Warszawa 20.03.2020

Prof. dr hab. Janusz Siedlecki
Zakład Onkologii Molekularnej
i Translacyjnej,
Narodowy Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy
ul. Roentgena 5, 02-784 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

„Rola kinazy aktywowanej AMP (AMPK) w regulacji procesu przerzutowania komórek nowotworowych"

Autor: *mgr inż. Paweł Konieczny*

Badania roli, jaką w procesie transformacji nowotworowej odgrywają uszkodzenia w genach, których produkty uczestniczą w kontroli podstawowego metabolizmu komórki to obecnie jeden z najbardziej intensywnie eksplorowanych obszarów nauki. Choć tego typu badania prowadzone już były w latach dwudziestych XX wieku przez Otto Warburga to ciągle nasza wiedza na ten temat jest co najwyżej szczątkowa. Dopiero pod koniec XX wieku został zidentyfikowany enzym będący głównym regulatorem homeostazy energetycznej komórki. Enzym ten, nazwany kinazą aktywowaną przez AMP (AMPK), jest kompleksem utworzonym przez trzy różne podjednostki zwane AMPKα, β i ϒ. Podjednostka α jest podjednostką katalityczną, podjednostki β i ϒ pełnią funkcję regulatorową. Podjednostka α występuje w dwóch izoformach α1 i α2, podjednostka β posiada również dwie izoformy, a podjednostka ϒ posiada trzy izoformy i dodatkowo izoformy ϒ2 i ϒ3 mają dwa warianty splicingowe. W sumie oznacza to, że AMPK może posiadać aż 12 różnych konfiguracji. W większości tkanek AMPK występuje jako heterotrimer α1 β1 lub 2 i ϒ1 lub 2. Aktywność tego enzymu nie jest łatwa do przewidzenia, gdyż w znacznej części zależy od kontekstu metabolicznego komórki. Dlatego badania regulatorowej funkcji kinazy AMPK są trudne, a ich wyniki są często rozbieżne. Ze względu na rolę jaką enzym ten odgrywa w utrzymywaniu homeostazy energetycznej wydaje się, że powinien on stanowić doskonały cel

terapeutyczny. Wciąż jednak brak jest jednoznacznej odpowiedzi czy korzystniejsza jest aktywacja AMPK czy raczej jej zahamowanie. Przedstawiona mi do recenzji praca jest próbą odpowiedzi na to pytanie.

Rozprawa doktorska, włącznie ze spisem literatury liczy 110 stron tekstu. Ma układ typowy dla rozpraw na stopień doktora. Składa się ze Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wstępu, Celu pracy, Materiałów i Metod, Wyników i Dyskusji. Całość pracy zamknięta jest 10 wnioskami. Wykaz piśmiennictwa liczy 159 pozycji.

Głównym celem tej pracy była próba wyjaśnienia roli jaką w procesie przerzutowania w raku szyjki macicy odgrywa kinaza AMPK. Zdaniem autora na tak postawione pytanie można odpowiedzieć tworząc odpowiedni model oparty na trzech liniach raka szyjki macicy, w których dzięki genetycznym manipulacjom dokonano zmiany w poziomie ekspresji poszczególnych podjednostek AMPK, w tym szczególnie jednostki katalitycznej jak również prześledzić rolę tej podjednostki w procesie przerzutowania czy indukcji transformacji epitelialno-mezenchymalnej (EMT).

Model badawczy oparty został na trzech ludzkich liniach komórek raka szyjki macicy o różnym stopniu zaawansowania. Charakterystyka molekularna ludzkiej linii C-4I była zbliżona do charakterystyki komórek guza na wczesnym stopniu zaawansowania, gdy komórki guza wykazywały cechy fenotypu epitelialnego. Linia HTB-35 odpowiadała charakterystyce guza, w którym komórki uzyskują zdolność do przerzutowania, a więc ich fenotyp jest już częściowo mezenchymalny. Linia HTB-34 wywodziła się z przerzutu. Komórki tej linii cechowały zmiany molekularne charakterystyczne dla przejścia mezenchymalno-epitelialnego. Innymi słowy składający się z trzech linii raka szyjki macicy model pozwalał na: z jednej strony śledzenie zmian jakie występują w trakcie przejścia epitelialno-mezenchymalnego (czyli inaczej procesu tworzenia przerzutu), z drugiej strony na skorelowanie tych zmian z zmianami aktywności kinazy AMPK. Obecnie wszelkie prace wykonywane na liniach komórkowych muszą być opatrzone informacją o weryfikacji linii

