a) and shorter disease-free survival (b). *p* levels of the log-rank test.

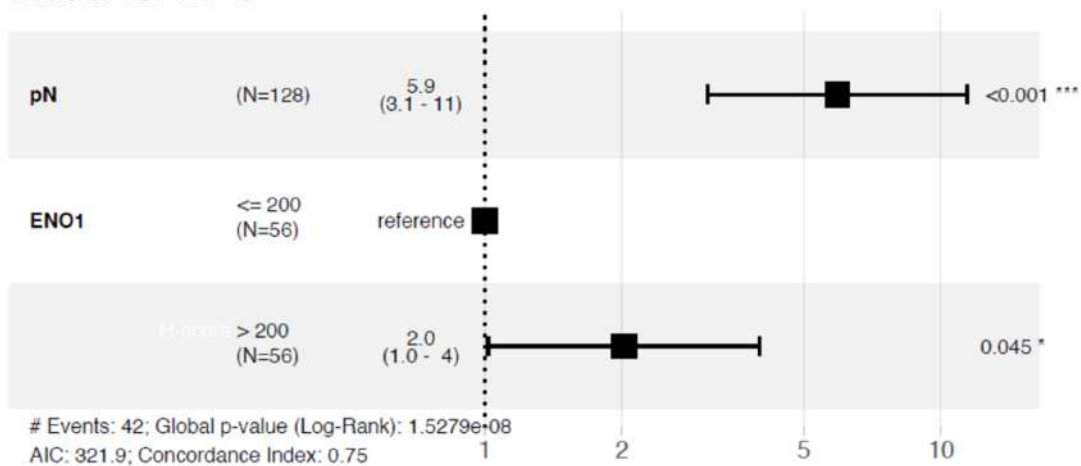
Table 3. Univariate Cox proportional hazards model.

	N	Cancer-Specific Overall Survival			Disease-Free Survival		
		HR	95% CI	<i>p</i> -Value	HR	95% CI	<i>p</i> -Value
Sex	128	0.4	0.2–0.8	0.015 *	0.6	0.4–1.1	0.118
Age	128	3.3	1–10.4	0.043 *	2.0	0.8–4.7	0.126
pN	128	5.3	2.6–11	<0.001 *	7.3	4–13	<0.001 *
pM	128	3.5	1.6–7.4	<0.001 *	3.3	1.7–6.8	<0.001 *
AJCC (8th edition) stage	112	17.4	3.9–77.9	<0.001 *	12.5	4.7–33	<0.001 *
Breslow thickness	128	9.0	2.1–38.7	0.003 *	7.9	2.7–23	<0.001 *
Clark level	128	2.0	1.3–2.9	<0.001 *	1.8	1.4–2.5	<0.001 *
Histologic type	128	2.7	1.5–5	0.001 *	3.3	1.9–5.6	<0.001 *
Ulceration	128	2.9	1.5–6	0.003 *	2.3	1.3–4.1	0.005 *
Lymphovascular invasion	128	2.0	0.6–6.6	0.249	1.1	0.3–4.6	0.877
TILs	128	0.12	0.1–0.5	0.002 *	0.2	0.1–0.9	0.041 *
Microsatellitosis	128	3.1	1.1–8.9	0.035 *	3.5	1.3–9.9	0.016 *
ENO1 H-score	112	2.4	1.1–5	0.027 *	2.6	1.3–4.9	0.005 *

* *p* < 0.05, statistically significant; TILs (tumor-infiltrating lymphocytes).

The multivariable Cox regression model was created to test whether ENO1 expression may be used as an independent prognostic factor. After adjustment for regional lymph node status (HR: 5.9, 95% CI: 3.1–11.0, *p* < 0.001), high ENO1 expression was associated with shorter DFS (HR: 2.0, 95% CI: 1.0–4.0, *p* = 0.045) (Figure 7). When we comprehensively analyzed all the most clinically important parameters (Breslow thickness, nodal status, and distant metastases), ENO1 did not reach statistical significance (Figure 7).

Model for DFS



Model for CSOS

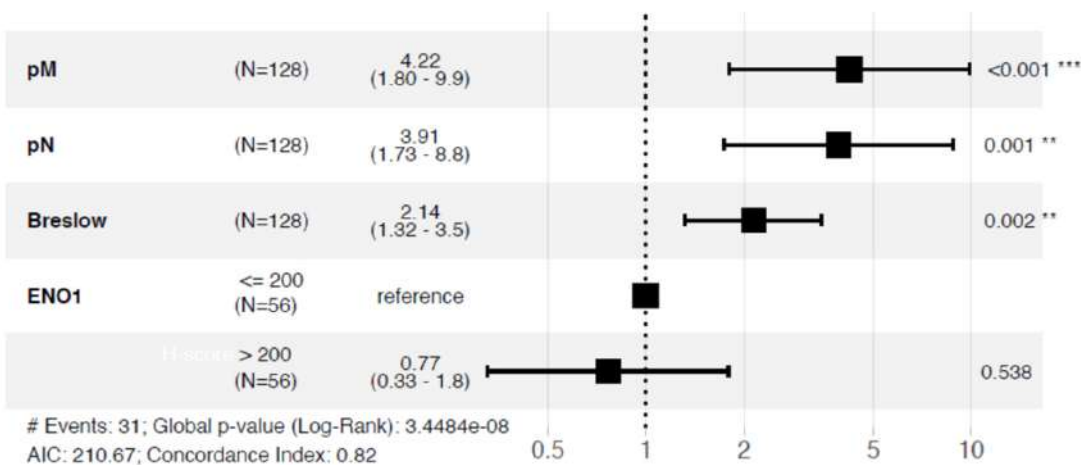


Figure 7. Multivariable regression model for disease-free survival and cancer-specific overall survival in cutaneous melanoma patients (DFS (disease-free survival), CSOS (cancer-specific overall survival)).

4. Discussion

Our in vitro research revealed elevated expression of ENO1 protein and ENO1 enzymatic activity in four melanoma cell lines (A375, WM1341D, WM9, and Hs204T). Previously, overexpression of ENO1 transcript in the A375 cell line was described by Ceconi et al. [21]. In their study, downregulation of ENO1 achieved by the treatment of A375 cells with ascorbic acid led to reduction in cell fitness and migration capacities. Our current analysis of clinical melanoma samples in tissue microarrays also showed an increased expression of ENO1 in melanoma cells. Elevated expression of ENO1 in tumor cells in a cohort of 112 cutaneous melanoma patients correlated with unfavorable prognosticators such as high Breslow thickness, Clark level, increased mitotic activity, and presence of ulceration. Survival analysis revealed that overexpression of ENO1 was associated with shorter cancer-specific overall survival and shorter disease-free survival.

Several glycolytic enzymes including ENO1 were found overexpressed in tumor cells subjected to hypoxia [25]. ENO1 has a crucial role in maintaining the Warburg effect, thus supporting cancer cell proliferation and formation of metastases [26,27]. Our research confirms previous authors' findings about increased ENO1 activity in several solid

cancers [19]. Interestingly, cell lines derived from the lymph node metastases (Hs294T, WM9) had significantly higher levels of ENO1 activity in hypoxia than in normoxia. This observation underlines an important role of ENO1 in tumor cells' adaptation to cellular stress conditions. For example, when overexpressed in non-small cell lung cancer cell lines, ENO1 promoted cell glycolysis, growth, migration, and invasion [28]. Conversely, a knockdown of ENO1 in pancreatic, breast, and lung cancer cell lines induced an inhibition of cell cycle and the cell senescence [18].

To the best of our knowledge, this is the first study, which describes correlations between ENO1 expression and detailed clinical and pathologic parameters in cutaneous melanoma. The present analysis, performed on patients' surgical resection specimens, showed that overexpression of ENO1 in tumoral cells was significantly correlated with disease advancement, the presence of metastases in regional lymph nodes, and shorter cancer-specific overall survival. Our clinical observations are in line with previously published clinical research on several other human cancers [29–35]. Proteomic analysis of peripheral T-cell lymphomas not otherwise specified (PTCL-NOS) revealed a significantly increased ENO1 level (eightfold) in neoplastic cells compared with the non-lymphoma tissue [29]. Moreover, PTCL-NOS patients with high expression of ENO1 had a worse prognosis [29]. In colorectal adenocarcinoma (CRC), Cheng et al. [31] showed that ENO1 overexpression was significantly correlated with the depth of tumor invasion, lymph node metastases, neural invasion, and TNM (Tumor-Node-Metastasis) staging, as well as with worse prognosis. Furthermore, knockdown of ENO1 significantly inhibited CRC cells proliferation and migration in *in vitro* analysis [31]. Functional analyses performed by Hu et al. [36] in CRC demonstrated that CD47 (a molecule which plays a crucial role in the immune escape of tumor cells, proliferation, and formation of metastases) directly interacted with ENO1 and protected it from ubiquitin-mediated degradation, subsequently promoting glycolytic activity and progression of CRC [36]. Similar prognostic results were observed in gastric cancer patients [32]. ENO1 overexpression in tumoral cells was significantly associated with nodal and distant metastases and increased level of ENO1 correlated with shorter overall survival. Interestingly, silencing of ENO1 suppressed Snail-induced epithelial-mesenchymal transition and inhibited the activation of transforming growth factor β (TGF- β) signaling pathway. Both pathways are crucial for progression of gastric cancer [32]. Moreover, ENO1 can be transferred between neoplastic cells via exosome-mediated crosstalk and exosome-derived ENO1 is essential to promote hepatocellular carcinoma growth, metastasis, and patient deterioration [35].

In our previous research, we examined the parameters of invasiveness of melanoma cell lines used in the current study [37–40]. We had shown that the A375 cell line exhibits the highest level of proliferation and cell migration (measured by relative wound density). This is in line with our clinical results, since melanoma cases with ENO1 overexpression were strongly correlated with high mitotic index (clinical equivalent of cell proliferation *in vitro*), and presence of nodal metastases (clinical equivalent of increased cellular migration). Cell lines derived from nodal metastases (WM9 and Hs294T) formed a higher number of adhesive structures supporting invasion called invadopodia, and were the most effective in degradation of extracellular matrix [37–40]. In the current study, we observed significantly higher levels of ENO1 activity in hypoxia than in normoxia in Hs294T and WM9. This result suggests that increased ENO1 activity under hypoxia, better reflecting lymph node milieu, may provide additional survival advantage to metastatic cells and help these cells to invade. Taken together our *in vitro* study demonstrated that A375, cell line with high biological aggressiveness, was characterized by the highest expression level and activity of ENO1. Moreover, hypoxia led to upregulation of ENO1 activity in two cell lines derived from lymph node metastases (WM9, Hs294T), but not in lines from primary skin lesions (A375, WM1341). This result suggests that increased ENO1 activity under hypoxia better reflecting lymph node milieu, and may provide additional survival advantage to metastatic cells.

There is an increasing number of studies reporting the overexpression of ENO1 in human cancers, making it a candidate for a promising therapeutic and diagnostic target

in various types of cancers [9,41,42]. Zhang et al. [43] showed that using cinnamaldehyde (an active ingredient that originates from cinnamon) silences ENO1, arrests the cell cycle, and promotes apoptosis of melanoma cells [43]. The previously discussed ascorbic acid also interacts with ENO1 and induces the apoptosis of melanoma cells [21]. Interestingly, monoclonal antibody directed against ENO1 inhibited invasion, proliferation, and clone formation of cervical cancer cells, suggesting that ENO1mAb triggers promising anti-tumor effects [44]. In the future study, we will test the influence of alternatively spliced nuclear isoform of the ENO1–MBP–1 (a transcriptional repressor of multiple protooncogenes) on cutaneous melanoma cells proliferation and invasion [45].

5. Conclusions

In this research, the overexpression of ENO1 in the melanoma cell lines was correlated with the elevated invasiveness parameters of examined cells. Enhanced ENO1 expression in the cytoplasm of melanoma cells was correlated with unfavorable prognosticators such as Breslow thickness, Clark level, mitotic activity, presence of ulceration, and a worse prognosis in the analyzed cohort of patients. The variety of biological processes in which ENO1 plays an important function ensures areas for future studies. Our observations enable further ways for studies regarding a potential prognostic marker and therapeutic target in cutaneous melanoma.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/diagnostics12020254/s1>, Figure S1. The expression level of ENO1 in the cellular extracts. Full immunoblots show ENO1 (48 kDa) and Akt 1/2/3 in the cell lysates on the same PVDF membrane. The cell lysates were prepared from melanoma cells lines derived from the primary skin lesions (A375, WM1341D) and lymph node metastases (Hs294T, WM9), and normal melanocytes (HEM). Figure S2. A standard curve of enolase activity measured spectrophotometrically at 570nm. Table S1. Full results of densitometric analysis of Western blotting for the ENO1 and Akt 1/2/3. The expression level was researched in four melanoma cell lines: A375, WM9, WM1341D, Hs294T, and one normal melanocyte: HEM. Table S2. Full results of enolase activity measured spectrophotometrically at 570nm in the melanoma cell lines: A375, Hs294T, WM1341D, and WM9, cultured in normoxic and hypoxic conditions.

Author Contributions: Conceptualization, M.H., A.M. and P.D.; methodology, M.H., M.M., P.B., T.S., A.S., D.N., A.M. and P.D.; software, M.M. and P.B.; Validation, M.H., M.M., T.S., A.M. and P.D.; formal analysis, M.H., P.B., D.N., A.M. and P.D.; investigation, M.H., M.M., T.S., A.S., D.N., A.M. and P.D.; resources, M.P., A.M. and P.D.; data curation, M.H., M.M., M.P., A.M. and P.D.; writing—original draft preparation, M.H., A.M. and P.D.; writing—review and editing, M.H., M.M., P.B., T.S., A.S., M.P., D.N., A.M. and P.D.; visualization, M.H., M.M. and P.D.; supervision, A.M. and P.D.; project administration, A.M. and P.D.; funding acquisition, A.M. and P.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financially supported by the Ministry of Health subvention according to number of STM.B131.20.090 and SUB.B130.21.062 from the IT Simple system of Wroclaw Medical University. The publication was also prepared under the project financed from the funds granted by the Ministry of Education and Science in the “Regional Initiative of Excellence” programme for the years 2019–2022, project number 016/RID/2018/19, the amount of funding 9 354 023,74 PLN.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of the Wroclaw Medical University, Poland (No. 277/2020).

Informed Consent Statement: Due to the retrospective nature of the study and the lack of impact on the treatment of patients, it was not necessary to obtain informed consent.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

