UNIVERSITY OF WARSAW | CeNT CENTRE OF NEW TECHNOLOGIES

Warszawa, 23.04.2022

dr hab. Agnieszka Kobielak, Prof. uczelni
Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej Nowotworów
Centrum Nowych Technologii,
Uniwersytetu Warszawskiego

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Soni Elżbiety Trojan

pt.: „Znaczenie nowotworowo specyficznych izoenzymów fosfofruktokinazy II w progresji czerniaka złośliwego z uwzględnieniem roli niskotlenowego środowiska rozwoju guza."

(„The role of cancer-specific izoenzymes of phosphofructokinase II in the progression of malignant melanoma including the role of low-oxygen environment of tumor development ")

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Soni Elżbiety Trojan została wykonana w Katedrze Biochemii Lekarskiej Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Piotra Laidlera. Promotorem pomocniczym pracy jest pani dr Kinga Kocemba-Pilarczyk.

Wartość rozprawy podnosi fakt, iż badania zostały wykonane w ramach projektu badawczego finansowanego przez NCN, którego kierownikiem była mgr Sonia Trojan. Ponadto należy podkreślić, że przedstawione w rozprawie wyniki została już opublikowane w trzech oryginalnych pracach, które ukazały się w impaktowanych czasopismach: International Journal of Molecular Sciences (IF 5,9 punktacja MNiSW 140); Cancer Cell International (IF 4,1 punktacja MNiSW 100) oraz Anticancer Research (IF 1,9 punktacja MNiSW 70). Pani mgr Trojan jest pierwszym autorem we wszystkich tych pracach. A zatem, zarówno sama tematyka badań, jak też wyniki badań zaprezentowane w rozprawie zostały pozytywnie ocenione przez niezależnych recenzentów tych publikacji.

Głównym celem badań zaprezentowanych w ramach rozprawy doktorskiej było określenie znaczenia nowotworowo specyficznych izoenzym6w PFK-II (kodowanych przez geny PFKFB3 i PFKFB4) w progresji czerniaka złośliwego z uwzględnieniem roli niskotlenowego

S. Banacha 2c str., 02-097 Warszawa
phone: +48 22 5543600, +48 22 5543603
e-mail: sekretariat@cent.uw.edu.pl, www.cent.uw.edu.pl

środowiska rozwoju guza oraz próba zrozumienia znaczenia ich ko-ekspresji dla celów terapeutycznych.

