

## WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

### ZAKŁAD LIPIDÓW I LIPOSOMÓW

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

tel. +48 71 375 62 04

www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-lipdow-i-liposomow

Uniwersytet Medyczny  
we Wrocławiu



RPW/14393/2023 P  
Data:2023-08-18

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
BIURO RADY DYSCYPLINY  
NAUKI MEDYCZNE

wpł.  
dnia

21-08-2023

L. dz. RN-BM/

1459

Dr hab. Jerzy Gubernator

Wrocław 14.08.2023

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE

*M. Podhorska-Okołów*

prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów

### Recenzja rozprawy doktorskiej Miriam Hippner-Kunickiej : „Wpływ ekspresji alfa-enolazy (ENO1) i jej izofromy MBP1 na metabolizm glukozy i tempo proliferacji wybranych linii komórkowych ludzkiego czerniaka skóry”

Promotorzy rozprawy: dr hab. n. med. Piotr Dionizy, prof. UMW  
prof. dr hab. Arkadiusz Miązek

Nowotwory są głównym problemem współczesnej medycyny. Od szeregu lat obserwuje się wzrost zachorowalności w populacjach ludzkich co związane jest ze zmianą nawyków żywieniowych i jakością produktów spożywczych, ekspozycją na karcynogeny i promieniowanie UV, a także wirusami onkogennymi, których rozprzesczenie się zwiększa się wraz zagęszczaniem populacji. Jednym z najbardziej niebezpiecznych nowotworów jest czerniak dla którego również obserwuje się rosnącą zachorowalność wywołaną zwiększoną ekspozycją na ultrafiolet z powodu obecności dziury i opalania się w salonach kosmetycznych. Z tego powodu od szeregu lat poszukuje się skutecznych metod leczenia tego śmiertelnego nowotworu. Mimo powierzchniowego występowania bywa on przeoczany a chirurgiczne wycięcie nawet niewielkich zmian nie zapewnia wyleczenia. W ostatnich latach poszukiwane są całkowicie nowe podejścia do leczenia tego nowotworu. Poza inhibitorami ścieżek sygnałnych, przeciwciałami monoklonalnymi i immunoterapiami liczne grupy badawcze zainteresowały się działaniem na metabolizm komórek nowotworowych jako jedną z najbardziej obiecujących dróg prowadzących do zahamowania ich wzrostu. W aspekt prac nad nowymi terapiami czerniaka wpisuje się bardzo interesująca rozprawa doktorska mgr Miriam-Hippner-Kunickiej w której doktorantka zajęła się znaczeniem alfa enolazy, jednego z enzymów glikolitycznych w rozwoju tego nowotworu. Należy pamiętać, że bardzo wiele komórkowych szlaków sygnałnych ma liczne obejścia, białka powierzchniowe występujące na powierzchni komórek nowotworowych rzadko występują w całej ich populacji, natomiast takie procesy metaboliczne jak glikoliza, cykl Krebsa czy łańcuch oddechowy nie posiadają dróg alternatywnych a komórki nowotworowe używają tych szlaków jako (najczęściej) jedynej drogi pozyskiwania energii co czyni działanie na metabolizm komórek nowotworu bardzo obiecującym.

Recenzowana rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Patologii Klinicznej i Doświadczalnej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem dr. hab. n. med. Piotra Dionizego, prof. UMW oraz w Katedrze Biochemii i Biologii

Molekularnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod Kierunkiem prof. dr. hab. Arkadiusza Miążka. Praca składa się z cyklu dwóch monotematycznych prac poświęconych znaczeniu alfa enolazy lub jej izoformy MBP-1 w rozwoju i przerzutowaniu czerniaka. Obie publikacje to ciekawe z poznawczego punktu widzenia prace eksperymentalne. Sumaryczny współczynnik oddziaływania publikacji (IF) stanowiących dokonanie naukowe doktorantki to 6,427 i odpowiednio 140 punktów MNiSW. W obu pracach doktorantka jest pierwszym autorem. Deklarowany udział w publikacjach doktorantki można uznać za dominujący.