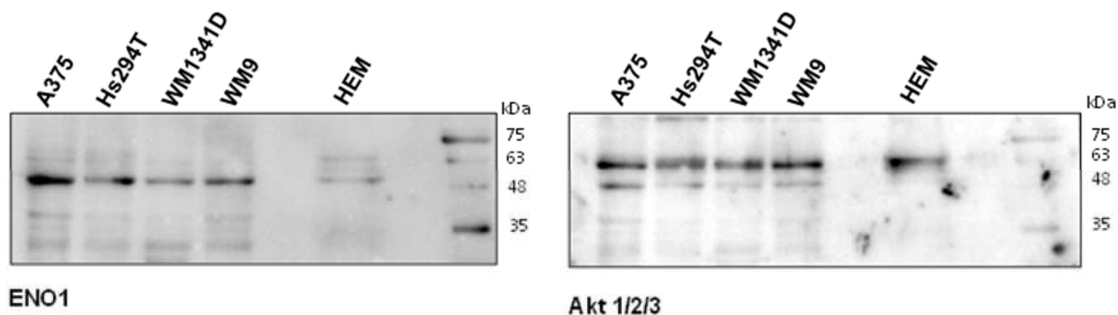
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rastrelli, M.; Tropea, S.; Rossi, C.R.; Alaibac, M. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *Vivo* **2014**, *28*, 1005–1011.
2. Robsahm, T.E.; Bergva, G.; Hestvik, U.E.; Møller, B. Sex Differences in Rising Trends of Cutaneous Malignant Melanoma in Norway, 1954–2008. *Melanoma Res.* **2013**, *23*, 70–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Minini, R.; Rohrmann, S.; Braun, R.; Korol, D.; Dehler, S. Incidence Trends and Clinical–Pathological Characteristics of Invasive Cutaneous Melanoma from 1980 to 2010 in the Canton of Zurich, Switzerland. *Melanoma Res.* **2017**, *27*, 145–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Conforti, C.; Zalaudek, I. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma: A Review. *Dermatol Pract. Concept.* **2021**, *11* (Suppl. 1), e2021161S. Available online: <https://dpcj.org/index.php/dpc/article/view/dermatol-pract-concept-articleid-dp11S1a161S> (accessed on 12 March 2021). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lucas, R.M.; Norval, M.; Neale, R.E.; Young, A.R.; de Gruijl, F.R.; Takizawa, Y.; van der Leun, J.C. The Consequences for Human Health of Stratospheric Ozone Depletion in Association with Other Environmental Factors. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 53–87. [[CrossRef](#)]
6. Long, G.V.; Stroyakovskiy, D.; Gogas, H.; Levchenko, E.; de Braud, F.; Larkin, J.; Garbe, C.; Jouary, T.; Hauschild, A.; Grob, J.J.; et al. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1877–1888. [[CrossRef](#)]
7. Shoushtari, A.N.; Munhoz, R.R.; Kuk, D.; Ott, P.A.; Johnson, D.B.; Tsai, K.K.; Rapisuwon, S.; Eroglu, Z.; Sullivan, R.J.; Luke, J.J.; et al. The Efficacy of Anti-PD-1 Agents in Acral and Mucosal Melanoma. *Cancer* **2016**, *122*, 3354–3362. [[CrossRef](#)]
8. Algazi, A.P.; Tsai, K.K.; Shoushtari, A.N.; Munhoz, R.R.; Eroglu, Z.; Piulats, J.M.; Ott, P.A.; Johnson, D.B.; Hwang, J.; Daud, A.I.; et al. Clinical Outcomes in Metastatic Uveal Melanoma Treated with PD-1 and PD-L1 Antibodies. *Cancer* **2016**, *122*, 3344–3353. [[CrossRef](#)]
9. Capello, M.; Ferri-Borgogno, S.; Cappello, P.; Novelli, F. α -Enolase: A Promising Therapeutic and Diagnostic Tumor Target. *FEBS J.* **2011**, *278*, 1064–1074. [[CrossRef](#)]
10. Didiasova, M.; Schaefer, L.; Wygrecka, M. When Place Matters: Shuttling of Enolase-1 Across Cellular Compartments. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 61. [[CrossRef](#)]
11. Perconti, G.; Pratesi, F.; Angelotti, F.; Manca, L.; Puxeddu, I.; Rubino, P.; Maranto, C.; Giallongo, A.; Migliorini, P. Fingerprinting of Anti-Alpha Enolase Antibodies in Systemic Sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2020**, *38* (Suppl. 1), 115–119. [[PubMed](#)]
12. Li, M.; Li, J.; Wang, J.; Li, Y.; Yang, P. Serum Level of Anti- α -Enolase Antibody in Untreated Systemic Lupus Erythematosus Patients Correlates with 24-Hour Urine Protein and D-Dimer. *Lupus* **2018**, *27*, 139–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cho, H.; Um, J.; Lee, J.-H.; Kim, W.-H.; Kang, W.S.; Kim, S.H.; Ha, H.-H.; Kim, Y.-C.; Ahn, Y.-K.; Jung, D.-W.; et al. ENOblock, a Unique Small Molecule Inhibitor of the Non-Glycolytic Functions of Enolase, Alleviates the Symptoms of Type 2 Diabetes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44186. [[CrossRef](#)]
14. Butterfield, D.A.; Lange, M.L.B. Multifunctional Roles of Enolase in Alzheimer’s Disease Brain: Beyond Altered Glucose Metabolism. *J. Neurochem.* **2009**, *111*, 915–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Altenberg, B.; Greulich, K.O. Genes of Glycolysis Are Ubiquitously Overexpressed in 24 Cancer Classes. *Genomics* **2004**, *84*, 1014–1020. [[CrossRef](#)]
16. Semenza, G.L.; Roth, P.H.; Fang, H.M.; Wang, G.L. Transcriptional Regulation of Genes Encoding Glycolytic Enzymes by Hypoxia-Inducible Factor 1. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 23757–23763. [[CrossRef](#)]
17. Peng, C.; Hou, S.; Deng, C.; Zhang, Y. Function of DHX33 in Promoting Warburg Effect via Regulation of Glycolytic Genes. *J. Cell. Physiol.* **2021**, *236*, 981–996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Capello, M.; Ferri-Borgogno, S.; Riganti, C.; Chattaragada, M.S.; Principe, M.; Roux, C.; Zhou, W.; Petricoin, E.F.; Cappello, P.; Novelli, F. Targeting the Warburg Effect in Cancer Cells through ENO1 Knockdown Rescues Oxidative Phosphorylation and Induces Growth Arrest. *Oncotarget* **2016**, *7*, 5598–5612. [[CrossRef](#)]
19. Schofield, L.; Lincz, L.F.; Skelding, K.A. Unlikely Role of Glycolytic Enzyme α -Enolase in Cancer Metastasis and Its Potential as a Prognostic Biomarker. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2020**, *6*, 10. [[CrossRef](#)]
20. Chang, Y.S.; Wu, W.; Walsh, G.; Hong, W.K.; Mao, L. Enolase-Alpha Is Frequently down-Regulated in Non-Small Cell Lung Cancer and Predicts Aggressive Biological Behavior. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9 Pt 1*, 3641–3644. [[PubMed](#)]
21. Ceconi, D.; Carbonare, L.D.; Mori, A.; Cheri, S.; Deiana, M.; Brandi, J.; Degaetano, V.; Masiero, V.; Innamorati, G.; Mottes, M.; et al. An Integrated Approach Identifies New Oncotargets in Melanoma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 11489–11502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. Available online: <http://www.nature.com/articles/nmeth.2019> (accessed on 12 March 2021). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Donizy, P.; Wu, C.-L.; Mull, J.; Fujimoto, M.; Chłopik, A.; Peng, Y.; Shalin, S.C.; Selim, M.A.; Puig, S.; Fernandez-Figueras, M.-T.; et al. Up-Regulation of PARP1 Expression Significantly Correlated with Poor Survival in Mucosal Melanomas. *Cells* **2020**, *9*, 1135. [[CrossRef](#)]
24. Kassambara, A.; Kosinski, M.; Biecek, P. Survminer: Drawing Survival Curves Using “Ggplot”. Available online: <https://cran.r-project.org/package=survminer> (accessed on 12 March 2020).

25. Park, H.S.; Kim, J.H.; Sun, B.K.; Song, S.U.; Suh, W.; Sung, J.-H. Hypoxia Induces Glucose Uptake and Metabolism of Adipose-Derived Stem Cells. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 4706–4714. [[CrossRef](#)]
26. Zhang, T.; Suo, C.; Zheng, C.; Zhang, H. Hypoxia and Metabolism in Metastasis. *Adv. Med. Exp. Biol.* **2019**, *1136*, 87–95. [[CrossRef](#)]
27. Rofstad, E.K.; Rasmussen, H.; Galappathi, K.; Mathiesen, B.; Nilsen, K.; Graff, B.A. Hypoxia Promotes Lymph Node Metastasis in Human Melanoma Xenografts by Up-Regulating the Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 1847–1853.
28. Fu, Q.-F.; Liu, Y.; Fan, Y.; Hua, S.-N.; Qu, H.-Y.; Dong, S.-W.; Li, R.-L.; Zhao, M.-Y.; Zhen, Y.; Yu, X.-L.; et al. Alpha-Enolase Promotes Cell Glycolysis, Growth, Migration, and Invasion in Non-Small Cell Lung Cancer through FAK-Mediated PI3K/AKT Pathway. *J. Hematol. Oncol.* **2015**, *8*, 22. [[CrossRef](#)]
29. Ludvigsen, M.; Bjerregård Pedersen, M.; Lystlund Lauridsen, K.; Svenstrup Poulsen, T.; Hamilton-Dutoit, S.J.; Besenbacher, S.; Bendix, K.; Møller, M.B.; Nørgaard, P.; D'Amore, F.; et al. Proteomic Profiling Identifies Outcome-Predictive Markers in Patients with Peripheral T-Cell Lymphoma, Not Otherwise Specified. *Blood Adv.* **2018**, *2*, 2533–2542. [[CrossRef](#)]
30. Yang, M.; Sun, Y.; Sun, J.; Wang, Z.; Zhou, Y.; Yao, G.; Gu, Y.; Zhang, H.; Zhao, H. Differentially Expressed and Survival-Related Proteins of Lung Adenocarcinoma with Bone Metastasis. *Cancer Med.* **2018**, *7*, 1081–1092. [[CrossRef](#)]
31. Cheng, Z.; Shao, X.; Xu, M.; Zhou, C.; Wang, J. ENO1 Acts as a Prognostic Biomarker Candidate and Promotes Tumor Growth and Migration Ability Through the Regulation of Rab1A in Colorectal Cancer. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 9969–9978. [[CrossRef](#)]
32. Xu, X.; Chen, B.; Zhu, S.; Zhang, J.; He, X.; Cao, G.; Chen, B. Hyperglycemia Promotes Snail-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition of Gastric Cancer via Activating ENO1 Expression. *Cancer Cell Int.* **2019**, *19*, 344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Liu, J.; Yang, Q.; Sun, H.; Wang, X.; Saiyin, H.; Zhang, H. The Circ-AMOTL1/ENO1 Axis Implicated in the Tumorigenesis of OLP-Associated Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 7219–7230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yin, H.; Wang, L.; Liu, H.-L. ENO1 Overexpression in Pancreatic Cancer Patients and Its Clinical and Diagnostic Significance. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2018**, *2018*, 1–7. [[CrossRef](#)]
35. Jiang, K.; Dong, C.; Yin, Z.; Li, R.; Mao, J.; Wang, C.; Zhang, J.; Gao, Z.; Liang, R.; Wang, Q.; et al. Exosome-Derived ENO1 Regulates Integrin A6β4 Expression and Promotes Hepatocellular Carcinoma Growth and Metastasis. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Hu, T.; Liu, H.; Liang, Z.; Wang, F.; Zhou, C.; Zheng, X.; Zhang, Y.; Song, Y.; Hu, J.; He, X.; et al. Tumor-Intrinsic CD47 Signal Regulates Glycolysis and Promotes Colorectal Cancer Cell Growth and Metastasis. *Theranostics* **2020**, *10*, 4056–4072. [[CrossRef](#)]
37. Pietraszek-Gremplewicz, K.; Simiczyjew, A.; Dratkiewicz, E.; Podgórska, M.; Styczeń, I.; Matkowski, R.; Ziętek, M.; Nowak, D. Expression Level of EGFR and MET Receptors Regulates Invasiveness of Melanoma Cells. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 8453–8463. [[CrossRef](#)]
38. Simiczyjew, A.; Pietraszek-Gremplewicz, K.; Dratkiewicz, E.; Podgórska, M.; Matkowski, R.; Ziętek, M.; Nowak, D. Combination of Selected MET and EGFR Inhibitors Decreases Melanoma Cells' Invasive Abilities. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1116. [[CrossRef](#)]
39. Makowiecka, A.; Simiczyjew, A.; Nowak, D.; Mazur, A.J. Varying Effects of EGF, HGF and TGFβ on Formation of Invadopodia and Invasiveness of Melanoma Cell Lines of Different Origin. *Eur. J. Histochem.* **2016**, *60*, 2728. [[CrossRef](#)]
40. Dratkiewicz, E.; Pietraszek-Gremplewicz, K.; Simiczyjew, A.; Mazur, A.J.; Nowak, D. Gefitinib or lapatinib with foretinib synergistically induce a cytotoxic effect in melanoma cell lines. *Oncotarget* **2018**, *9*, 18254–18268. [[CrossRef](#)]
41. Yu, S.; Li, N.; Huang, Z.; Chen, R.; Yi, P.; Kang, R.; Tang, D.; Hu, X.; Fan, X. A Novel LncRNA, TCONS_00006195, Represses Hepatocellular Carcinoma Progression by Inhibiting Enzymatic Activity of ENO1. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 1184. [[CrossRef](#)]
42. Wang, L.; Bi, R.; Yin, H.; Liu, H.; Li, L. ENO1 Silencing Impairs Hypoxia-Induced Gemcitabine Chemoresistance Associated with Redox Modulation in Pancreatic Cancer Cells. *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*, 4470–4480. [[PubMed](#)]
43. Zhang, W.; Gao, J.; Cheng, C.; Zhang, M.; Liu, W.; Ma, X.; Lei, W.; Hao, E.; Hou, X.; Hou, Y.; et al. Cinnamaldehyde Enhances Antimelanoma Activity through Covalently Binding ENO1 and Exhibits a Promoting Effect with Dacarbazine. *Cancers* **2020**, *12*, 311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gou, Y.; Li, F.; Huo, X.; Hao, C.; Yang, X.; Pei, Y.; Li, N.; Liu, H.; Zhu, B. ENO1 Monoclonal Antibody Inhibits Invasion, Proliferation and Clone Formation of Cervical Cancer Cells. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, *11*, 1946–1961. [[PubMed](#)]
45. Liu, Z.; Zhang, A.; Zheng, L.; Johnathan, A.F.; Zhang, J.; Zhang, G. The Biological Significance and Regulatory Mechanism of c-Myc Binding Protein 1 (MBP-1). *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Supplement



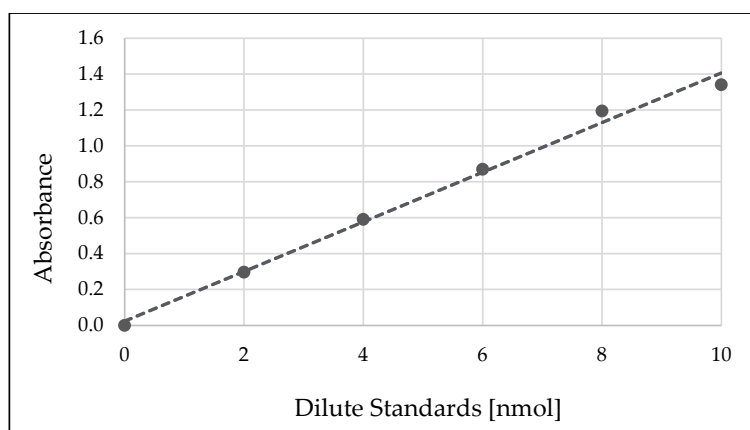
Supplementary Figure S1. The expression level of ENO1 in the cellular extracts. Full immunoblots show ENO1 (48 kDa) and Akt 1/2/3 in the cell lysates on the same PVDF membrane. The cell lysates were prepared from melanoma cells lines derived from the primary skin lesions (A375, WM1341D) and lymph node metastases (Hs294T, WM9), and normal melanocytes (HEM).

Supplementary Table S1. Full results of densitometric analysis of Western blotting for the ENO1 and Akt 1/2/3. The expression level was researched in four melanoma cell lines: A375, WM9, WM1341D, Hs294T, and normal melanocyte: HEM. (SEM (standard error of the mean))

Cell line	Repetitions	ENO1	Akt 1/2/3	Protein levels	Mean protein levels	SEM
A375	I	37.33	20.55	1.82	1.19	0.31
	II	5.54	6.36	0.87		
	III	5.66	6.37	0.89		
Hs294T	I	19.56	16.63	1.18	0.58	0.30
	II	2.29	7.64	0.30		
	III	2.13	7.71	0.28		
WM1341D	I	10.34	15.70	0.66	0.95	0.15
	II	7.47	6.69	1.12		
	III	7.06	6.57	1.08		
WM9	I	18.74	22.29	0.84	0.82	0.01
	II	7.12	8.83	0.81		
	III	7.23	8.92	0.81		
HEM	I	14.03	24.83	0.57	0.58	0.01
	II	4.85	8.16	0.59		

Supplementary Table S2. Full results of enolase activity measured spectrophotometrically at 570nm in the melanoma cell lines: A375, Hs294T, WM1341D, and WM9, cultured in normoxic and hypoxic conditions. (SEM (standard error of the mean))

Cell line	Repetitions	Normoxic			hypoxic			p-value
		Enolase activity [miliU/mg]	Mean [miliU/mg]	SEM	Enolase activity [miliU/mg]	Mean [miliU/mg]	SEM	
A375	I	525.80	595.28	26.40	472.39	583.77	39.43	ns
	II	636.36			639.68			
	III	582.58			583.33			
	IV	636.36			639.68			
WM1341D	I	426.53	492.77	25.33	401.50	500.91	35.15	ns
	II	532.40			550.63			
	III	479.76			500.87			
	IV	532.40			550.63			
WM9	I	341.14	394.38	20.34	378.97	469.51	31.96	0,047
	II	426.18			514.55			
	III	384.01			469.99			
	IV	426.18			514.55			
Hs294T	I	188.93	227.53	14.70	265.14	338.93	26.15	0,005
	II	250.45			376.09			
	III	220.27			338.41			
	IV	250.45			376.09			



Supplementary Figure S2. A standard curve of enolase activity measured spectrophotometrically at 570nm.

8. Publikacja II

Publikacja *Overexpression of c-MYC Promoter Binding Protein-1 Enhances Proliferation and Glucose Metabolism of Melanoma Cells Lines*

Autorzy: Miriam Hippner-Kunicka, Agnieszka Łaszkiewicz, Joanna Skrzymowska, Przemysław Biecek, Piotr Donizy, Arkadiusz Miązek.

Została opublikowana w 2023 roku w czasopiśmie **Anticancer Research (IF: 2,435)**

Białko wiążące promotor *c-MYC* (MBP-1) jest produktem alternatywnej translacji mRNA kodującego alfa-enolazę (ENO1). W przeciwieństwie do ENO1, białko MBP-1 nie wykazuje aktywności enzymatycznej, a jego lokalizacja w jądrze komórkowym pozwala mu działać jako represor transkrypcji *c-MYC*. Ponadto, MBP-1 może oddziaływać na inne geny zaangażowane w proces kancerogenezy.

Z uwagi na właściwości biologiczne białka MBP-1, stworzono sześć stabilnych transfektantów opartych na dwóch różnych liniach czerniaka ludzkiego: A375 (wywodzącej się z guza pierwotnego) oraz WM9 (wywodzącej się z przerzutów do węzłów chłonnych). W tym celu przygotowano cząstki lentiwirusowe (wektory lentiwirusowe) pozwalające na nadekspresję białka MBP-1, jego mutantu z C-końcową delecją (MBP-1 Δ C) oraz wektorów kontrolnych PRRL. Za pomocą metody Western blot i immunofluorescencji wykryto znacznik HA-tag związany z C-końcem nadekspresjonowanych białek. Następnie użyto techniki PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) do oszacowania wpływu nadekspresji MBP-1 na transkrypcję *c-MYC*. Ponadto przeprowadzono test włączania 5-etyniło-2'-dezoksyurydyny (EdU) do rosnącego łańcucha DNA w celu oceny tempa proliferacji komórek oraz test wykrywania uwolnionego do podłoża hodowlanego mleczanu w celu pomiaru szybkości glikolizy komórek w normoksji i hipoksji. Ostatecznie wykonano test *in vitro* zarastania rysy w celu oceny zdolności migracyjnej komórek transdukowanych.