Nowotworzenie jest złożonym zaburzeniem zależnym od wielu czynników wewnątrzkomórkowych jak i mikrośrodowiskowych regulujących wzrost, inwazję i przerzutowanie. Mikrośrodowisko raka jest wysoce niejednorodne i charakteryzuje się zarówno hipoksją, jak i fizjoksją. Dlatego teoria „plastyczności metabolicznej", która głosi, że komórki nowotworowe posiadają w pełni funkcjonalną maszynerię w postaci fosforylacji oksydacyjnej i w miarę potrzeb mogą przełączać się między OXPHOS, a glikolizą tlenową, a nawet prowadzić je jednocześnie, może tłumaczyć zdolności adaptacyjne do różnych mikrośrodowisk i promowanie chemooporności. Zjawisko hipoksji jest szczególnie istotne w przypadku czerniaka, ponieważ w przeciwieństwie do innych guzów litych, gdzie niedotlenienie pojawia się dopiero przy intensywnym rozroście guza, w skórze hipoksja jest zjawiskiem naturalnym. Ponadto ponad połowa przypadków czerniaka charakteryzuje się obszarami głębokiej hipoksji lub wręcz anoksji. W warunkach niedotlenienia czynnik transkrypcyjny HIF-1α służy jako kluczowy czujnik tlenu i główny regulator odpowiedzi komórkowej na hipoksję. Komórki nowotworowe przeprogramowują metabolizm energetyczny, nasilając ścieżkę glikolizy m. in. poprzez zwiększenie transkrypcji lub alternatywnego splicingu genów glikolitycznych indukowanych przez HIF-1 takich jak m. in. fosfokruktokinaza II (PFK-II). Dane literaturowe wskazują, że w komórkach nowotworowych nadekspresji ulegają głównie izoenzymy fosfokrtuktokinazy II kodowane przez geny PFKFB3 i PFKFB4. Co ciekawe PFKFB3 i PFKFB4 wpływają wielokierunkowo na proces nowotworzenia jak i na metabolizm komórek nowotworowych. Oba izoenzymy posiadają dwie przeciwstawne domeny katalityczne przez co w sposób znaczący uczestniczą w regulacji metabolizmu glukozy w komórkach nowotworowych. Ponadto indukcja obu genów w warunkach hipoksji, może mieć szczególne znaczenie w adaptacji metabolicznej w warunkach niskotlenowych. Oprócz kluczowej roli w kierowaniu przepływem glukozy pomiędzy dwoma szlakami metabolicznymi: glikolizą i szlakiem pentozofosforanowym: PFKFB3 i PFKFB4 mogą regulować też proces autofagii oraz wpływać na szlaki sygnalizacyjne, kluczowe dla proliferacji komórek nowotworowych. W przypadku czerniaka dane literaturowe na temat ekspresji oraz roli izoenzymów PFKFB3 i PFKFB4 w progresji tego nowotworu są ograniczone. W przedstawionej pracy opisano logicznie zaplanowany i dobrze udokumentowany ciąg doświadczeń, które w znaczący sposób przyczyniają się do lepszego zrozumienia roli izoenzymów PFKFB3 i PFKFB4 w czerniaku a

także w innych typach nowotworów. W mojej opinii za najważniejsze osiągnięcia tej pracy należy uznać:

1. Wykazanie, że ekspresja nowotworowo specyficznego izoenzymu fosfokruktokinazy II, kodowanej przez gen PFKFB4 koreluje ze złym rokowaniem u pacjentów z czerniakiem złośliwym i krótszym czasem przeżycia wolnym od przerzutów. Ponadto powiązanie wysokiej ekspresji tego genu z tempem metabolizmu w czerniaku.
2. Pokazanie, że regulacja procesu alternatywnego splicingu genu PFKFB4 może mieć istotne znaczenie w regulacji przeciwstawnych aktywności kinazowej lub fosfatazowej pozwalając na dostosowanie przepływu glukozy przez glikolizę oraz szlak pentozofosforanowy.
3. Analiza współzależności między poziomami ekspresji PFK-II kodowanej przez izoenzymy PFKFB3 i PFKFB4 w panelu nowotworów ludzkich, gdzie wykazano, że wysoka ekspresja PFKFB3 i/lub PFKFB4 koreluje ze złym rokowaniem u pacjentów z kilkoma typami nowotworów litych. Natomiast w przypadku nerwiaka zarodkowego korelacja ekspresji PFKFB4 jest odwrotna.

Wszystkie przedstawione w ocenianej pracy wyniki są interesujące i ważne dla określenia znaczenia nowotworowo specyficznych izoenzymów PFK-II (kodowanych przez geny PFKFB3 i PFKFB4) w progresji czerniaka złośliwego oraz innych typach nowotworów litych. dlatego wartość naukową pracy mgr Soni Trojan oceniam bardzo wysoko.

Część przedstawionej rozprawy doktorskiej została napisana w języku polskim, natomiast streszczenie i załączone publikacje oryginalne są w języku angielskim. Praca ta liczy 97 stron i obejmuje czternaście rozdziałów, kolejno: „Wykaz stosowanych skrótów", Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej" „Finansowanie badań", „Streszczenie", Abstract", Wstęp", „Cel pracy", „Materiaty i metody", „Publikacja nr 1", „Publikacja nr 2", „Publikacja nr 3", „Dyskusja", „Oświadczenie współautorów", Literatura".