komórkowych dokonywanej przez sprzedawcę. Niestety nie znalazłem tej informacji w recenzowanej pracy (a jest to również warunkiem przyjęcia pracy do druku). Nie znalazłem też informacji czy wszystkie trzy linie odpowiadały temu samemu typowi raka szyjki macicy.

Rozdział Materiały i Metody opisany jest dosyć dokładnie, choć moim zdaniem trudno by na jego podstawie wykonać wszystkie przeprowadzone, i dodać muszę skomplikowane, procedury.

Wyniki tej pracy można podzielić na dwie zasadnicze części. Pierwsza to manipulacje genetyczne prowadzące do otrzymania stabilnych linii komórkowych z nadekspresją podjednostki katalitycznej AMPK α1 lub z jej wyciszeniem. Otrzymanie takich linii pozwalało na wzbogacenie badanego modelu o możliwość zbadania zależności pomiędzy poziomem aktywności AMPK, a procesem transformacji epitelialno-mezenchymalnej. We wszystkich analizowanych liniach oceniono poziom ekspresji podjednostki katalitycznej AMPKα1. Najwyższy poziom ekspresji podjednostki katalitycznej zaobserwowano w linii C-4I, czyli w linii o najbardziej epitelialnym fenotypie i najniższym stopniu zaawansowania. Poziom ekspresji AMPKα1 w dwóch pozostałych liniach był odpowiednio niższy i zależał od przypisanego liniom stanu przejścia EMT i stopnia zaawansowania raka. Poziomy ekspresji pozostałych jednostek AMPK czyli AMPKβ1 i AMPKϒ1 w analizowanych liniach HTB-35 i HTB-34 były podobne. Podobna analiza przeprowadzona została na materiale klinicznym pochodzącym od chorych na raka szyjki macicy, który stanowiły próbki guza pierwotnego i materiał pochodzący z przerzutu do węzła chłonnego. Każda para próbek pochodziła od tej samej pacjentki. Otrzymany wynik potwierdził niższy poziom ekspresji AMPKα1 w przerzucie w porównaniu z guzem pierwotnym.

Kolejnym krokiem było przygotowanie linii z nadekspresją podjednostki katalitycznej AMPKα1 oraz linii z obniżonym poziomem ekspresji tej podjednostki (linia z wyciszeniem podjednostki katalitycznej). Do konstrukcji linii z nadekspresją podjednostki katalitycznej wykorzystano linię HTB-35 wykazującą naturalne obniżenie poziomu ekspresji tej

podjednostki. Pobrano z repozytorium plazmid zawierający sekwencję podjednostki katalitycznej (*PRKAA1*) i po potwierdzeniu poprawności sekwencji połączono ją z sekwencją GFP-P2A. Otrzymany konstrukt GFP-P2A-AMPKα1 zawierał dodatkowo białko GFP, co pozwalało w sposób jednoznaczny ocenić poziom podjednostki katalitycznej. Obecność prawidłowej sekwencji podjednostki katalitycznej potwierdzono poprzez sekwencjonowanie. Okazało się jednak, że otrzymany konstrukt zawiera substytucję w pozycji 928 (G>T). Aby usunąć błąd autor zastosował technikę mutagenezy miejscowo-specyficznej. Powtórne sekwencjonowanie potwierdziło przywrócenie prawidłowej sekwencji. Oznaczało to możliwość dalszej konstrukcji plazmidu ekspresyjnego niezbędnego do produkcji lentiwirusa modyfikującego komórki linii HTB-35. Weryfikacja funkcjonalna potwierdziła prawidłowość utworzonego konstruktu. Poziom ekspresji mierzony poziomem fluorescencji świadczył o nadekspresji podjednostki katalitycznej w porównaniu do kontroli. W wyniku transdukcji linii HTB-35 wyprodukowanymi wirusami otrzymano dwie zmodyfikowane linie komórkowe. Dzięki obecności GFP możliwe stało się wzbogacenie populacji komórek HTB-35 wykazujących nadekspresję podjednostki katalitycznej AMPKα1.