W komórkach transdukowanych pustym wektorem zaobserwowano spadek szybkości proliferacji linii oraz zmniejszenie ilości wydzielanego przez komórki mleczanu w warunkach hipoksji w porównaniu do komórek nietraktowanych (-Mock). Wyniki te sugerują wpływ transdukcji lentiwirusowej na zmiany ekspresji genów zaangażowanych w proliferację komórek nowotworowych oraz metabolizm glukozy w niedotlenieniu. Metoda

immunofluorescencji pozwoliła na zlokalizowanie nadekspresjonowanych białek: MBP-1 i MBP-1ΔC w cytoplazmie komórkowej, które tylko minimalnie wpłynęło na zmniejszenie ekspresji mRNA *c-MYC*. Komórki transdukowane MBP-1 wykazywały zwiększoną szybkość proliferacji oraz metabolizmu glukozy w warunkach normoksji i hipoksji w porównaniu do komórek transdukowanych pustym wektorem. Transdukcja MBP-1 wpłynęła na zmniejszenie zdolności migracji komórek WM9, jednak nie wykazała znaczącego wpływu na komórki A375. Brak wpływu nadekspresji MBP-1ΔC na tempo zarastania rysy w komórkach WM9 sugeruje, że domena C-końcowa MBP-1 pełni kluczową rolę w tym efekcie. Na tej podstawie można wnioskować, że domena C-końcowa białka MBP-1 jest niezbędna do promowania proliferacji i migracji komórek WM9 transdukowanych MBP-1.

Badania wykazały, że transdukcja lentiwirusowa linii komórkowych czerniaka znacząco wpływa na proliferację oraz metabolizm glukozy. W artykule przedstawiono nieoczekiwaną aktywność MBP-1, która może przyczyniać się do progresji nowotworu. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że istnieje inny, dotąd nieznan mechanizm transportu MBP-1 pomiędzy jądrem a cytoplazmą.

Overexpression of *c-MYC* Promoter Binding Protein-1 Enhances Proliferation and Glucose Metabolism of Melanoma Cells Lines

MIRIAM HIPPIER-KUNICKA^{1,2}, AGNIESZKA LASZKIEWICZ³, JOANNA SKRZYMOWSKA³,
PRZEMYSŁAW BIECEK⁴, PIOTR DONIZY¹ and ARKADIUSZ MIAZEK^{2,3}

¹Department of Clinical and Experimental Pathology, Division of Clinical Pathology,
Wrocław Medical University, Wrocław, Poland;

²Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland;

³Department of Tumor Immunology, Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy,
Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland;

⁴Faculty of Mathematics and Information Science, Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland

Abstract. *Background/Aim:* *c-MYC* promoter binding protein (MBP-1) is a product of alternatively translated mRNA encoding alpha-enolase (ENO1). In contrast to ENO1, MBP-1 possesses no enzymatic activity but acts as a transcriptional repressor of *c-MYC*. Ectopic over-expression of MBP-1 in tumor cells was shown to reduce cell proliferation and tumorigenicity, thus making it an attractive target for anticancer strategies. This study aimed to assess the effects of MBP-1 over-expression on human cutaneous melanoma cell lines. *Materials and Methods:* We over-expressed the full-length MBP-1 or its C-terminal truncated variant (MBP-1ΔC), in two human melanoma cell lines (A375, WM9) and assessed their subcellular localization. qPCR was then used to quantitate *c-MYC* transcription. Further, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation assay was used to measure cell proliferation and a lactate assay was performed to measure the glycolysis rate of cells in normoxia and hypoxia. Finally, an *in vitro* wound-healing assay was performed to evaluate cell migration. *Results:* The over-expressed MBP-1 variants predominantly localized in the cytoplasm and barely decreased *c-MYC* expression. Unexpectedly, the proliferation rate of MBP-1-transduced cells increased in comparison to controls, as did the rate of glucose metabolism in hypoxia. Furthermore, over-expression of MBP-1, but not MBP-1ΔC, led to a substantial decrease

in the cell migration capacity of metastatic WM9 cells but not A375 cells from the primary tumor lesion. *Conclusion:* Miss-localization of over-expressed MBP-1 in the cytoplasm of two melanoma cell lines resulted in an unexpected tumor promoting activity by increasing cell proliferation and glycolysis rates in hypoxia.

c-MYC promoter binding protein (MBP-1) is a product of alternatively translated mRNA encoding alpha-enolase (ENO1) (1). The molecular mechanism of MBP-1 translation remains incompletely understood. MBP-1 expression level is relatively high in normal brain, spleen, liver, and kidney tissues but is barely detectable in numerous cancer cell lines (2, 3). This is in contrast to ENO1 expression that is up-regulated in numerous tumors such as low-grade glioma and high-grade meningioma (4), breast cancer (5), colorectal cancer (6), endometrial carcinoma (7) and gastric cancer (8). It has been postulated that hypoxia (9), cellular stress-induced AKT/eIF2a signaling pathway (10), and inhibition of proteasome (2) upregulate MBP-1 expression. At least two functional characteristics distinguish MBP-1 from ENO1. First, MBP-1 lacks 2-phosphoglycerate dehydratase activity, and second, it preferentially localizes (through an unknown mechanism) in the cell nucleus where it acts as a transcriptional repressor of *c-MYC* (1, 11, 12). Apart from the *c-MYC* promoter, MBP-1 is also able to directly repress transcription of at least two other genes involved in tumorigenesis, namely *COX-2* and *ERBB2* (13, 14) and is also capable of suppressing transcription from the HIV-1 core promoter (15). Moreover, by interacting with *c-MYC* transcriptional activators, such as intracellular Notch-1 (ICN) (16) and the long non-coding RNA LINC00239 (17), MBP-1 modulates *c-MYC* levels counteracting tumorigenesis. Numerous studies demonstrate that ectopic over-expression of MBP-1 in gastric (13, 18), breast (5, 19) esophageal (17), lung

Correspondence to: Arkadiusz Miazek, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, ul. Norwida 31, 50-375, Wrocław, Poland. Tel: +48 713201029, e-mail: arkadiusz.miazek@upwr.edu.pl

Key Words: Alpha enolase, ENO1, MBP-1, *c-MYC* binding protein, cutaneous melanoma.

(20, 21), prostate (22, 23) and osteosarcoma cancer cell lines inhibits cell proliferation, migration, and invasion (24). However, in one study, retinoic acid-induced down-regulation of ENO1 and MBP-1, decreased the invasiveness of follicular thyroid carcinoma cell lines (25). In this study, we aimed at assessing the effects of lentiviral over-expression of MBP-1 in two cutaneous melanoma cell lines derived from primary tumor lesion (A375) and from metastatic site (WM9) (26, 27) In our previous study, we demonstrated that both A375 and WM9 over-express ENO1 and that this feature positively correlates with the invasiveness of cutaneous melanoma (28). Here, we unexpectedly found that lentiviral transduction of A375 and WM9 with the full-length MBP-1 (MBP-1-HA) and the C-terminal deletion mutant (MBP-1ΔC-HA) resulted in their sequestration in the cell cytoplasm, concomitantly increasing cell proliferation and glycolysis rates in comparison to empty vector-transduced controls. Our findings predict the existence of an as yet unidentified MBP-1 nuclear import mechanism and suggest the tumor-promoting activity of MBP-1 that can be largely dissociated from its nuclear localization.

Materials and Methods

Cell culture. Cells lines: A375 (CRL-1619) and HEK-293T (CRL-3216) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), WM9 (WM9-01-0001) from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, Porton Down, UK), while LentiX-293T cells were from the Hirschfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences (HIET, PAS, Wrocław, Poland).

The A375 cell line and its derivatives (A375-MBP1-HA, A375-MBP1ΔC-HA, and A375-pRRRL) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, HIET) containing 2 mM glutamine, 1.5 g/ml NaHCO₃, 1 g/l glucose, and 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). WM9 cells and their derivatives (WM9-MBP1-HA, WM9-MBP1ΔC-HA, and WM9-pRRRL) were cultured in DMEM enriched with 4 mM glutamine, 1.5 g/ml NaHCO₃, 4.5 g/l glucose (HIET) and 10% FBS. HEK-293T and HEK LentiX cells were cultured in DMEM medium (HIET, PAS) supplemented with 2 mM glutamine, 4.5 g/l glucose, and 10% of FBS. The cells were cultured under standard conditions at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at normoxia (20.9% O₂) or hypoxia (1% O₂).

RNA isolation and reverse transcription. RNA was isolated using RNA Extracol (E3700, EURx Sp. z o.o., Gdansk, Poland) following the manufacturer's instructions. After checking its quality on agarose gel, 5 µg of RNA was reverse-transcribed according to the instructions provided by the manufacturer of NG dART RT-PCR Kit (E0802, EURx Sp. z o.o.).

Construction of expression vectors coding for MBP-1-HA or MBP-1ΔC-HA. The sequences of either MBP-1 or its truncated version (MBP-1ΔC) were amplified by PCR using Platinum™ SuperFi II Green PCR Master Mix (12369010, Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) from HEK LentiX cDNA. The restriction sites for cloning and the HA tag sequence were incorporated in the

primers. The MluI site was added to the forward primer (HRMlu_hENO1F) and the XhoI site and HA sequence were introduced to the reverse primers (HRXho_ENO1_HAR for MBP-1 and HRXho_hENO1_HAd51R for MBP-1ΔC) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Amplification was conducted for 35 cycles in an MJ Research PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, Inc, Waltham, MA, USA). Both versions of the obtained MBP1 cDNA were cloned to pRRRL-CMV-IRES-PURO – self-inactivating lentiviral expression vector (29) *via* MluI and XhoI restriction sites using standard cloning techniques. The sequences of the inserts were verified by Sanger sequencing. Obtained vectors were named: pRRRL-MBP1-HA; pRRRL-MBP1ΔC-HA, and pRRRL (an empty control).

Lentiviral transduction of A375, WM9 and HEK293T cell lines. Lentiviral particles were produced by transient transfection of around 3 ml of HEK293T LentiX cells with 6 µg of the expression vector (pRRRL-MBP1-HA, pRRRL-MBP1ΔC-HA or control pRRRL), 3 µg of pMDL-g/p-RRE [Addgene, Watertown, MA, USA, (30)], 1.5 µg pRSV-REV [Addgene, Watertown, MA, USA (30)] and 1.5 µg of pMk-VSVG (29) using Transporter 5 Transfection Reagent (Polysciences, Inc, Warrington, PA, USA). After 18-24 h the medium was changed. Culture supernatants (4 ml) containing viral particles were collected 48-72 h after transfection, clarified through 0.45 µm pore size filter (Millipore, Burlington, MA, USA), and used for the transduction of A375, WM9, and HEK293T cell lines without concentration. About 5×10⁴ cells were plated in 2.5 ml of DMEM medium containing 8 µg/ml of polybrene (Millipore) and infected overnight with viruses contained in 0.5 ml of supernatant. The next day, puromycin selection (2 µg/ml) was applied to the transduced cells and non-transduced control cells to ensure that only stably transfected cells were cultured.

Real-time PCR analyses. The real-time PCR (RT-PCR) analyses were performed using the PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). The reaction was conducted in the QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) under the conditions described in the following steps: a hold stage (50°C for 2 min, 95°C for 2 min), 40 cycles of amplification (94°C for 15 s, 58°C for 15 s, 72°C for 1 min) and a melt curve stage (95°C for 15 s, 60°C for 1 min, 95°C for 15 s). One microliter of the cDNA (section 2.2) or the non-reverse-transcribed negative control was used for a single reaction. For each primer set the standard curve was generated by using a series of 5-fold dilutions of one of the template cDNAs. Expression level of cMyc was normalized to Hprt as endogenous control. The specificity of the products was verified by melting curve analysis.

Cell lysis. Cells were lysed in ice-cold RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.25% Sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) supplemented with protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EASYpack, Roche, Mannheim, Germany); the solution was incubated for 30 min on ice. Insoluble materials were centrifuged at 16,000 × g for 20 min at 4°C. The obtained supernatant was transferred into new tubes. The protein concentration was measured using the BCA method (Millipore). After adding Laemmli buffer with 5% β-mercaptoethanol the supernatants containing 10 µg of total protein were denatured at 95°C for 5 min.

Western blotting. The proteins were separated using SDS-PAGE and transferred to the PVDF membranes (Immobilon, IPVH00010,

Merck Millipore). Then, the membranes were blocked with 5% skimmed milk in TBST (Tris-Buffered saline with Tween 20) at 4°C, overnight, and probed for 1.5 h at room temperature with primary monoclonal mouse antibodies against HA-Tag, clone 2-2.2.14 (Thermo Fisher Scientific, dilution 1:500) or recombinant rabbit monoclonal antibody against ENO1 (Thermo Fisher Scientific, dilution 1:1,000). After washing with TBST, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with the secondary anti-rabbit or anti-mouse antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP). For loading control, the mouse monoclonal antibody against GAPDH conjugated to HRP (sc365062, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, dilution 1:250) or rabbit polyclonal antibody against Akt1/2/3 was used (sc-8312, H-136, dilution 1:500, Santa Cruz Biotechnology). Blots were visualized using ChemiDoc™ Imaging Systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) or G-Box gel doc system (Syngene, Frederick, MD, USA). The Immunohistochemistry images were analyzed using the ImageJ software (ver 1.53e, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Immunofluorescence. The cells were cultured on Culture-Insert (4 Well in μ -Dish 35 mm, 80466, Ibbidi, Gräfelfing, Germany) and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 and blocked with 2% BSA in PBS. Subsequently, the primary antibody directed against HA Tag (26183, Thermo Fisher Scientific) at a concentration of 2 μ g/ml was applied for 1 h at room temperature. Following that, the slides were washed with PBS and incubated for 45 min with secondary antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), and DAPI. Then, polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO (10981, Sigma-Aldrich) was applied to the slides. The microscope imaging was performed using Olympus BX50 Fluorescence Microscope (Olympus, Tokyo, Japan) with 40 \times objective.

Proliferation test. Cells were grown on 6-well plates and then incubated for 1 h with 10 μ M EdU in the culture medium. After harvesting with trypsin 0.25%/0.05% trypsin/EDTA solution (HIET, PAS), the cells were washed three times with PBS. Subsequently, EdU was detected using Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's protocol. The experimental data were acquired on BD FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using Flowing software (ver 2.5.1, Centre for Biotechnology University, Turku, Finland).

Migration test. For the migration assay, the cell lines WM9-Mock, WM9-MBP-1-HA, WM9-MBP-1 Δ C-HA, WM9-PRRL and A375-Mock, A375-MBP-1-HA, A375-MBP-1 Δ C-HA, and A375-PRRL were seeded on Culture-Inserts (4 Well in μ -Dish 35 mm, 80466, Ibbidi) at 4 \times 10⁴ cells per well and incubated for 24 h. When the cells reached 100% confluence the insert was removed. The cells were photographed every 6 h (four replicates for each line), using an Inverted Microscope (Zeiss, ID-03, Oberkochen, Germany) fitted with a MI-20 digital camera (Opta-tech, Warsaw, Poland).

Lactate detection. The lactate concentration in the supernatant was measured using the Lactate Assay Kit (MAK064, Sigma-Aldrich). Cells were plated at 0.1 \times 10⁶ cells per well and cultured overnight, under standard cell culture conditions. Thereafter, cells were washed 3 times with PBS and incubated for 24 h in normoxia or hypoxia in

Ex-Cell (EX-CELLTM 610-HSF, 14610C, SAFC Biosciences, Inc, Lenexa, KS, USA) without FBS. The supernatant was collected, briefly centrifuged to remove debris, and transferred into clean tubes. The lactate level was measured according to the manufacturer's assay kit procedure. The absorbance of samples was measured at 450 nm using a Wallac Victor 2 1420 multi-label counter spectrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). The concentration of L-lactate was calculated using the manufacturer's instructions.

Subcellular fractionation. The cell lines were extracted using the NE-PER® nuclear and cytoplasmic extraction kit (Thermo Fisher Scientific). The separate cytoplasmic and nuclear protein fractions were prepared according to the manufacturer's protocol. Cells were trypsinized and washed with PBS, then 1 million cells of each cell line were transferred to a clean tube. The dry pellet was dissolved in CER I and incubated for 10 min on ice, then CER II was added to the tube. After 1 min of incubation on ice, the cells were centrifuged, and the resulting supernatant containing cytoplasmic proteins was transferred to a clean tube. The pellet containing nuclear proteins was washed twice with CER I and resuspended in NER reagent. The sample was incubated for 40 min on ice (vortexed every 10 min), centrifuged, and the supernatant (nuclear extract) was transferred to a clean tube. The protein concentration in nuclear and cellular extracts was measured using the BCA method (Merck Millipore). Next, the extract was denatured for 5 min at 95°C with a Laemmli buffer containing 5% β -mercaptoethanol.