Cykl publikacji opatrzony jest krótkim wprowadzeniem pozwalającym rozeznąć się w tematyce raka skóry oraz ENO1 i jej wersji pozbawionej N-końcowego fragmentu, czyli białka MBP-1 wiążącego się z czynnikiem transkrypcyjnym c-MYC, dalej znajduje się wyraźnie zdefiniowany Cel pracy oraz rozdziały Streszczeń poprzedzających załączone publikacje, w którym doktorantka wylicza najważniejsze wyniki uzyskane w poszczególnych pracach. Te rozdziały pozwalają przygotować się na lekturę poszczególnych publikacji oraz podają najważniejsze osiągnięcia. Dalej znajdują się krótki rozdział Podsumowanie oraz Wnioski w którym wymienia najważniejsze obserwacje płynące z wykonanych badań. Na końcu znajdują się oświadczenia wszystkich autorów prac oraz Opinia Komisji Bioetycznej.

W pracy nr I: „Alpha-Enolase (ENO1) Correlates with Invasiveness of Cutaneous Melanoma – An *In Vitro* and Clinical Study” poddano analizie dane pochodzące od 112 pacjentów u których badano ekspresję alfa-enolazy metodą immunohistochemiczną i korelowano je z danymi klinicznymi i histopatologicznymi. Alfa-enolaza jest jednym z enzymów szlaku glikolitycznego który jest atrakcyjnym celem dla terapii przeciwnowotworowych gdyż poza znacząco wpływa na procesy nowotworowe. Jej zahamowanie może wpływać na ograniczenie tempa rozwoju nowotworów oraz ich przerzutowania. Co ciekawe, generalnie opisywana jako białko cytoplazmatyczne wykazuje zdolność do tworzenia kompleksów z białkami cytoszkieletu i mitochondriów. Jej zwiększona ekspresja jest obserwowana w licznych nowotworach co świadczy o znaczeniu tego enzymu w podtrzymywaniu procesu nowotworowego. Zwiększona ekspresja tego enzymu jest także obserwowana w innych chorobach takich jak reumatoidalne zapalenia stawów, toczeń rumieniowaty, twardzina układowa a także choroba Alzheimerera. Podwyższony poziom tego enzymu promuje proliferację, migrację oraz inwazyjność komórek nowotworowych, przy czym ma również wpływ na podtrzymywanie efektu Warburga, tak przecież istotnego dla większości komórek nowotworowych.

W przypadku analizy próbek od pacjentów zaobserwowano istotną korelację pomiędzy nadekspresją ENO1 a grubością nacieku nowotworu według skali Breslowa i Clarka, zwiększoną aktywnością mitotyczną i obecnością owrzodzenia. Dodatkowo podwyższona ekspresja ENO1 korelowała z większą inwazyjnością komórek (badania na liniach *in vitro*) oraz gorszym rokowaniem pacjentów. W tej pracy prowadzono również badania *in vitro* na wybranych liniach komórkowych czerniaka pochodzących z guza pierwotnego (A375, WM1341D) jak i linii przerzutowych do węzłów chłonnych (WM9 i Hs294T) we celu określenia ekspresji oraz aktywności ENO1. Podczas tych badań doktorantka wykorzystwała techniki Western blot, i immunofluorescencji. Dodatkowo w niektórych eksperymentach korelowano ekspresję i aktywność enzymatyczną w warunkach hipoksji i normoksji. Wszystkie wyniki wskazują na podwyższoną ekspresję i aktywność enzymu w wybranych liniach komórkowych i wycinkach pobranych od pacjentów wskazując na