Linię z obniżoną ekspresją podjednostki katalitycznej AMPK uzyskano w wyniku wprowadzenia sekwencji shRNA dla podjednostki AMPKα1 do wirusa i infekcji tym wirusem linii C-4I. Ze względu na ponad 80% podobieństwo obu podjednostek katalitycznych wyciszeniu uległy obie izoformy, ale wyciszenie podjednostki AMPKα1 było znacząco wyższe.

Autor nie stwierdził istotnych statystycznie zmian w proliferacji genetycznie zmodyfikowanych komórek linii C-4I i HTB-35. Jednak badanie wskaźnika zużycia tlenu wykazywało wyższe zużycie przez inwazyjną linię HTB-35 względem linii C-4I.

Druga część pracy to analiza wpływu genetycznej manipulacji dokonanej w liniach C-4I i HTB-35. Wzrost poziomu ekspresji podjednostki katalitycznej AMPKα1 w linii HTB-35 prowadził do zmian morfologicznych, głównie w oddziaływaniach

międzykomórkowych. W linii o zwiększonej ekspresji podjednostki katalitycznej AMPKα1 autor potwierdził widoczne w mikroskopie zmiany wykazując wzrost w poziomie ekspresji niektórych białek adhezyjnych, w tym również kadheryny E,

W kolejnym etapie autor wykorzystał utworzony przez siebie model genetycznie zmodyfikowanych linii RSM do śledzenia zmian w poziomie ekspresji genów związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym. Analizowano zmiany w poziomie mRNA takich genów jak SNAIL, SLUG, ZEB-1 i wimentyna związanych z EMT oraz niektórych metaloproteinaz związanych z trawieniem macierzy zewnątrzkomórkowej i błony podstawnej w tym MMP-1, MMP2 i MMP13. W linii C-4I shAMPKα1 poziom ekspresji markerów EMT był wyższy niż w linii niezmodyfikowanej. Natomiast w linii HBT-35 GFP-2PA-AMPK obserwowany efekt był dokładnie odwrotny. Wzrost poziomu ekspresji podjednostki katalitycznej AMPKα1 w tej linii prowadził do spadku poziomu wimentyny, co oznacza iż komórki te cechował bardziej epitelialny charakter. Zmiany w poziomie ekspresji metaloproteinaz nie były jednoznaczne.

Stymulacja transformacji EMT przez odpowiednie czynniki wzrostu (HGF lub SDF-1) lub przez czynniki farmakologiczne takie jak metformina i AICAR potwierdziły uprzednio opisane wyniki. Chociaż w tym przypadku nie obserwowano w obu modyfikowanych liniach znaczących różnic w ilości podjednostki katalitycznej AMPKα1 to można było zaobserwować zmiany w jej aktywności. Długotrwała stymulacja AMPK prowadziła jednak do spadku żywotności i indukcji apoptozy w stymulowanych liniach.

Ważnym elementem tej pracy są badania nad zdolnością genetycznie zmodyfikowanych linii RSM do tworzenia guzów i przerzutowania przeprowadzone na mysim modelu NOD-SCID. Linia C-4I, w której obniżono poziom podjednostki katalitycznej po podskórnym podaniu indukowała guzy, których masa była istotnie większa, ale które nie wykazywały zdolności do przerzutowania. Heteroprzeszczepy wyprowadzone z genetycznie zmodyfikowanej linii HTB-35, w której poziom AMPKα był istotnie zwiększony

charakteryzowały się szybkim wzrostem i niewielką zdolnością do przerzutowania, szczególnie do płuc.