Statistical analysis and data presentation. Data were analyzed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). The Shapiro-Wilk test was performed to evaluate the normality of the values. A one-way ANOVA test was then used, followed by an F-test to determine if there was a significant difference between the means of the groups. Pairwise comparisons were performed using Student's t-test. The post hoc multiple comparisons were conducted using Dunn's test. The level of significance was set at $p\leq 0.05$ (8), $p\leq 0.01$ (**), $p\leq 0.001$ (***), and $p\leq 0.0001$ (****). The graphical visualization of the data was created using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Over-expression of MBP-1-HA and MBP-1 Δ C-HA in the cutaneous melanoma cell lines A375 and WM9. Since we found no published data on MBP-1 expression in human melanoma cell lines, we first evaluated endogenous expression levels of ENO1/MBP-1 in cell lysates of two human cutaneous melanoma cell lines, A375 and WM9, and in control human embryonic kidney cell line HEK293T. For this purpose, we performed western blotting on total cell lysates or fractions enriched in nuclear and cytoplasmic proteins. Figure 1A show that ENO1 expression levels were comparable between the total cell lysates of all tested cell lines. In contrast, the expression of MBP-1 was not detected in the cytoplasmic fraction of any tested cell line but could be visualized in the nuclear fraction of melanoma cell lines, and more abundantly in control HEK293T cells. Furthermore, MBP-1 was also detected in the total cell lysate of HEK293T.

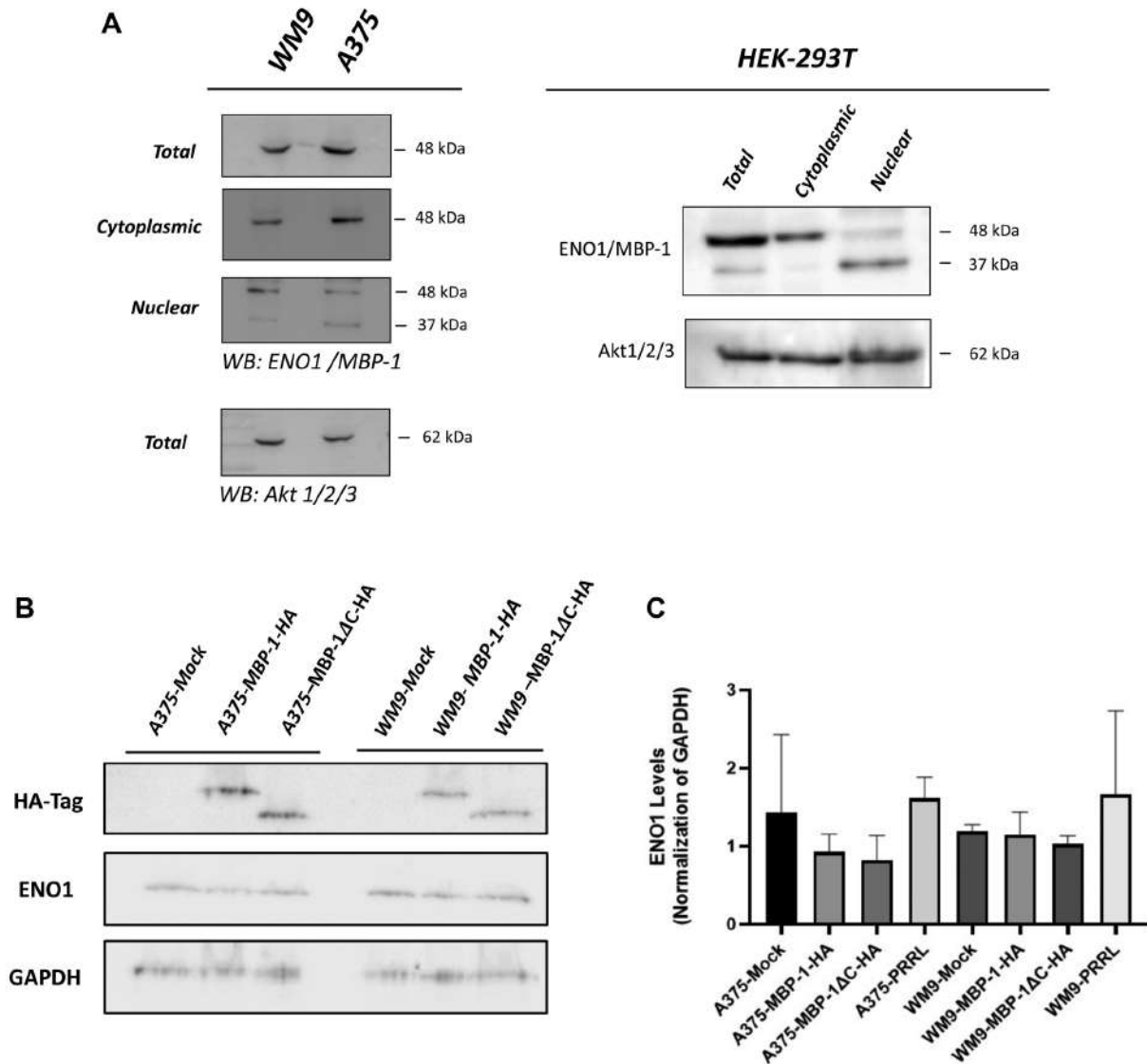


Figure 1. Western blot detection of ENO1 (48 kDa), MBP-11 (37 kDa), Akt1/2/3 (62 kDa), GAPDH (38 kDa), HA-tagged MBP-1-HA (37 kDa), and MBP-1ΔC-HA (31 kDa) in total cell lysates or cytoplasmic and nuclear-enriched lysate fractions from indicated cells. (A) ENO1/MBP-1 expression in WM9, A3785, and HEK293T cell lysates was normalized to Akt1/2/3 (B) Detection of HA-Tagged recombinant proteins and alpha-enolase (ENO1) in total cell lysates from lentivirally transduced (A375-MBP-1-HA, A375-MBP-1-DC-HA, WM9-MBP-1-HA, WM9-MBP-1DC-HA), and mock transduced control cell lines (A375-Mock, WM9-Mock) (C) Densitometric analysis of ENO1/GAPDH ratios in lentivirally transduced or mock transduced cells, represented as mean±standard error of the mean (SEM) of three independent experiments.

These observations corroborated with previously published results indicating that the MBP-1 expression in non-tumor cell lines is more elevated than in tumor cell lines and that endogenous MBP-1 is predominantly localized in the cell nucleus (24, 31). We next performed lentiviral transduction of melanoma cell lines and control HEK293T cells with the full-

length MBP-1 protein or its C-terminal deletion mutant, which was previously shown to retain the *c-MYC* promoter suppressor activity but is devoid of direct cell death-induction activity in murine fibroblasts (32). In Figure 1B, the presence of over-expressed MBP-1-HA and MBP-1ΔC-HA proteins is demonstrated using western blotting on total A375 and WM9

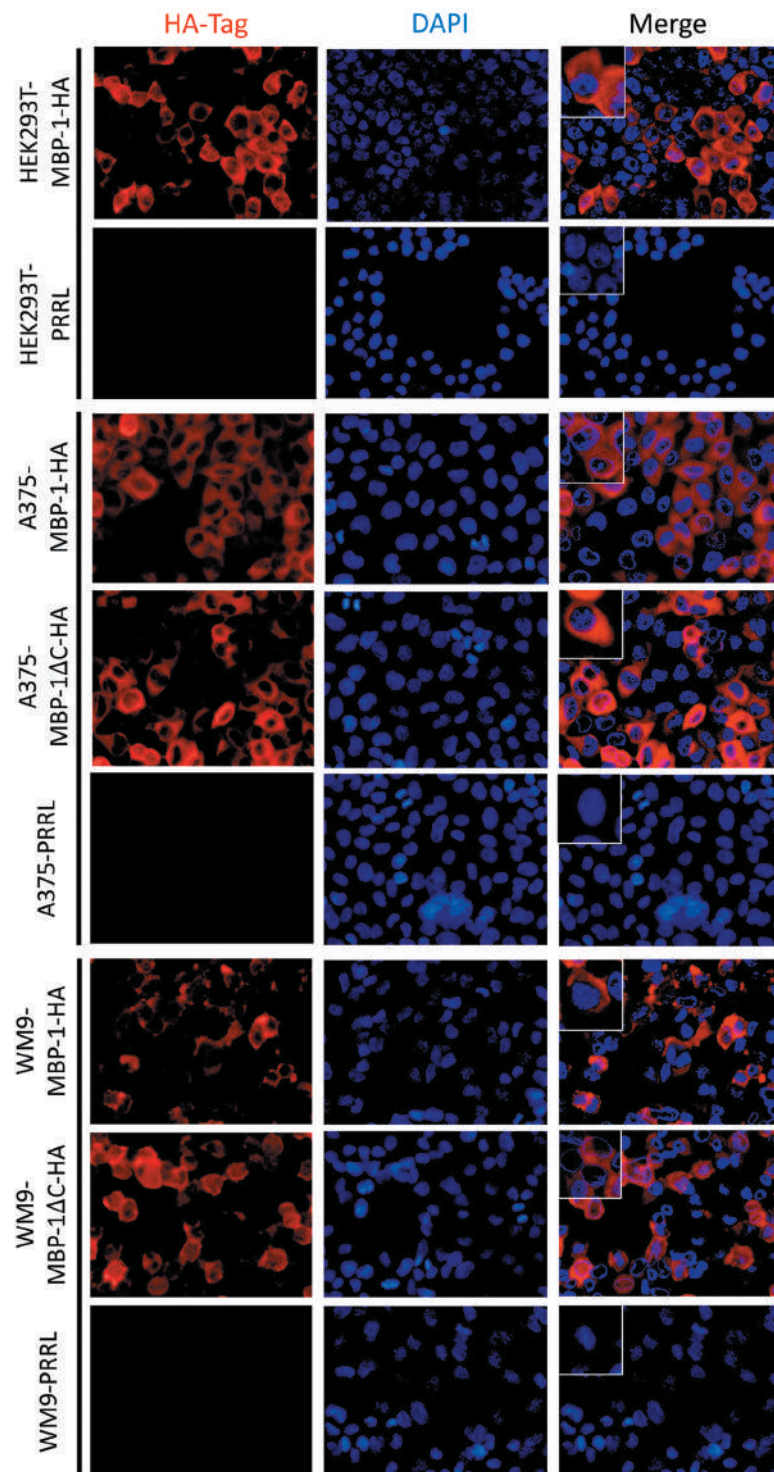


Figure 2. Subcellular localization of (HA) tag in transduced cells. The representative immunofluorescence images of non-transduced cell lines (A375-Mock, WM9-Mock) and transduced cell lines (A375-MBP-1-HA, A375-MBP-1ΔC-HA, WM9-MBP-1, WM9-MBP-1ΔC) stained for HA-Tag (red) and DAPI for cell nuclear (blue).

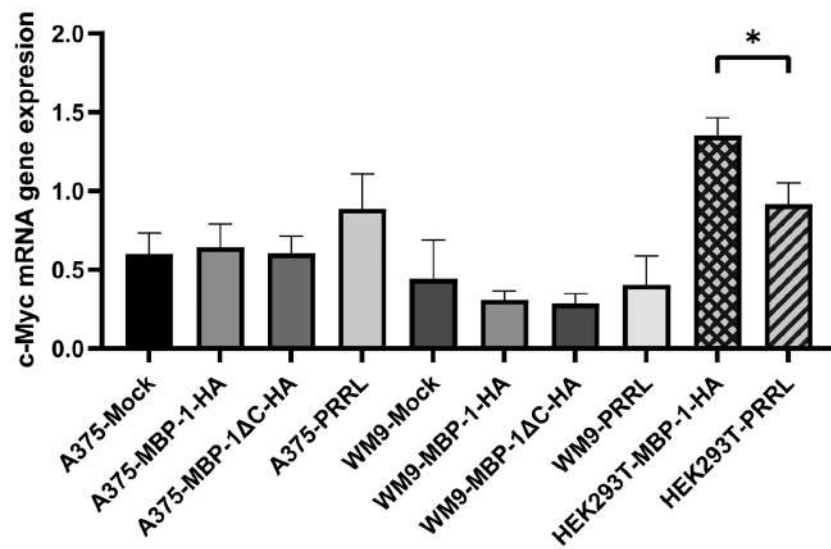


Figure 3. Real-time PCR analysis of *c-MYC* mRNA expression. Expression levels were normalized to *Hprt*. Collective results of a minimum of three independent experiments \pm SEM are shown. The significance level was set at $p \leq 0.05$ (*).

cell lysates with an antibody specific to the hemagglutinin (HA) tag. These results confirmed the successful over-expression of MBP-1 protein variants in melanoma cell lines. Moreover, since reciprocal regulation of ENO1 and MBP-1 translation was previously reported (9), we assessed how over-expression of MBP-1 variants affected endogenous ENO1 expression. Figure 1C shows the expression levels of ENO1 in MBP-1 transduced cells. A statistically insignificant trend of ENO1 down-regulation was noted in transduced cells.

Sequestration of MBP-1-HA and MBP-1ΔC-HA in the cytoplasm of cutaneous melanoma cell lines A375 and WM9, and control HEK293T cells. When ectopically over-expressed in COS-7 African green monkey kidney fibroblasts, and Skbr3 human breast adenocarcinoma, MBP-1 was shown to localize to various extents in the cell nucleus and cytoplasm (11, 14). To examine the subcellular localization of MBP-1-HA and MBP-1ΔC-HA after lentiviral transduction of A375, WM9, and control HEK293T cells, we intracellularly stained polyclonal (non-subcloned) populations of puromycin resistant transduced cells with an anti-HA tag antibody followed by image collection using a fluorescent microscopy. Figure 2 shows that MBP-1-HA and MBP-1ΔC-HA predominantly localized in the cytoplasm of all the tested cells.

Cytoplasmic expression of MBP-1-HA and MBP-1ΔC-HA in melanoma cell lines minimally affects c-MYC transcription. The over-expression of MBP-1 in numerous tumor cell lines was directly linked to the down-regulation of *c-MYC*

expression at transcriptional and translational levels. To assess how mostly cytoplasmic MBP-1 over-expression in A375 and WM9 cell lines affected the transcription level of *c-MYC*, we performed quantitative real-time PCR analyses (Figure 3). *C-MYC/Hprt* expression ratios assessed on the polyclonal population of puromycin-resistant transduced, or control cells revealed the highest basal expression of *c-MYC* in HEK293T cells and that their transduction with MBP-1 further increased *c-MYC* transcription by 47.7%. In contrast, lentiviral transduction of MBP-1-HA and MBP-1ΔC-HA constructs into A375 and WM9 cell lines had no significant effect on *c-MYC* transcription.

Increased proliferation of MBP-1-HA and MBP-1ΔC-HA-transduced A375 and WM9 melanoma cell lines. *C-MYC* over-expression is commonly observed in numerous malignant cell types and it is positively correlated with cell proliferation (33). As both A375 and WM9 cells express *c-MYC* we examined their proliferation rate after the lentiviral transduction of MBP-1-HA and MBP-1ΔC-HA constructs. Figure 4 shows the incorporation of the nucleoside analog 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) into the genomic DNA of growing A375 and WM9 cells. We found that cell transduction with an empty lentiviral vector (PRRL) significantly decreased the proliferation rate of A375 and WM9 by 55.1%, and 31%, respectively. Moreover, when compared to PRRL-transduced cells, over-expression of MBP-1-HA increased the proliferation of A375 and WM9 cell lines by 16.8% and 62.2%, respectively. We also

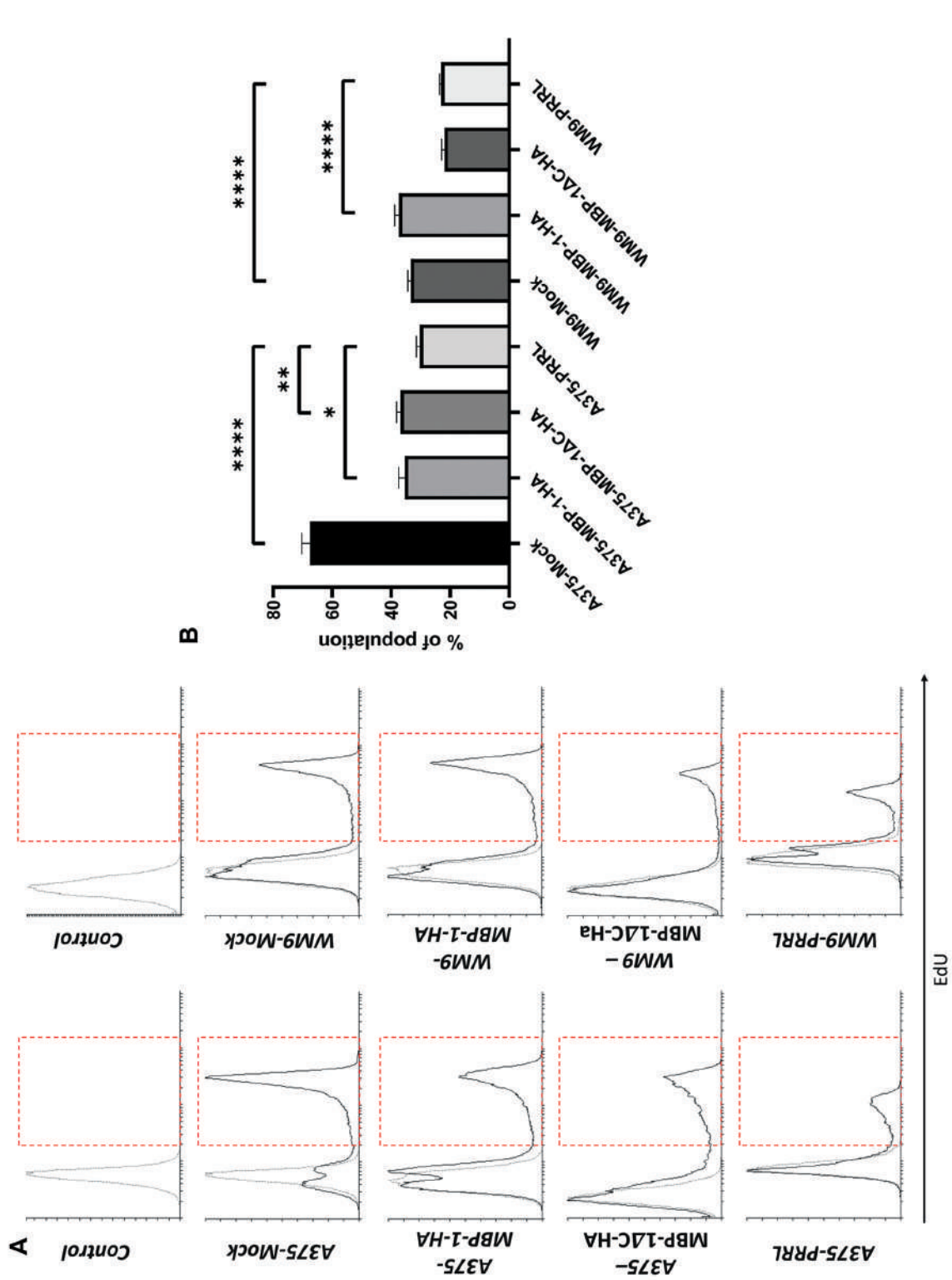


Figure 4. Assessment of cell proliferation. (A) Representative flow cytometry histograms show Edu incorporation by given cell lines (red frames). (B). The bar graph represents the mean values \pm SEM of three biological replicates. The significance level was set at $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), and $p \leq 0.0001$ (****).