znaczenie tego enzymu dla komórek czerniaków. W przypadku badania linii pobranych z przerzutów do węzłów chłonnych doktorantka zauważyła znacząco wyższy poziom aktywności ENO1 dla komórek hodowanych w warunkach hipoksji co może świadczyć o tym, że zwiększona ekspresja a tym samym i aktywność ENO1 ma wpływ na przystosowanie się komórek czerniaka do warunków beztlenowych w węzłach chłonnych, które stanowią jedną z głównych dróg ich migracji. Bez tego przystosowania komórek przerzutowanie nie byłoby skuteczne. Niestety z naszego punktu widzenia jest to niekorzystna cecha tych komórek. Ta praca zasługuje na wyróżnienie z uwagi na bogatą statystycznie próbkę tkanek pacjentów. 112 wycinków umożliwia uzyskanie reprezentatywnych wyników i pozwala na wyciągnięcie wiążących wniosków. Powstaje zatem pytanie, w jaki sposób obniżyć selektywnie ekspresję tego enzymu w komórkach nowotworowych? Jednym z czynników które potencjalnie jest celem jest nie sam enzym, ważny przecież w erytrocytach - co słusznie zauważa doktoranta - ale na przykład HIF-1 $\alpha$ , którego aktywność spowodowana warunkami hipoksji prowadzi między innymi do zwiększonej ekspresji ENO1.

Sposobem odpowiedzi na pytanie w jaki sposób wykorzystać ENO1 (lub jej formę alternatywnego wycinania) w terapii czerniaka jest publikacja nr II o tytule: „Overexpression of c-MYC Promoter Binding Protein-1 Enhances Proliferation and Glucose Metabolism of Melanoma Cells Lines” która traktuje o białku MBP-1 będącym produktem alternatywnej translacji mRNA kodującego ENO1. Białko MBP-1 w przeciwieństwie do enolazy lokalizuje się w jądrze komórkowym gdyż wykazuje powinowactwo do szeregu genów działając jako represor transkrypcji, w tym genu c-MYC prowadząc do zmniejszenia proliferacji i wzrostu komórek nowotworowych. Z tego powodu doktorantka zdecydowała się wykorzystać nie samą ENO1 ale jej wariant alternatywnej translacji jako czynnik, który może hamować rozwój czerniaków.

Z komórek dwóch linii czerniaka ludzkiego A375 oraz WM9 uzyskano sześć stabilnych transfektantów wykorzystując cząstki lentiwirusa jako czynniki transfekcyjne, pozwalających na nadekspresję białka MBP-1 oraz jego mutantu z C-końcową delacją części aminokwasów (MBP-1 $\Delta$ C). Przygotowano także wektory kontrolne wymagane do oceny wpływu samej modyfikacji genetycznej. Doktorantka posłużyła się metodą Western blot oraz immunofluorescencji do wykrycia znacznika HA-tag związanego z końcem nadekspresjonowanych białek. Aby ocenić wpływ wpływu nadekspresji białka MBP-1 na transkrypcję c-MYC posłużyła się natomiast Metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wykonała także test włączania 5-etynylo-2'-dezoksyurydyny do rosnącego łańcucha DNA. Miało to pomóc ocenić tempo proliferacji komórek. W celu oceny tempa glikolizy w warunkach normoksji i hipoksji zmierzyła także ilość wydzielanego przez komórki mleczanu dostępnym komercyjnie zestawem. Testem rysy oceniała inwazyjność komórek.

W tym przypadku uzyskane wyniki są nieco niejednoznaczne gdyż zaobserwowano wpływ samej transdukcji na szybkość proliferacji oraz ilość wydzielanego mleczanu w warunkach hipoksji. Metodą immunofluorescencji udało się doktorantce zlokalizować w komórkach nadekspresjonowane białka – przy czym była to lokalizacja głównie cytoplazmatyczna a nie jądrowa jak zakładano (także dla transfekowanej linii prawidłowej HEK293T). Przełożyło się to na tylko minimalne ograniczenie ekspresji mRNA pochodzącego z genu c-MYC, a komórki transdukowane MBP-1 wykazywały zwiększoną szybkość proliferacji oraz wydzielania mleczanu w porównaniu do komórek transdukowanych pustym wektorem. Transdukcja MBP-

I spowodowała jednak zmniejszenie zdolności do migracji komórek WM9 podczas gdy nie miała znaczenia w przypadku linii A375. Inną obserwacją była taka, że domena C-końcowa białka MBP-1 jest niezbędna do promowania proliferacji i migracji komórek ale tylko dla linii WM9 transdukowanej genem białka MBP-1. Uzyskane wyniki nie potwierdziły założeń, jak to jest w wielu badaniach naukowych, natomiast są cenne z poznawczego punktu widzenia ponieważ pozwalają zadawać kolejne pytania o mechanizm transportu białka MBP-1 do jądra, wpływ transdukcji na szlaki metaboliczne komórek i wiele innych.