Dyskusja w tej pracy jest bardzo dobrze poprowadzona. Widać, że autor bardzo dokładnie przemyślał swoje wyniki i porównał je z podobnymi wynikami otrzymanymi przez innych autorów. W wielu przypadkach obserwowane zmiany były zgodne z opisanymi w literaturze. Jednak w tych eksperymentach, w których wyniki różniły się od wyników opisanych przez innych autorów lub nawet dane literaturowe były rozbieżne autor starał się zaproponować własne rozwiązania. Takie podejście świadczy o dużej samodzielności i dojrzałości naukowej kandydata. Całość pracy kończy 10 wniosków, z których przynajmniej dwa ostatnie nie wydają się jednak na obecnym etapie do realizacji.

Podsumowując, doktorant wykazał odwrotną zależność pomiędzy poziomem aktywności AMPK a agresywnością guza i zdolnością do przerzutowania. Z jednej strony obniżenie poziomu ekspresji podjednostki katalitycznej AMPK obniża zdolność do proliferacji, ale z drugiej ten spadek wiąże się z agresywnością nowotworu i zwiększoną zdolnością do przerzutowania. Jak się wydaje agresywność raka szyjki macicy związana jest ze spadkiem aktywności AMPK. Podobnie, wzrost ekspresji AMPK hamuje proces transformacji i przesuwa równowagę w kierunku bardziej epitelialnego fenotypu. Zarówno spadek poziomu ekspresji podjednostki katalitycznej w komórkach C-4I jak i wzrost poziomu ekspresji tej podjednostki w linii HTB-35 promuje przeżycie komórek, co na pierwszy rzut oka wydaje się być sprzeczne i sugeruje iż funkcja AMPK w znaczący sposób zależy od kontekstu molekularnego i roli jaką ten enzym odgrywa w utrzymaniu homeostazy energetycznej komórki. Długotrwała stymulacja czynnikiem wzrostu genetycznie zmodyfikowanej linii C-4I prowadzi do aktywacji procesu przejścia EMT, podczas gdy podobna stymulacja genetycznie zmodyfikowanej linii HTB-35 przesuwa ten proces w kierunku fenotypu epitelialnego, czyli prowadzi do obniżenia zdolności do przerzutowania. W

tych warunkach wykorzystanie regulacji aktywności AMPK, jako miejsca uchwytu dla terapii celowanej wydaje się być niezwykle trudne.

Te wszystkie dane wskazują, że nie ma prostej drogi do sterowania AMPK i wykorzystania tego enzymu jako bezpośredniego celu w terapii kierowanej. Wydaje się, że na obecnym etapie badań należy przede wszystkim zdobyć jak najwięcej informacji o procesach, którymi AMPK steruje lub może nawet bardziej ogólniej, które procesy biologiczne (czytaj metaboliczne) są z nią związane.

Z przedstawionych danych nie wynika jednoznacznie możliwość wykorzystania aktywności kinazy AMPK jako mechanizmu spowalaniającego wzrost guza nowotworowego i obniżania jego zdolności do tworzenia przerzutów. Pytanie: jak to jednak zrobić, ciągle pozostaje bez odpowiedzi. Mimo wszystko uważam, że doktorant uzyskał odpowiedzi na wiele stawianych w celu pracy pytań. Do obowiązków recenzenta należy wyłapanie wszystkich błędów i niedociągnięć w pracy. Jest ich sporo - ciężki styl, dużo błędów gramatycznych i literówek, brak przypisania rycin do tekstu i mało czytelne podpisy w rycinach (zbyt małe litery) utrudniają czytanie tej pracy. Jednak mimo tych wszystkich niedociągnięć uważam, że warto tę pracę wyróżnić. Jest ona bowiem przykładem naprawdę dobrze przemyślanej i wykonanej pracy doktorskiej.

Dlatego wnioskuję do Rady Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie autora pracy – mgr inż. Pawła Koniecznego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Zakładu Onkologii
Molekularnej i Translacyjnej

Prof. dr hab. n. med. Janusz Siedlecki