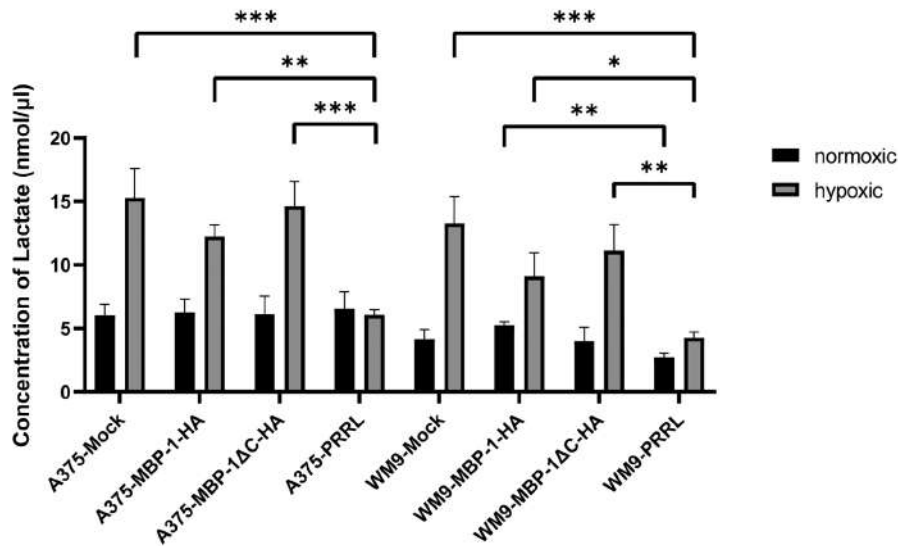


Figure 5. Levels of lactate in cell culture supernatants. Data are represented as mean±SEM of three independent experiments. The statistical significance level was set at $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), and $p \leq 0.0001$ (****).

observed increased cell proliferation after the transduction of the A375 cell line with the MBP-1ΔC-HA protein (by 21.6%), but no such effect in the case of WM9 cell line.

Hypoxia-induced increase in glycolysis rates of MBP-1-HA and MBP-1ΔC-HA-transduced A375 and WM9 melanoma cell lines. Assessment of lactate excretion by malignant cells is useful to detect shifts in glucose catabolism (34). Figure 5 shows the amounts of lactate excretion to the culture medium of mock, MBP-1-HA, or MBP-1ΔC-HA transduced A375 and WM9 cells cultivated for 24 h in normoxia or hypoxia are presented. No significant changes in glucose metabolism were noted for most cell lines, apart from an increase in lactate secretion by WM9-MBP-1-HA-transduced cells, when cells were cultured in normoxic conditions. Interestingly, however, the transduction of empty PRRL vector into A375 and WM9 cell lines strongly impaired their ability to increase lactate excretion when cultured in hypoxic conditions. A375 and WM9 cells transduced with MBP-1-HA and MBP-1ΔC-HA regained the ability to increase lactate secretion to an extent observed in the mock-treated cells. Therefore, we conclude that over-expression of MBP-1 or its C-terminal truncation mutant promotes glycolysis of A375 and WM9 cells during hypoxia.

Wound healing assay of MBP-1-HA and MBP-1ΔC-HA-transduced A375 and WM9 melanoma cell lines. To evaluate the cell migration capacity of A375 and WM9 cells transduced with MBP-1-HA or MBP-1ΔC-HA constructs, we

performed an *in vitro* wound healing assay using culture inserts. Figure 6A and B shows wound densities after 24 h of culture whereas Figure 6C shows the kinetics of wound healing measured for 36 h. Transduction of the A375 cell line had no significant impact on its migration capacity or the kinetics of wound healing (Figure 6C upper panel). In contrast, the WM9 cell line transduced with the full-length MBP-1-HA displayed a significant (51.5%) reduction of wound density after 24 h of culture, which was also reflected in the pace of wound healing (Figure 6C, lower panel). Interestingly, no significant impact of MBP-1ΔC-HA transduction on WM9 cell migration was noted underlying the importance of the C-terminal domain of MBP-1 in inhibiting WM9 cell migration.

Discussion

Lentiviral transduction of tumor cells is a widely employed method for the stable delivery of genes (35). The permissiveness of 42 human tumor cell lines to VSV-G pseudotyped lentiviral vectors, including 5 cutaneous melanoma cell lines, was tested by Pellinen R *et al.* (36). These authors found transduction efficiencies of human melanoma cell lines exceeding 80% and suggested that they were good targets for tumor cell destruction through lentiviral gene transfer. Indeed, in a few published studies [for a recent review see (37)] lentiviral over-expression of the suicide gene VP22CD/5-FC in murine uveal melanoma model (38); over-expression of RNAi targeting MAT2B gene in A375 and Mel-

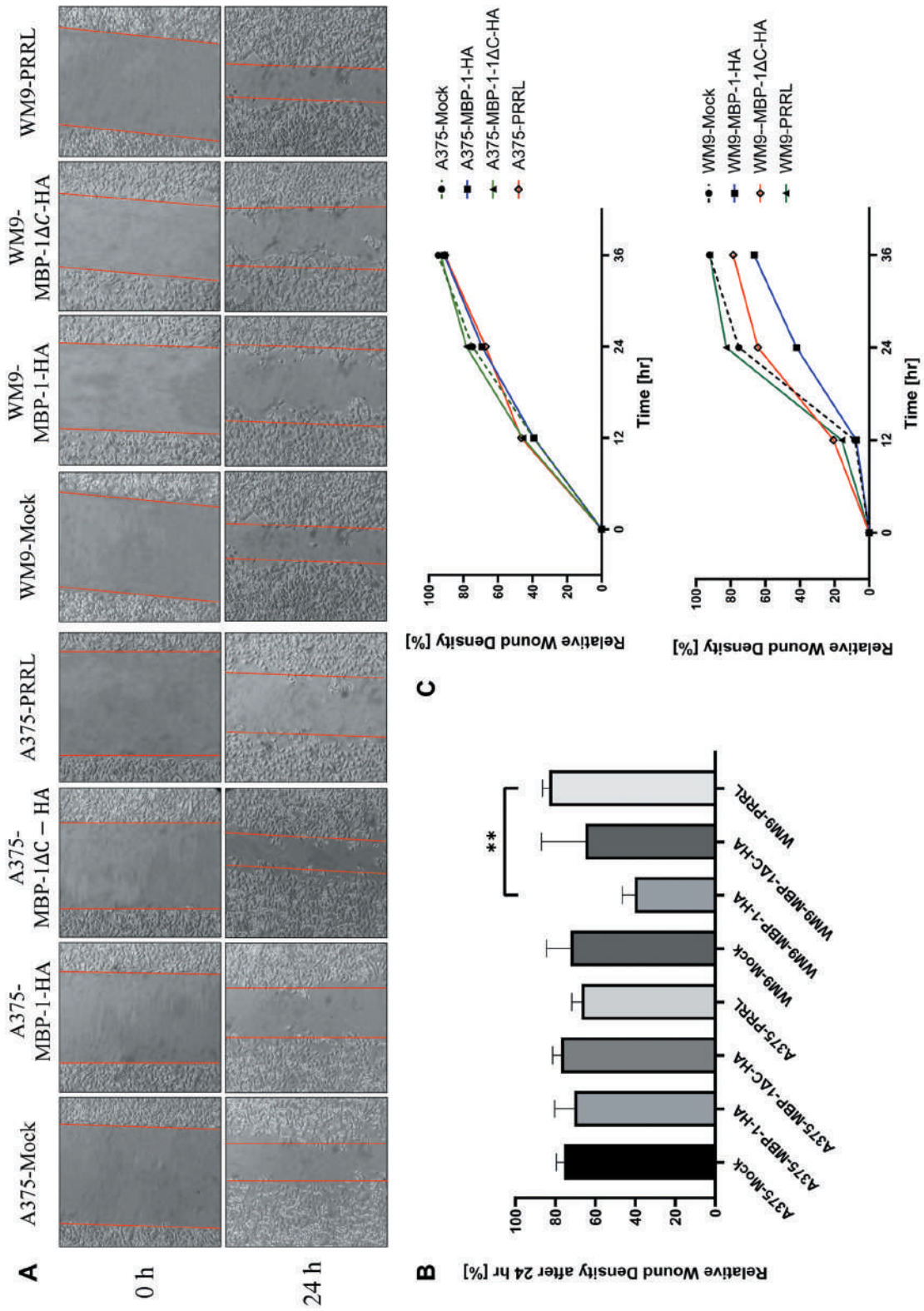


Figure 6. *In vitro* migration test of transduced cell lines MBP-1-HA, MBP-1ΔC-HA, PRRL, and non-transduced cell lines (Mock). The representative images show wound closure of cells before and after incubation for 24 h (A). Bars represent mean values (n=4) ±SEM (B). The significance level was set at p≤0.05 (*) and p≤0.01 (**). A curve exemplifying A375 and WM9 cell line migration kinetics was analyzed every 12 h for 36 h (C).

RM cell lines (39) or down-regulation of antisense non-coding mitochondrial RNA (ASncmtRNAs) by an shRNA in human A375 and murine B16F10 cell lines (40) induced apoptosis and reduced tumor growth *in vitro* and *in vivo*.

In our experimental setting, lentiviral over-expression of MBP-1-HA and MBP-1 Δ C-HA in melanoma cell lines and HEK293T cells caused their cytoplasmic sequestration. The cytoplasmic and nuclear localization of ectopically over-expressed MBP-1 was also observed in other published studies (11, 14). However, since we and others detected endogenous MBP-1 expression exclusively in the nuclear fractions (Figure 1) of non-transduced tumor cells, we consider that its cytoplasmic sequestration is an artifact attributable to a strong ectopic over-expression. Nevertheless, since no nuclear localization signal is present in MBP-1 protein, another, as yet unknown mechanism of nuclear import must be in place to allow its active transfer between the cytoplasm and nucleus. In this respect, an interesting parallel could be drawn when considering the nuclear import of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, recruited to the nucleus upon genotoxic stress. In order to reach the nucleus, it must be phosphorylated at tyrosine 41 by the c-Src kinase (41).

The lack of significant *c-MYC* down-regulation in MBP-1-HA transduced melanoma cells and even an increase of *c-MYC* expression in MBP-1 transduced HEK293T cells (Figure 3) are at odds with other published studies in which MBP-1 over-expression has always led to *c-MYC* down-regulation at transcriptional and translational levels (24). To interpret this result, we hypothesize that because of a high degree of sequence similarity between ENO1 and MBP-1, a number of cytosolic functions of ENO1 in protecting cells against oxidative stress (42) might be taken over by the cytoplasmically over-expressed MBP-1 thus uncovering its tumor-promoting functions (31). However, further experimental studies are needed to examine this hypothesis, especially by uncovering MBP-1-interacting cytoplasmic partners.

To dissect biological functions attributable to the C-terminal repressor domain of MBP-1 (43) in melanoma cell lines, we created a deletion construct lacking 51 C-terminal amino acid residues of MBP-1 (MBP-1 Δ C-HA) encompassing the LXVXL motif. Unexpectedly, the effects of MBP-1 Δ C-HA overexpression in fast-dividing A375 cells were not significantly different from those of the overexpression of the full-length MBP-1-HA construct (Figure 3, Figure 4, Figure 5, Figure 6). However, in slowly dividing WM9 cells, the effects of MBP-1 Δ C-HA differed from those of the MBP-1-HA construct in two important aspects. Specifically, the proliferation rate and migration capacity of MBP-1 Δ C-HA transduced WM9 cells were similar to those of cells transduced with PRRL empty vector control (Figure 5 and Figure 6), suggesting that the C-terminal repressor domain of MBP-1 is necessary for promoting cell proliferation and migration of MBP-1-HA transduced WM9 cells. Reportedly,

the over-expression of MBP-1 in HeLa cells did not affect the proliferation rate (15), suggesting that the tumor-suppressing activity of MBP-1 may vary in different tumor cell lines. Our data corroborate with this view by pointing to various effects of MBP-1 over-expression in melanoma cell lines differing in doubling time and primary origin. In conclusion, our data point out that in order to unfold its tumor-suppressing activity, the MBP-1 has to be expressed in a permissive cellular context enabling nuclear import and access to target promoters. When these prerequisites are not met, MBP-1 may turn into a tumor-promoting factor positively contributing to tumorigenesis.

Conflicts of Interest

The Authors declare no conflicts of interest in relation to this study.

Authors' Contributions

Conceptualization, A.M.; P.D., M.H.; methodology, M.H., A.L., J.S., and A.M.; software, M.H., and A.L.; validation, M.H., A.L., J.S., P.B., and A.M.; formal analysis, M.H., A.L., P.B. and J.S.; investigation, M.H. and A.L.; resources, M.H., A.L., J.S., and A.M.; data curation, M.H., A.L. and A.M.; writing – original draft preparation, A.M.; M.H., A.L. writing – review and editing, M.H., P.D., and A.M.; visualization, M.H., and A.L.; supervision, A.M.; project administration, P.D., and A.M.; funding acquisition, P.D. and A.M. All Authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgements

This work was financially supported by a statutory subsidy from the Polish Ministry of Science and Higher Education as a part of a grant SUBZ.A430.23.075 to P.D.

References

- 1 Ray R and Miller DM: Cloning and characterization of a human c-myc promoter-binding protein. *Mol Cell Biol* 11(4): 2154-2161, 1991. PMID: 2005901. DOI: 10.1128/mcb.11.4.2154-2161.1991
- 2 Lung J, Liu KJ, Chang JY, Leu SJ and Shih NY: MBP-1 is efficiently encoded by an alternative transcript of the ENO1 gene but post-translationally regulated by proteasome-dependent protein turnover. *FEBS J* 277(20): 4308-4321, 2010. PMID: 20849415. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07819.x
- 3 Chang GC, Liu KJ, Hsieh CL, Hu TS, Charoenfuprasert S, Liu HK, Luh KT, Hsu LH, Wu CW, Ting CC, Chen CY, Chen KC, Yang TY, Chou TY, Wang WH, Whang-Peng J and Shih NY: Identification of alpha-enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes. *Clin Cancer Res* 12(19): 5746-5754, 2006. PMID: 17020980. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0324
- 4 Dinh DTD, Kuhl S, Görtz L, Goldbrunner R and Timmer M: Expression of ENO1 is up-regulated in low-grade glioma and positively correlated with meningioma grade. *Anticancer Res* 42(5): 2319-2326, 2022. PMID: 35489746. DOI: 10.21873/anticancerres.15711