Podsumowując obie publikacje oceniam je bardzo wysoko, badania zostały poprawnie zaplanowane i wykonane. Warsztat doktorantki nie budzi zastrzeżeń, w pracy posłużono się szeregiem technik stosowanych w biologii molekularnej a doktorantka biegle się nimi posługuje. Tutaj należy również zaznaczyć, że mgr Miriam-Hippner-Kunicka potrafi planować, wykonywać, oceniać przeprowadzone eksperymenty oraz dyskutować płynące z nich wnioski. Dyskusja wyników w publikacjach jest poprawna a wyciągnięte wnioski końcowe uzasadnione i odpowiadające wynikom.

Publikacje załączone w rozprawie zostały poddane procesowi recenzji i nie mam do nich uwag. Z racji funkcji recenzenta mam natomiast kilka drobnych uwag i pytań do tekstu rozdziału Wprowadzenie oraz Streszczenie publikacji I. Tak więc we Wprowadzeniu w drugim akapicie dotyczącym promieniowania UV doktorantka napisała: „Promieniowanie UV-B (280-315) jest absorbowane przez warstwę ozonową i stanowi jedynie 5% całkowitego światła słonecznego docierającego na ziemię, odpowiadając za najbardziej karcinogenne długości fal. Natomiast promieniowanie UV-A (315-400 nm) reprezentuje pozostałe 95% ekspozycji ...” Zdania te sugerują, że całość promieniowania UV-B jest absorbowana przez warstwę ozonową – należało napisać w większości, oraz to że pozostała część światła słonecznego docierającego do ziemi (95%) to światło UV-A. Rozumiem co doktorantka chciała napisać ale moim zdaniem te dwa zdania są niejasne. Kolejna uwaga dotyczy ostatniego zdania pierwszej strony Streszczenia publikacji I. Czy hipoksja to to samo co stres oksydacyjny? Według mnie zdanie to to właśnie sugeruje.

Mam także uwagę do interpretacji wyników płynących z użycia metody oznaczania mleczanu zastosowanej w publikacji II. W przypadku komórek hodowanych w warunkach hipoksji i normoksji mierzono poziom mleczanu wydzielanego do podłoża, zakładając, że jego ilość odpowiada wydajności/szybkości procesu glikolizy. Jednakże zakłada się tu brak aktywności łańcucha oddechowego (bardzo wysoki poziom efektu Warburga). Czy możliwe jest, że dla danej linii komórkowej w warunkach normoksji część pirogronianu powstałego w procesie glikolizy nie była jednak redukowana do mleczanu i trafiała do cyklu Krebsa a dalej do łańcucha oddechowego zamiast do płynu hodowlanego? Miałoby wpływ na ilość mleczanu w pożywce a nie koniecznie było związane z szybkością czy intensywnością procesu glikolizy. Proszę o krótką dyskusję podczas odnoszenia się do uwag do doktoratu po prezentacji. Uważam, że to ciekawa kwestia.

Podsumowując wykonane badania wnoszą znaczący wkład do wiedzy związanej z wpływem alfa-enolazy oraz jej alternatywnej formy pozbawionej aktywności enzymatycznej na los pacjentów z czerniakiem oraz zachowanie komórek czerniaka. Badania zostały starannie zaplanowane i wykonane.

Wkład doktorantki w prace jest dominujący a wyniki przekonywujące, także współczynnik oddziaływania prac jest wystarczający.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia warunki określone w art. Art. 187. ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2018, poz. 1668), dlatego wnioskuję do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Miriam-Hippner-Kunickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jen Cabanetto', is positioned on the right side of the page.