- 5 Cancemi P, Buttacavoli M, Roz E and Feo S: Expression of alpha-enolase (ENO1), Myc promoter-binding protein-1 (MBP-1) and matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) reflect the nature and aggressiveness of breast tumors. *Int J Mol Sci* 20(16): 3952, 2019. PMID: 31416219. DOI: 10.3390/ijms20163952
- 6 Zhan P, Zhao S, Yan H, Yin C, Xiao Y, Wang Y, Ni R, Chen W, Wei G and Zhang P: α -enolase promotes tumorigenesis and metastasis via regulating AMPK/mTOR pathway in colorectal cancer. *Mol Carcinog* 56(5): 1427-1437, 2017. PMID: 27996156. DOI: 10.1002/mc.22603
- 7 Zhao M, Fang W, Wang Y, Guo S, Shu L, Wang L, Chen Y, Fu Q, Liu Y, Hua S, Fan Y, Liu Y, Deng X, Luo R, Mei Z, Jiang Q and Liu Z: Enolase-1 is a therapeutic target in endometrial carcinoma. *Oncotarget* 6(17): 15610-15627, 2015. PMID: 25951350. DOI: 10.18632/oncotarget.3639
- 8 Qiao H, Wang Y, Zhu B, Jiang L, Yuan W, Zhou Y and Guan Q: Enolase1 overexpression regulates the growth of gastric cancer cells and predicts poor survival. *J Cell Biochem* 120(11): 18714-18723, 2019. PMID: 31218757. DOI: 10.1002/jcb.29179
- 9 Sedoris KC, Thomas SD and Miller DM: Hypoxia induces differential translation of enolase/MBP-1. *BMC Cancer* 10: 157, 2010. PMID: 20412594. DOI: 10.1186/1471-2407-10-157
- 10 Maranto C, Perconti G, Contino F, Rubino P, Feo S and Giallongo A: Cellular stress induces cap-independent alpha-enolase/MBP-1 translation. *FEBS Lett* 589(16): 2110-2116, 2015. PMID: 26144282. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.06.030
- 11 Feo S, Arcuri D, Piddini E, Passantino R and Giallongo A: ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Lett* 473(1): 47-52, 2000. PMID: 10802057. DOI: 10.1016/s0014-5793(00)01494-0
- 12 Subramanian A and Miller DM: Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem* 275(8): 5958-5965, 2000. PMID: 10681589. DOI: 10.1074/jbc.275.8.5958
- 13 Hsu KW, Hsieh RH, Wu CW, Chi CW, Lee YH, Kuo ML, Wu KJ and Yeh TS: MBP-1 suppresses growth and metastasis of gastric cancer cells through COX-2. *Mol Biol Cell* 20(24): 5127-5137, 2009. PMID: 19846662. DOI: 10.1091/mbc.e09-05-0386
- 14 Contino F, Mazzarella C, Ferro A, Lo Presti M, Roz E, Lupo C, Perconti G, Giallongo A and Feo S: Negative transcriptional control of ERBB2 gene by MBP-1 and HDAC1: diagnostic implications in breast cancer. *BMC Cancer* 13: 81, 2013. PMID: 23421821. DOI: 10.1186/1471-2407-13-81
- 15 Ray RB and Srinivas RV: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by a cellular transcriptional factor MBP-1. *J Cell Biochem* 64(4): 565-572, 1997. PMID: 9093905. DOI: 10.1002/(sici)1097-4644(19970315)64:4<565::aid-jcb4>3.0.co;2-p
- 16 Hsu KW, Hsieh RH, Lee YH, Chao CH, Wu KJ, Tseng MJ and Yeh TS: The activated Notch1 receptor cooperates with alpha-enolase and MBP-1 in modulating c-myc activity. *Mol Cell Biol* 28(15): 4829-4842, 2008. PMID: 18490439. DOI: 10.1128/MCB.00175-08
- 17 Liang X, Lu J, Wu Z, Guo Y, Shen S, Liang J, Dong Z and Guo W: LINC00239 interacts with C-Myc promoter-binding protein-1 (MBP-1) to promote expression of C-Myc in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res* 19(9): 1465-1475, 2021. PMID: 34016746. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-20-1025
- 18 Geng Zhe, Yao Haiyan and Han Yewu: Effects of RNAi of MBP-1 gene on proliferation of gastric cancer SGC-7901 cell line. *Int J Lab Med* 12: 3300-3303, 2014.
- 19 Kanda T, Raychoudhuri A, Steele R, Sagartz JE, West C and Ray RB: MBP-1 inhibits breast cancer growth and metastasis in immunocompetent mice. *Cancer Res* 69(24): 9354-9359, 2009. PMID: 19934312. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2974
- 20 Ghosh AK, Steele R, Ryerse J and Ray RB: Tumor-suppressive effects of MBP-1 in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 66(24): 11907-11912, 2006. PMID: 17178888. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2754
- 21 Ochkur SI, Doyle AD, Jacobsen EA, LeSuer WE, Li W, Protheroe CA, Zellner KR, Colbert D, Shen HH, Irvin CG, Lee JJ and Lee NA: Frontline Science: Eosinophil-deficient MBP-1 and EPX double-knockout mice link pulmonary remodeling and airway dysfunction with type 2 inflammation. *J Leukoc Biol* 102(3): 589-599, 2017. PMID: 28515227. DOI: 10.1189/jlb.3HI1116-488RR
- 22 Steele R, Mott JL and Ray RB: MBP-1 upregulates miR-29b that represses Mcl-1, collagens, and matrix-metalloproteinase-2 in prostate cancer cells. *Genes Cancer* 1(4): 381-387, 2010. PMID: 20657750. DOI: 10.1177/1947601910371978
- 23 Ghosh AK, Steele R and Ray RB: c-myc Promoter-binding protein 1 (MBP-1) regulates prostate cancer cell growth by inhibiting MAPK pathway. *J Biol Chem* 280(14): 14325-14330, 2005. PMID: 15805119. DOI: 10.1074/jbc.M413313200
- 24 Liu Z, Zhang A, Zheng L, Johnathan AF, Zhang J and Zhang G: The biological significance and regulatory mechanism of c-Myc binding protein 1 (MBP-1). *Int J Mol Sci* 19(12): 3868, 2018. PMID: 30518090. DOI: 10.3390/ijms19123868
- 25 Trojanowicz B, Winkler A, Hammje K, Chen Z, Sekulla C, Glanz D, Schmutzler C, Mentrup B, Hombach-Klonisch S, Klonisch T, Finke R, Köhrle J, Dralle H and Hoang-Vu C: Retinoic acid-mediated down-regulation of ENO1/MBP-1 gene products caused decreased invasiveness of the follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Mol Endocrinol* 42(3): 249-260, 2009. PMID: 19060179. DOI: 10.1677/JME-08-0118
- 26 Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H and Parks WP: *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51(5): 1417-1423, 1973. PMID: 4357758. DOI: 10.1093/jnci/51.5.1417
- 27 Westermarck B, Johnsson A, Paulsson Y, Betsholtz C, Heldin CH, Herlyn M, Rodeck U and Koprowski H: Human melanoma cell lines of primary and metastatic origin express the genes encoding the chains of platelet-derived growth factor (PDGF) and produce a PDGF-like growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(19): 7197-7200, 1986. PMID: 3020539. DOI: 10.1073/pnas.83.19.7197
- 28 Hippner M, Majkowski M, Biecek P, Szkudlarek T, Simiczjew A, Pieniazek M, Nowak D, Miazek A and Donizy P: Alpha-enolase (ENO1) correlates with invasiveness of cutaneous melanoma-an *in vitro* and a clinical study. *Diagnostics (Basel)* 12(2): 254, 2022. PMID: 35204345. DOI: 10.3390/diagnostics12020254
- 29 Suchanski J, Tejchman A, Zacharski M, Piotrowska A, Grzegorzolka J, Chodaczek G, Nowinska K, Rys J, Dziegiel P, Kieda C and Ugorski M: Podoplanin increases the migration of human fibroblasts and affects the endothelial cell network formation: A possible role for cancer-associated fibroblasts in breast cancer progression. *PLoS One* 12(9): e0184970, 2017. PMID: 28938000. DOI: 10.1371/journal.pone.0184970
- 30 Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D and Naldini L: A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72(11): 8463-8471, 1998. PMID: 9765382. DOI: 10.1128/JVI.72.11.8463-8471.1998

- 31 Didiysova M, Schaefer L and Wygrecka M: When place matters: Shuttling of enolase-1 across cellular compartments. *Front Cell Dev Biol* 7: 61, 2019. PMID: 31106201. DOI: 10.3389/fcell.2019.00061
- 32 Ray RB and Steele R: Separate domains of MBP-1 involved in c-myc promoter binding and growth suppressive activity. *Gene* 186(2): 175-180, 1997. PMID: 9074493. DOI: 10.1016/s0378-1119(96)00693-2
- 33 Duffy MJ, O'Grady S, Tang M and Crown J: MYC as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 94: 102154, 2021. PMID: 33524794. DOI: 10.1016/j.ctrv.2021.102154
- 34 TeSlaa T and Teitell MA: Techniques to monitor glycolysis. *Methods Enzymol* 542: 91-114, 2014. PMID: 24862262. DOI: 10.1016/B978-0-12-416618-9.00005-4
- 35 Lundstrom K: New frontiers in oncolytic viruses: optimizing and selecting for virus strains with improved efficacy. *Biologics* 12: 43-60, 2018. PMID: 29445265. DOI: 10.2147/BTT.S140114
- 36 Pellinen R, Hakkarainen T, Wahlfors T, Tulimäki K, Ketola A, Tenhunen A, Salonen T and Wahlfors J: Cancer cells as targets for lentivirus-mediated gene transfer and gene therapy. *Int J Oncol* 25(6): 1753-1762, 2004. PMID: 15547714.
- 37 Hromic-Jahjefendic A and Lundstrom K: Viral vector-based melanoma gene therapy. *Biomedicines* 8(3): 60, 2020. PMID: 32187995. DOI: 10.3390/biomedicines8030060
- 38 Liu S, Song W, Liu F, Zhang J and Zhu S: Antitumor efficacy of VP22-CD/5-FC suicide gene system mediated by lentivirus in a murine uveal melanoma model. *Exp Eye Res* 172: 144-151, 2018. PMID: 29660328. DOI: 10.1016/j.exer.2018.04.009
- 39 Lei Y, Zhang B, Zhang Y, Zhao Y, Sun J, Zhang X and Yang S: Lentivirus-mediated downregulation of MAT2B inhibits cell proliferation and induces apoptosis in melanoma. *Int J Oncol* 49(3): 981-990, 2016. PMID: 27573889. DOI: 10.3892/ijo.2016.3603
- 40 Varas-Godoy M, Lladser A, Farfan N, Villota C, Villegas J, Tapia JC, Burzio LO, Burzio VA and Valenzuela PDT: In vivo knockdown of antisense non-coding mitochondrial RNAs by a lentiviral-encoded shRNA inhibits melanoma tumor growth and lung colonization. *Pigment Cell Melanoma Res* 31(1): 64-72, 2018. PMID: 28707763. DOI: 10.1111/pcmr.12615
- 41 Ci S, Xia W, Liang W, Qin L, Zhang Y, Dianov GL, Wang M, Zhao X, Wu C, Alagamuthu KK, Hu Z, He L, Pan F and Guo Z: Src-mediated phosphorylation of GAPDH regulates its nuclear localization and cellular response to DNA damage. *FASEB J* 34(8): 10443-10461, 2020. PMID: 32539222. DOI: 10.1096/fj.201902904RR
- 42 Luo Q, Jiang L, Chen G, Feng Y, Lv Q, Zhang C, Qu S, Zhu H, Zhou B and Xiao X: Constitutive heat shock protein 70 interacts with α -enolase and protects cardiomyocytes against oxidative stress. *Free Radic Res* 45(11-12): 1355-1365, 2011. PMID: 21958194. DOI: 10.3109/10715762.2011.627330
- 43 Ghosh AK, Steele R and Ray RB: Functional domains of c-myc promoter binding protein 1 involved in transcriptional repression and cell growth regulation. *Mol Cell Biol* 19(4): 2880-2886, 1999. PMID: 10082554. DOI: 10.1128/MCB.19.4.2880

Received March 31, 2023

Revised April 14, 2023

Accepted April 18, 2023

9. Podsumowanie

Opracowanie efektywnych metod diagnostycznych i terapeutycznych stanowi obecnie wyzwanie dla współczesnej medycyny dążącej do skutecznej terapii i poprawy rokowania pacjentów z czerniakiem. W ostatnich latach zanotowano wzrost liczby zachorowań na czerniaka, co skłania naukowców do poszukiwania innowacyjnych metod oraz potencjalnych celów terapeutycznych. W komórkach różnych typów nowotworów o zróżnicowanej histogenezie zaobserwowano zmiany metaboliczne towarzyszące podwyższonej ekspresji enzymów podstawowego metabolizmu komórkowego, takich jak ENO1 oraz jej izoformy, w tym MBP-1 (białko wiążące promotor *c-MYC*).

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej przeprowadzone badania miały na celu analizę wpływu alfa-enolazy oraz jej izoformy MBP-1 na tempo proliferacji oraz metabolizm glukozy w wybranych liniach komórkowych czerniaka. W badaniach *in vitro* zaobserwowano zwiększoną ekspresję białka ENO1 oraz wzrost jej aktywność enzymatycznej w czterech liniach komórkowych czerniaka (A375, WM1341D, WM9 i Hs204T). W przeprowadzonych badaniach z oznaczeniem metodą immunohistochemiczną ekspresji białka ENO1 u 112 pacjentów z czerniakiem skóry, uwidoczniono zwiększoną ekspresję ENO1 w komórkach nowotworowych. Analiza przeżycia wykazała, że nadekspresja ENO1 była związana z krótszym okresem przeżycia wolnym od choroby. W warunkach hipoksji w komórkach nowotworowych zaobserwowano nadekspresję wielu enzymów glikolitycznych, w tym ENO1 [68]. Należy zwrócić uwagę, że ENO1 jest kluczowym enzymem podtrzymującym efekt Warburga, co przyczynia się do zwiększenia proliferacji komórek nowotworowych oraz powstawania przerzutów [49,69]. Przeprowadzone badania potwierdzają dotychczasowe ustalenia, które wskazywały na zwiększoną aktywność ENO1 w kilku rodzajach nowotworów litych [49]. Co ciekawe, w liniach komórkowych pochodzących z przerzutów do węzłów chłonnych (Hs294T, WM9) zaobserwowano znacznie wyższy poziom aktywności ENO1 w niedotlenieniu niż w warunkach aerobowych. Te obserwacje podkreślają istotną rolę ENO1 w adaptacji komórek nowotworowych do warunków stresu komórkowego.

Metoda transdukcji lentiwirusowej jest powszechnie stosowana do stabilnego dostarczania produktów genowych do komórek nowotworowych [70]. W drugim badaniu stanowiącym rozprawę doktorską przeprowadzono analizę wpływu transdukcji lentiwirusowej na proliferację i metabolizm glukozy w liniach komórkowych A375 i WM9. Po wprowadzeniu

pustego wektora lentiwirusowego zaobserwowano spadek szybkości proliferacji komórek A375-PRRL i WM9-PRRL w porównaniu do komórek nietraktowanych. Udowodniono, że transdukcja lentiwirusowa ma istotny wpływ na patofizjologię komórek nowotworowych. Co ważne, dzięki zastosowaniu barwienia immunofluorescencyjnego wykazano cytoplazmatyczną lokalizację białek MBP-1 i MBP-1 Δ C, zarówno w liniach komórkowych czerniaków, jak i nienowotworowej linii HEK293T. Brak immunoreaktywności w lokalizacji jądrowej białka MBP-1 może sugerować istnienie nieznanego dotychczas mechanizmu transportu jądrowo-cytoplazmatycznego białka MBP-1. W wygenerowanych liniach komórkowych z nadekspresją MBP-1 zaobserwowano wzrost proliferacji w porównaniu z liniami kontrolnymi transdukowanymi pustym wektorem. Nadekspresja MBP-1 i MBP-1 Δ C wykazywała zbliżone wyniki w szybko dzielących się komórkach linii A375, pod względem szybkości migracji komórek i proliferacji. Natomiast w wolno dzielącej się linii WM9 zaobserwowano spadek proliferacji linii MBP-1 Δ C w stosunku do linii MBP-1, co sugeruje rolę domeny C-końcowej w promowaniu proliferacji i migracji komórek

Przeprowadzone badania w niniejszej rozprawie doktorskiej pogłębiają wiedzę o biologii ENO1 i MBP-1 jako potencjalnych celów prognostycznych i terapeutycznych w leczeniu czerniaka.

10. Wnioski

W niniejszej pracy można wyróżnić następujące wnioski:

- Nadekspresja alfa-enolazy w liniach komórkowych czerniaka jest skorelowana z podwyższonymi parametrami inwazyjności badanych komórek.
- Ekspresja ENO1 w cytoplazmie komórek czerniaka była skorelowana z niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi, takimi jak grubość nacieku wg Breslowa i Clarka, aktywność mitotyczna, obecność owrzodzenia.
- Wysoki poziom ekspresji ENO1 był ściśle związany z gorszym rokowaniem u pacjentów z czerniakiem skóry w kontekście skróconego czasu przeżycia specyficznego dla choroby nowotworowej oraz czasu wolnego od nawrotu.
- Transdukcja lentiwirusowa linii komórkowych czerniaka skóry A375 i WM9 wykazuje silne działanie przeciwnowotworowe.
- Nadekspresja białka MBP-1 i jego mutantu pozbawionego domeny C-końcowej (MBP-1 Δ C) w cytoplazmie linii komórkowych czerniaka wykazuje aktywność promującą rozwój nowotworu.
- Cytoplazmatyczna ekspresja białka MBP-1, lecz nie jego mutantu delecyjnego (MBP-1 Δ C) spowodowała spowolnienie tempa migracji komórek linii WM9 w teście zarastania rysy, co wskazuje na jego aktywność przeciwnowotworową niezależną od lokalizacji jądrowej.
- Aktywność biologiczna białka MBP-1 jest silnie skorelowana z jego lokalizacją wewnątrzkomórkową.
- Niefizjologiczna nadekspresja cytoplazmatyczna MBP-1 wykazała funkcję promującą proliferację komórek nowotworowych i utrzymanie efektu Warburga.
- Lokalizacja cytoplazmatyczna MBP-1 wykazała również potencjał przeciwnowotworowy, wyrażony istotnym spowolnieniem migracji komórek WM9.

11. Bibliografia

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **2018**, *68*, 394–424, doi:10.3322/caac.21492.
2. Rastogi, R.P.; Richa; Kumar, A.; Tyagi, M.B.; Sinha, R.P. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J Nucleic Acids* **2010**, *2010*, 1–32, doi:10.4061/2010/592980.
3. Premi, S.; Wallisch, S.; Mano, C.M.; Weiner, A.B.; Bacchiocchi, A.; Wakamatsu, K.; Bechara, E.J.H.; Halaban, R.; Douki, T.; Brash, D.E. Chemiexcitation of Melanin Derivatives Induces DNA Photoproducts Long after UV Exposure. *Science (1979)* **2015**, *347*, 842–847, doi:10.1126/science.1256022.
4. Murray, H.C.; Maltby, V.E.; Smith, D.W.; Bowden, N.A. Nucleotide Excision Repair Deficiency in Melanoma in Response to UVA. *Exp Hematol Oncol* **2015**, *5*, 6, doi:10.1186/s40164-016-0035-4.
5. Marionnet, C.; Pierrard, C.; Golebiewski, C.; Bernerd, F. Diversity of Biological Effects Induced by Longwave UVA Rays (UVA1) in Reconstructed Skin. *PLoS One* **2014**, *9*, e105263, doi:10.1371/journal.pone.0105263.
6. Garland, C.F.; Garland, F.C.; Gorham, E.D. Epidemiologic Evidence for Different Roles of Ultraviolet A and B Radiation in Melanoma Mortality Rates. *Ann Epidemiol* **2003**, *13*, 395–404, doi:10.1016/S1047-2797(02)00461-1.
7. Rastrelli, M.; Tropea, S.; Rossi, C.R.; Alaibac, M. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In Vivo* **2014**, *28*, 1005–1011.
8. Strashilov, S.; Yordanov, A. Aetiology and Pathogenesis of Cutaneous Melanoma: Current Concepts and Advances. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 6395, doi:10.3390/ijms22126395.
9. Conforti, C.; Zalaudek, I. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma: A Review. *Dermatol Pract Concept* **2021**, *2021*161S, doi:10.5826/dpc.11S1a161S.
10. Sadrolashrafi, K.; Cotter, D.G. Not Your Mother's Melanoma: Causes and Effects of Early Melanoma Diagnosis. *Dermatopathology (Basel)* **2022**, *9*, 368–378, doi:10.3390/dermatopathology9040043.
11. Law, M.H.; Bishop, D.T.; Lee, J.E.; Brossard, M.; Martin, N.G.; Moses, E.K.; Song, F.; Barrett, J.H.; Kumar, R.; Easton, D.F.; et al. Genome-Wide Meta-Analysis Identifies Five New Susceptibility Loci for Cutaneous Malignant Melanoma. *Nat Genet* **2015**, *47*, 987–995, doi:10.1038/ng.3373.
12. Sacchetto, L.; Zanetti, R.; Comber, H.; Bouchardy, C.; Brewster, D.H.; Broganelli, P.; Chirlaque, M.D.; Coza, D.; Galceran, J.; Gavin, A.; et al. Trends in Incidence of Thick, Thin and in Situ Melanoma in Europe. *Eur J Cancer* **2018**, *92*, 108–118, doi:10.1016/j.ejca.2017.12.024.
13. *Melanoma of Skin Source: Globocan 2020; 2021*
14. Minini, R.; Rohrmann, S.; Braun, R.; Korol, D.; Dehler, S. Incidence Trends and Clinical–Pathological Characteristics of Invasive Cutaneous Melanoma from 1980 to 2010 in the Canton of Zurich, Switzerland. *Melanoma Res* **2017**, *27*, 145–151, doi:10.1097/CMR.0000000000000312.
15. Didkowska J.; Wojciechowska U.; Olasek P.; Caetano dos Santos F.; Michalek I. *NOWOTWORY ZŁOŚLIWE W POLSCE W 2019 ROKU; 2021*

16. Didkowska J.; Wojciechowska U.; Tarkowski W.; Zatoński W. *NOWOTWORY ZŁOŚLIWE W POLSCE W 2000 ROKU*; **2003**;
17. Apalla, Z.; Lallas, A.; Sotiriou, E.; Lazaridou, E.; Ioannides, D. Epidemiological Trends in Skin Cancer. *Dermatol Pract Concept* **2017**, *7*, doi:10.5826/dpc.0702a01.
18. Erdmann, F.; Lortet-Tieulent, J.; Schüz, J.; Zeeb, H.; Greinert, R.; Breitbart, E.W.; Bray, F. International Trends in the Incidence of Malignant Melanoma 1953-2008-Are Recent Generations at Higher or Lower Risk? *Int J Cancer* **2013**, *132*, 385–400, doi:10.1002/ijc.27616.
19. Jenkins, R.W.; Fisher, D.E. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. *Journal of Investigative Dermatology* **2021**, *141*, 23–31, doi:10.1016/j.jid.2020.03.943.
20. Robert, C.; Grob, J.J.; Stroyakovskiy, D.; Karaszewska, B.; Hauschild, A.; Levchenko, E.; Chiarion Sileni, V.; Schachter, J.; Garbe, C.; Bondarenko, I.; et al. Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* **2019**, *381*, 626–636, doi:10.1056/NEJMoa1904059.
21. Ralli, M.; Botticelli, A.; Visconti, I.C.; Angeletti, D.; Fiore, M.; Marchetti, P.; Lambiase, A.; de Vincentiis, M.; Greco, A. Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. *J Immunol Res* **2020**, *2020*, 1–12, doi:10.1155/2020/9235638.
22. Chapman, P.B.; Hauschild, A.; Robert, C.; Haanen, J.B.; Ascierto, P.; Larkin, J.; Dummer, R.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *New England Journal of Medicine* **2011**, *364*, 2507–2516, doi:10.1056/NEJMoa1103782.
23. Davis, L.E.; Shalin, S.C.; Tackett, A.J. Current State of Melanoma Diagnosis and Treatment. *Cancer Biol Ther* **2019**, *20*, 1366–1379, doi:10.1080/15384047.2019.1640032.
24. Shoushtari, A.N.; Munhoz, R.R.; Kuk, D.; Ott, P.A.; Johnson, D.B.; Tsai, K.K.; Rapisuwon, S.; Eroglu, Z.; Sullivan, R.J.; Luke, J.J.; et al. The Efficacy of Anti-PD-1 Agents in Acral and Mucosal Melanoma. *Cancer* **2016**, *122*, 3354–3362, doi:10.1002/cncr.30259.
25. Wang, D.; Gao, G. State-of-the-Art Human Gene Therapy: Part I. Gene Delivery Technologies. *Discov Med* **2014**, *18*, 67–77.
26. Gajos-Michniewicz, A.; Czyz, M. Role of MiRNAs in Melanoma Metastasis. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 326, doi:10.3390/cancers11030326.
27. Qiao, G.; Wu, A.; Chen, X.; Tian, Y.; Lin, X. Enolase 1, a Moonlighting Protein, as a Potential Target for Cancer Treatment. *Int J Biol Sci* **2021**, *17*, 3981–3992, doi:10.7150/ijbs.63556.
28. Liu, Z.; Zhang, A.; Zheng, L.; Johnathan, A.-F.; Zhang, J.; Zhang, G. The Biological Significance and Regulatory Mechanism of C-Myc Binding Protein 1 (MBP-1). *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, 3868, doi:10.3390/ijms19123868.
29. Didiasova, M.; Schaefer, L.; Wygrecka, M. When Place Matters: Shuttling of Enolase-1 Across Cellular Compartments. *Front Cell Dev Biol* **2019**, *7*, doi:10.3389/fcell.2019.00061.
30. Qin, J.; Chai, G.; Brewer, J.M.; Lovelace, L.L.; Lebioda, L. Structures of Asymmetric Complexes of Human Neuron Specific Enolase with Resolved Substrate and Product and an Analogous Complex with Two Inhibitors Indicate Subunit Interaction and Inhibitor Cooperativity. *J Inorg Biochem* **2012**, *111*, 187–194, doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.02.011.
31. Díaz-Ramos, À.; Roig-Borrellas, A.; García-Melero, A.; López-Alemany, R. α -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations. *J Biomed Biotechnol* **2012**, *2012*, 1–12, doi:10.1155/2012/156795.
32. Perconti, G.; Pratesi, F.; Angelotti, F.; Manca, L.; Puxeddu, I.; Rubino, P.; Maranto, C.; Giallongo, A.; Migliorini, P. Fingerprinting of Anti-Alpha Enolase Antibodies in Systemic Sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* **2020**, *38 Suppl 125*, 115–119.

33. Li, M.; Li, J.; Wang, J.; Li, Y.; Yang, P. Serum Level of Anti- α -Enolase Antibody in Untreated Systemic Lupus Erythematosus Patients Correlates with 24-Hour Urine Protein and D-Dimer. *Lupus* **2018**, *27*, 139–142, doi:10.1177/0961203317721752.
34. Cho, H.; Um, J.; Lee, J.-H.; Kim, W.-H.; Kang, W.S.; Kim, S.H.; Ha, H.-H.; Kim, Y.-C.; Ahn, Y.-K.; Jung, D.-W.; et al. ENOblock, a Unique Small Molecule Inhibitor of the Non-Glycolytic Functions of Enolase, Alleviates the Symptoms of Type 2 Diabetes. *Sci Rep* **2017**, *7*, 44186, doi:10.1038/srep44186.
35. Altenberg, B.; Greulich, K.O. Genes of Glycolysis Are Ubiquitously Overexpressed in 24 Cancer Classes. *Genomics* **2004**, *84*, 1014–1020, doi:10.1016/j.ygeno.2004.08.010.
36. Butterfield, D.A.; Lange, M.L.B. Multifunctional Roles of Enolase in Alzheimer's Disease Brain: Beyond Altered Glucose Metabolism. *J Neurochem* **2009**, *111*, 915–933, doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06397.x.
37. Capello, M.; Ferri-Borgogno, S.; Riganti, C.; Chattaragada, M.S.; Principe, M.; Roux, C.; Zhou, W.; Petricoin, E.F.; Cappello, P.; Novelli, F. Targeting the Warburg Effect in Cancer Cells through ENO1 Knockdown Rescues Oxidative Phosphorylation and Induces Growth Arrest. *Oncotarget* **2016**, *7*, 5598–5612, doi:10.18632/oncotarget.6798.
38. Pancholi, V. Multifunctional α -Enolase: Its Role in Diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2001**, *58*, 902–920, doi:10.1007/PL00000910.
39. Capello, M.; Ferri-Borgogno, S.; Cappello, P.; Novelli, F. α -Enolase: A Promising Therapeutic and Diagnostic Tumor Target. *FEBS Journal* **2011**, *278*, 1064–1074, doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08025.x.
40. Semenza, G.L.; Roth, P.H.; Fang, H.M.; Wang, G.L. Transcriptional Regulation of Genes Encoding Glycolytic Enzymes by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 23757–23763, doi:10.1016/S0021-9258(17)31580-6.
41. Peng, C.; Hou, S.; Deng, C.; Zhang, Y. Function of DHX33 in Promoting Warburg Effect via Regulation of Glycolytic Genes. *J Cell Physiol* **2021**, *236*, 981–996, doi:10.1002/jcp.29909.
42. Zhan, P.; Zhao, S.; Yan, H.; Yin, C.; Xiao, Y.; Wang, Y.; Ni, R.; Chen, W.; Wei, G.; Zhang, P. α -Enolase Promotes Tumorigenesis and Metastasis via Regulating AMPK/MTOR Pathway in Colorectal Cancer. *Mol Carcinog* **2017**, *56*, 1427–1437, doi:10.1002/mc.22603.
43. Zhang, L.; Wang, H.; Dong, X. Diagnostic Value of α -Enolase Expression and Serum α -Enolase Autoantibody Levels in Lung Cancer. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* **2018**, *44*, 18–23, doi:10.1590/s1806-37562016000000241.
44. Ji, M.; Wang, Z.; Chen, J.; Gu, L.; Chen, M.; Ding, Y.; Liu, T. Up-Regulated ENO1 Promotes the Bladder Cancer Cell Growth and Proliferation via Regulating β -Catenin. *Biosci Rep* **2019**, *39*, doi:10.1042/BSR20190503.
45. Song, Y.; Luo, Q.; Long, H.; Hu, Z.; Que, T.; Zhang, X.; 'an, Li, Z.; Wang, G.; Yi, L.; Liu, Z.; et al. Alpha-Enolase as a Potential Cancer Prognostic Marker Promotes Cell Growth, Migration, and Invasion in Glioma. *Molecular-Cancer* **2014**, *13*, 65–77, doi:10.1186/1476-4598-13-65.
46. Sun, L.; Lu, T.; Tian, K.; Zhou, D.; Yuan, J.; Wang, X.; Zhu, Z.; Wan, D.; Yao, Y.; Zhu, X.; et al. Alpha-Enolase Promotes Gastric Cancer Cell Proliferation and Metastasis via Regulating AKT Signaling Pathway. *Eur J Pharmacol* **2019**, *845*, 8–15, doi:10.1016/j.ejphar.2018.12.035.
47. Principe, M.; Borgoni, S.; Cascione, M.; Chattaragada, M.S.; Ferri-Borgogno, S.; Capello, M.; Bulfamante, S.; Chapelle, J.; Di Modugno, F.; Defilippi, P.; et al. Alpha-Enolase (ENO1) Controls Alpha v/Beta 3 Integrin Expression and Regulates Pancreatic Cancer Adhesion, Invasion, and Metastasis. *J Hematol Oncol* **2017**, *10*, 16, doi:10.1186/s13045-016-0385-8.
48. Tsai, S.-T.; Chien, I.-H.; Shen, W.-H.; Kuo, Y.-Z.; Jin, Y.-T.; Wong, T.-Y.; Hsiao, J.-R.; Wang, H.-P.; Shih, N.-Y.; Wu, L.-W. ENO1, a Potential Prognostic Head and Neck Cancer Marker,

- Promotes Transformation Partly via Chemokine CCL20 Induction. *Eur J Cancer* **2010**, *46*, 1712–1723, doi:10.1016/j.ejca.2010.03.018.
49. Schofield, L.; Lincz, L.F.; Skelding, K.A. Unlikely Role of Glycolytic Enzyme α -Enolase in Cancer Metastasis and Its Potential as a Prognostic Biomarker. *J Cancer Metastasis Treat* **2020**, *2020*, doi:10.20517/2394-4722.2019.43.
 50. Cappello, P.; Principe, M.; Bulfamante, S.; Novelli, F. Alpha-Enolase (ENO1), a Potential Target in Novel Immunotherapies. *Front Biosci (Landmark Ed)* **2017**, *22*, 944–959, doi:10.2741/4526.
 51. Ray, R.; Miller, D.M. Cloning and Characterization of a Human C- Myc Promoter-Binding Protein. *Mol Cell Biol* **1991**, *11*, 2154–2161, doi:10.1128/mcb.11.4.2154-2161.1991.
 52. Lung, J.; Liu, K.-J.; Chang, J.-Y.; Leu, S.-J.; Shih, N.-Y. MBP-1 Is Efficiently Encoded by an Alternative Transcript of the ENO1 Gene but Post-Translationally Regulated by Proteasome-Dependent Protein Turnover. *FEBS J* **2010**, *277*, 4308–4321, doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07819.x.
 53. Chang, G.-C.; Liu, K.-J.; Hsieh, C.-L.; Hu, T.-S.; Charoenfuprasert, S.; Liu, H.-K.; Luh, K.-T.; Hsu, L.-H.; Wu, C.-W.; Ting, C.-C.; et al. Identification of Alpha-Enolase as an Autoantigen in Lung Cancer: Its Overexpression Is Associated with Clinical Outcomes. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 5746–5754, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0324.
 54. Maranto, C.; Perconti, G.; Contino, F.; Rubino, P.; Feo, S.; Giallongo, A. Cellular Stress Induces Cap-Independent Alpha-Enolase/MBP-1 Translation. *FEBS Lett* **2015**, *589*, 2110–2116, doi:10.1016/j.febslet.2015.06.030.
 55. Sedoris, K.C.; Thomas, S.D.; Miller, D.M. Hypoxia Induces Differential Translation of Enolase/MBP-1. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 157, doi:10.1186/1471-2407-10-157.
 56. Dang, C.V. MYC on the Path to Cancer. *Cell* **2012**, *149*, 22–35, doi:10.1016/j.cell.2012.03.003.
 57. Hsu, K.-W.; Hsieh, R.-H.; Wu, C.-W.; Chi, C.-W.; Lee, Y.-H.W.; Kuo, M.-L.; Wu, K.-J.; Yeh, T.-S. MBP-1 Suppresses Growth and Metastasis of Gastric Cancer Cells through COX-2. *Mol Biol Cell* **2009**, *20*, 5127–5137, doi:10.1091/mbc.e09-05-0386.
 58. Contino, F.; Mazzarella, C.; Ferro, A.; Lo Presti, M.; Roz, E.; Lupo, C.; Perconti, G.; Giallongo, A.; Feo, S. Negative Transcriptional Control of ERBB2 Gene by MBP-1 and HDAC1: Diagnostic Implications in Breast Cancer. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 81, doi:10.1186/1471-2407-13-81.
 59. Liang, X.; Lu, J.; Wu, Z.; Guo, Y.; Shen, S.; Liang, J.; Dong, Z.; Guo, W. *LINC00239* Interacts with C-Myc Promoter-Binding Protein-1 (MBP-1) to Promote Expression of C-Myc in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer Res* **2021**, *19*, 1465–1475, doi:10.1158/1541-7786.MCR-20-1025.
 60. Hsu, K.-W.; Hsieh, R.-H.; Lee, Y.-H.W.; Chao, C.-H.; Wu, K.-J.; Tseng, M.-J.; Yeh, T.-S. The Activated Notch1 Receptor Cooperates with Alpha-Enolase and MBP-1 in Modulating c-Myc Activity. *Mol Cell Biol* **2008**, *28*, 4829–4842, doi:10.1128/MCB.00175-08.
 61. Geng Zhe; Yao Haiyan; Han Yuewu Effects of RNAi of MBP-1 Gene on Proliferation of Gastric Cancer SGC-7901 Cell Line. *Int J Lab Med* **2014**, *12*, 3300–3303.
 62. Cancemi, P.; Buttacavoli, M.; Roz, E.; Feo, S. Expression of Alpha-Enolase (ENO1), Myc Promoter-Binding Protein-1 (MBP-1) and Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) Reflect the Nature and Aggressiveness of Breast Tumors. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 3952, doi:10.3390/ijms20163952.
 63. Kanda, T.; Raychoudhuri, A.; Steele, R.; Sagartz, J.E.; West, C.; Ray, R.B. MBP-1 Inhibits Breast Cancer Growth and Metastasis in Immunocompetent Mice. *Cancer Res* **2009**, *69*, 9354–9359, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2974.

64. Ghosh, A.K.; Steele, R.; Ryerse, J.; Ray, R.B. Tumor-Suppressive Effects of MBP-1 in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Res* **2006**, *66*, 11907–11912, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2754.
65. Ochkur, S.I.; Doyle, A.D.; Jacobsen, E.A.; LeSuer, W.E.; Li, W.; Protheroe, C.A.; Zellner, K.R.; Colbert, D.; Shen, H.H.; Irvin, C.G.; et al. Frontline Science: Eosinophil-Deficient MBP-1 and EPX Double-Knockout Mice Link Pulmonary Remodeling and Airway Dysfunction with Type 2 Inflammation. *J Leukoc Biol* **2017**, *102*, 589–599, doi:10.1189/jlb.3HI1116-488RR.
66. Steele, R.; Mott, J.L.; Ray, R.B. MBP-1 Upregulates MiR-29b That Represses Mcl-1, Collagens, and Matrix-Metalloproteinase-2 in Prostate Cancer Cells. *Genes Cancer* **2010**, *1*, 381–387, doi:10.1177/1947601910371978.
67. Ghosh, A.K.; Steele, R.; Ray, R.B. C-Myc Promoter-Binding Protein 1 (MBP-1) Regulates Prostate Cancer Cell Growth by Inhibiting MAPK Pathway. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 14325–14330, doi:10.1074/jbc.M413313200.
68. Park, H.S.; Kim, J.H.; Sun, B.K.; Song, S.U.; Suh, W.; Sung, J.-H. Hypoxia Induces Glucose Uptake and Metabolism of Adipose-Derived Stem Cells. *Mol Med Rep* **2016**, *14*, 4706–4714, doi:10.3892/mmr.2016.5796.
69. Zhang, T.; Suo, C.; Zheng, C.; Zhang, H. Hypoxia and Metabolism in Metastasis. In; 2019; pp. 87–95.
70. Lundstrom, K. New Frontiers in Oncolytic Viruses: Optimizing and Selecting for Virus Strains with Improved Efficacy. *Biol Targets Ther* **2018**, *Volume 12*, 43–60, doi:10.2147/BTT.S140114.

12. Załączniki

12.1 Oświadczenia współautorów publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej

12.2 Opinia komisji Bioetycznej

Analiza immunohistochemiczna ekspresji ENO1 u pacjentów skóry była elementem projektu naukowego realizowanego w Katedrze Patologii Klinicznej i Doświadczalnej, na którego realizację uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UMW (zgoda nr 580/2019). Badania z wykorzystaniem linii komórkowych nie wymagają zgody Komisji Bioetycznej.

dr Michał Majkowski
Katedra Biochemii
Uniwersytet Wrocławski

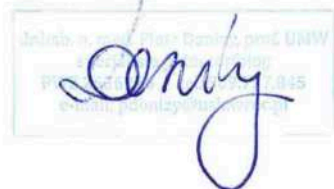
Wrocław 11.04.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Hippner, M.; Majkowski, M.; Biecek, P.; Szkudlarek, T.; Simiczyjew, A.; Pieniazek, M.; Nowak, D.; Miazek, A.; Donizy, P., 2022, Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma—An In Vitro and a Clinical Study. *Diagnostics*, 12, 254, doi:10.3390/diagnostics12020254.

mój udział polegał na zobrazowaniu wyników przy użyciu skaningowego mikroskopu konfokalnego, analizie wyników oraz krytycznej recenzji i poprawkach manuskryptu.



Podpis
Michał Majkowski

Wrocław 11.04.2023

prof. dr hab. inż. Przemysław Biecek
Zakład Projektowania Systemów CAD/CAM i Komputerowego Wspomagania Medycyny
Wydział Matematyki i Nauk Informacyjnych
Politechnika Warszawska

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Hippner, M.; Majkowski, M.; Biecek, P.; Szkudlarek, T.; Simiczyjew, A.; Pieniazek, M.; Nowak, D.; Miazek, A.; Donizy, P. Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma—An In Vitro and a Clinical Study. *Diagnostics* 2022, 12, 254, doi:10.3390/diagnostics12020254.

mój udział polegał na przeprowadzeniu analizy statystycznej danych, współtworzeniu rycin zamieszczonych w publikacji oraz krytycznej recenzji i poprawkach manuskryptu.



Teresa Szkudlarek
Katedra Patologii Klinicznej i Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wrocław 11.04.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Hippner, M.; Majkowski, M.; Biecek, P.; Szkudlarek, T.; Simiczyjew, A.; Pieniazek, M.; Nowak, D.; Miazek, A.; Donizy, P. Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma—An In Vitro and a Clinical Study. *Diagnostics* 2022, 12, 254, doi:10.3390/diagnostics12020254.

mój udział polegał na opracowaniu metodologii i współpracy przy wykonywaniu badań immunohistochemicznych oraz krytycznej recenzji i poprawkach manuskryptu.



Teresa Szkudlarek

dr Aleksandra Simiczyjew
Zakład Patologii Komórki
Uniwersytet Wrocławski


Wrocław 11.04.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Hippner, M.; Majkowski, M.; Biecek, P.; Szkudlarek, T.; Simiczyjew, A.; Pieniazek, M.; Nowak, D.; Miazek, A.; Donizy, P. Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma—An In Vitro and a Clinical Study. *Diagnostics* 2022, 12, 254, doi:10.3390/diagnostics12020254.

mój udział polegał na współtworzeniu metodologii oraz krytycznej recenzji i poprawkach manuskryptu.


Podpis


dr hab. n. med. Donizy P. (IMW)

dr n. med. Małgorzata Pieniżek
Zakład Leczenia Systemowego Nowotworów Litych
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wrocław 11.04.2023

OŚWIADCZENIE


Oświadczam, że w pracy:

Hippner, M.; Majkowski, M.; Biecek, P.; Szkudlarek, T.; Simiczjew, A.; Pieniżek, M.; Nowak, D.; Miazek, A.; Donizy, P. Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma—An In Vitro and a Clinical Study. *Diagnostics* 2022, 12, 254, doi:10.3390/diagnostics12020254.

mój udział polegał na współtworzeniu metodologii oraz krytycznej recenzji i poprawkach manuskryptu.

MPieniżek 11.04.23

dr hab. n. med. Piotr Donizy, prof. UMW
Specjalista Onkologii Klinicznej
IPK 257-145



dr n. med. Małgorzata Pieniżek
specjalista onkologii klinicznej
2523517



dr hab. Dorota Nowak prof. UWr
Zakład Patologii Komórki
Uniwersytet Wrocławski

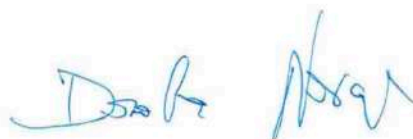
Wrocław 11.04.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Hippner, M.; Majkowski, M.; Biecek, P.; Szkudlarek, T.; Simiczyjew, A.; Pieniazek, M.; Nowak, D.; Miazek, A.; Donizy, P. Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma—An In Vitro and a Clinical Study. *Diagnostics* 2022, 12, 254, doi:10.3390/diagnostics12020254.

mój wkład polegał na udziale w analizie wyników i pisaniu dyskusji.



Prof. dr hab. Arkadiusz Miążek
Katedra Biochemii i biologii Molekularnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław 11.04.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Hippner, M.; Majkowski, M.; Biecek, P.; Szkudlarek, T.; Simiczyjew, A.; Pieniazek, M.; Nowak, D.; Miążek, A.; Donizy, P. Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma—An In Vitro and a Clinical Study. *Diagnostics* 2022, 12, 254, doi:10.3390/diagnostics12020254.

mój udział polegał współtworzeniu koncepcji artykułu, opracowaniu metodologii, analizie otrzymanych wyników, organizacji części środków finansowych potrzebnych do przeprowadzania badań i publikacji oraz krytycznej recenzji i poprawkach manuskryptu.

Dr hab. inż. med. Piotr Donizy prof. UWr
Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej
ul. Świdnicka 47, 50-131 Wrocław
tel. 71 350 757 345



dr hab. n. med. Piotr Donizy prof. UMW
Katedra Patologii Klinicznej i Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wrocław 11.04.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Hippner, M.; Majkowski, M.; Biecek, P.; Szkudlarek, T.; Simiczyjew, A.; Pieniazek, M.; Nowak, D.; Miazek, A.; Donizy, P. Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma—An In Vitro and a Clinical Study. *Diagnostics* 2022, 12, 254, doi:10.3390/diagnostics12020254.

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji artykułu, ocenie preparatów histopatologicznych oraz analizie otrzymanych wyników, współtworzeniu rycin, organizacji części środków finansowych potrzebnych do przeprowadzania badań i publikacji oraz krytycznej recenzji i poprawkach manuskryptu.



Agnieszka Łaskiewicz
Laboratorium Immunologii Molekularnej i Komórkowej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk

Wrocław 11.04.2023

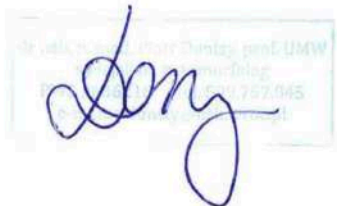
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Hippner-Kunicka, M.; Łaskiewicz A.; Skrzymowska J.; Biecek, P.; Donizy P.; Miazek, A.; 2023
Overexpression of c-MYC promoter binding protein-1 enhances proliferation and glucose metabolism
of melanoma cells lines Anticancer Research

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji artykułu, przeprowadzeniu transdukcji komórkowej,
wizualizacji immunofluorescencji, opracowaniu wyników oraz krytycznej recenzji i poprawkach
manuskryptu.

Agnieszka Łaskiewicz



Joanna Skrzymowska
Laboratorium Immunologii Nowotworów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk

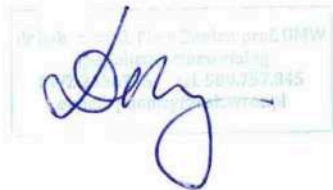
Wrocław 11.04.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Hippner-Kunicka, M.; Laszkiewicz A.; Skrzymowska J.; Biecek, P.; Donizy P.; Miazek, A.; 2023
Overexpression of c-MYC promoter binding protein-1 enhances proliferation and glucose metabolism
of melanoma cells lines Anticancer Research

mój udział polegał na opracowaniu metodologii i współpracy przy wykonywaniu eksperymentów oraz
krytycznej recenzji i poprawkach manuskryptu.



Joanna Skrzymowska

Wrocław 11.04.2023

prof. dr hab. inż. Przemysław Biecek
Zakład Projektowania Systemów CAD/CAM i Komputerowego Wspomagania Medycyny
Wydział Matematyki i Nauk Informacyjnych
Politechnika Warszawska

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Hippner-Kunicka, M.; Laszkiewicz A.; Skrzymowska J.; Biecek, P.; Donizy P.; Miazek, A.; 2023
Overexpression of c-MYC promoter binding protein-1 enhances proliferation and glucose
metabolism of melanoma cells lines Anticancer Research

mój udział polegał na konsultacji wyników analizy statystycznej oraz krytycznej recenzji i poprawkach
manuskryptu.



dr hab. n. med. Piotr Donizy prof. UMW
Katedra Patologii Klinicznej i Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

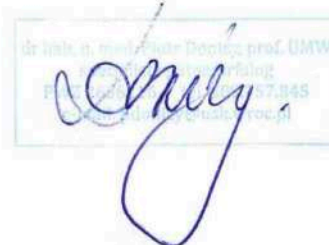
Wrocław 11.04.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Hippner-Kunicka, M.; Laszkiewicz A.; Skrzymowska J.; Biecek, P.; Donizy P.; Miazek, A.; 2023
Overexpression of c-MYC promoter binding protein-1 enhances proliferation and glucose metabolism
of melanoma cells lines. Anticancer Research

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji artykułu, organizacji części środków finansowych
potrzebnych do przeprowadzania badań i publikacji oraz krytycznej recenzji i poprawkach
manuskryptu.



dr hab. n. med. Piotr Donizy prof. UMW
Katedra Patologii Klinicznej i Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
57-045

Prof. dr hab. Arkadiusz Miązek
Katedra Biochemii i biologii Molekularnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

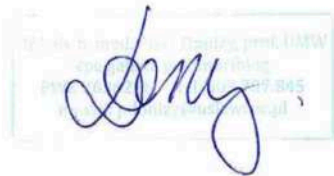
Wrocław 11.04.2023

OŚWIADCZENIE

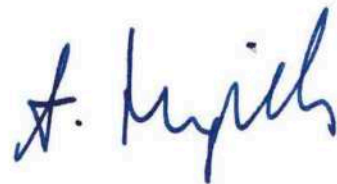
Oświadczam, że w pracy

Hippner-Kunicka, M.; Laszkiewicz A.; Skrzymowska J.; Biecek, P.; Donizy P.; Miązek, A.; 2023
Overexpression of c-MYC promoter binding protein-1 enhances proliferation and glucose metabolism
of melanoma cells lines, Anticancer Research

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji artykułu, opracowaniu metodologii, analizie
otrzymanych wyników, współtworzeniu tekstu manuskryptu, organizacji części środków finansowych
potrzebnych do przeprowadzania badań i publikacji oraz krytycznej recenzji i poprawkach
manuskryptu.



Donizy P.



A. Miązek

KOMISJA BIOETYCZNA
 przy
 Uniwersytecie Medycznym
 we Wrocławiu
 ul. Pasteura 1; 50-367 WROCLAW

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ Nr KB – 580/2019

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, powołana zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 133/XV R/2017 z dnia 21 grudnia 2017 r. oraz działająca w trybie przewidzianym rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz.U. nr 47, poz. 480) na podstawie ustawy o zawodzie lekarza z dnia 5 grudnia 1996 r. (Dz.U. nr 28 z 1997 r. poz. 152 z późniejszymi zmianami) w składzie:

prof. dr hab. Jacek Daroszewski (choroby wewnętrzne, endokrynologia, diabetologia)

prof. dr hab. Krzysztof Grabowski (chirurgia)

dr Henryk Kaczkowski (chirurgia szczękowa, chirurgia stomatologiczna)

mgr Irena Knabel-Krzyszowska (farmacja)

prof. dr hab. Jerzy Liebhart (choroby wewnętrzne, alergologia)

ks. dr hab. Piotr Mrzygłód, prof. nadzw. (duchowny)

mgr Luiza Müller (prawo)

dr hab. Sławomir Sidorowicz (psychiatria)

prof. dr hab. Leszek Szenborn (pediatria, choroby zakaźne)

Danuta Tarkowska (pielęgniarstwo)

prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska (farmakologia kliniczna)

dr hab. Andrzej Wojnar, prof. nadzw. (histopatologia, dermatologia) przedstawiciel

Dolnośląskiej Izby Lekarskiej)

dr hab. Jacek Zieliński (filozofia)

pod przewodnictwem

prof. dr hab. Jana Kornafela (ginekologia i położnictwo, onkologia)

Przestrzegając w działalności zasad Good Clinical Practice oraz zasad Deklaracji Helsińskiej, po zapoznaniu się z projektem badawczym pt.:

„Nowe histomorfologiczne i immunohistochemiczne markery prognostyczne i predykcyjne w wybranych nowotworach złośliwych jako potencjalnie użyteczne narzędzia rokownicze w rutynowej praktyce klinicznej”

zgłoszonym przez **dr hab. Piotra Donizego** zatrudnionego w Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Katedry Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz złożonymi wraz z wnioskiem dokumentami, w tajnym głosowaniu postanowiła **wyrazić zgodę** na przeprowadzenie badania w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, w Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu, w Opolskim Centrum Onkologii w Opolu, w Zakładzie Patologii Nowotworów Świętokrzyskiego Centrum Onkologii oraz w Zakładzie Patologii Komórki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego we współpracy z Department of Pathology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, USA i Department of Pathology, Institut Curie, Paryż, Francja a także Department of Pathology, National and Kapadistrian University of Athens, Grecja oraz Laboratory of Pathology, National Institute of Health Bethesda MD USA **pod warunkiem zachowania anonimowości uzyskanych danych.**

Uwaga: Badanie to zostało objęte ubezpieczeniem odpowiedzialności cywilnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z tytułu prowadzonej działalności.

Pouczenie: W ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu.

Opinia powyższa dotyczy projektu badawczego będącego podstawą działalności statutowej. Numer rejestrowy Centrum Wspierania Nauki Nr: ST.B130.18.030

Wrocław, dnia **18** lipca 2019 r.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KOMISJA BIOETYCZNA
przewodniczący
prof. dr hab. Jan Komafel