Rozdział zatytułowany „Wstęp" stanowi bardzo dobre przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat metabolizmu, roli hipoksji oraz izoenzymów fosfofruktokinazy w komórkach nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem czerniaka. Doktorantka bardzo jasno przedstawia problemy badawcze, zwracając szczególną uwagę na te elementy, które stały się podstawą do sformułowania celów pracy. Wprowadzenie czytelnika w tematykę pracy byłoby

jeszcze łatwiejsze, gdyby we wstępie pojawiły się schematy lub ryciny. Wstęp w logiczny sposób prowadzi do kolejnej części rozprawy, czyli założeń i celów badawczych. Autorka sformułowała cel główny polegający na określeniu znaczenia nowotworowo specyficznych izoenzymów PFK-II oraz ich ko-ekspresji w progresji czerniaka złośliwego z uwzględnieniem roli niskotlenowego środowiska rozwoju guza. Następnie szczegółowe cele rozprawy autorka ujęła w 6 kolejnych, dobrze przemyślanych i logicznie zaplanowanych etapach. Kolejny rozdział: „Materiały i metody" jest stosunkowo krótki, gdyż szczegółowa metodyka została zawarta w opublikowanych pracach.

W czasie lektury rozprawy nasunęło mi się jedno pytanie dotyczące opisu materiałów i metod (proszę o udzielenie odpowiedzi w czasie obrony pracy):

1) duża część wyników prezentowana w rozprawie oparta jest na analizach publicznie dostępnych baz danych. Na ile samodzielnie analizy te były wykonane przez Doktorantkę?

Kolejne rozdziały: „Publikacja nr 1", „Publikacja nr 2", „Publikacja nr 3" stanowią zasadniczą część wynikową rozprawy. Każda publikacja jest podsumowana klarownym opisem najważniejszych wyników i wniosków. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski odpowiadają ustalonym celom pracy.

W pierwszej publikacji Doktorantka wykazała, że komórki czerniaka wykazują wysoki profil glikolityczny, niezależnie od warunków tlenowych hodowli. Natomiast analiza ekspresji genów kodujących enzymy glikolityczne, przeprowadzona w normoksji oraz hipoksji wykazała, że jedynym indukowanym genem w komórkach czerniaka w warunkach niskiego parcjalnego ciśnienia tlenu jest PFKFB4. Doktorantka wnioskuje, że indukcja ekspresji genu PFKFB4 może być uznana za istotny mechanizm regulujący metabolizm gluzozy w hipoksycznych komórkach czerniaka. Tutaj nasuwa się pytanie, na które proszę o udzielenie odpowiedzi w trakcie obrony: czy na podstawie ekspresji tego genu i jej korelacji z wysokim profilem glikolitycznym, bez badań funkcjonalnych można wysuwać tak daleko idący wniosek? Bardzo istotnym aspektem tej publikacji jest analiza publicznie dostępnej bazy danych wykazująca, że wysoka ekspresja PFKFB4 przyczynia się do złego rokowania chorych na czerniaka, co może być istotne w rozwoju przyszłych terapii.

W drugiej publikacji Doktorantka skupiła swoje badania na związku między ekspresją PFKFB3 i PFKFB4 a przeżywalnością pacjentów z różnego typu nowotworami litymi. Tutaj zaskakująco

wykazano, że w niektórych nowotworach wysoka ekspresja PFKFB3 i PFKFB4 koreluje z krótszym całkowitym przeżyciem, natomiast w nerwiaku zarodkowym wysoka ekspresja PFKFB4 koreluje z dłuższym całkowitym przeżyciem. Z przedstawionych badań wynika, że w nerwiaku zarodkowym wartość prognostyczna PFK-II może zależeć od wzajemnej relacji pomiędzy ekspresją PFKFB3 i PFKFB4 i aktywności ich specyficznych domen funkcjonalnych.

Logiczną konsekwencją wyników otrzymanych w publikacji numer 2 są badania zawarte w kolejnej, trzeciej publikacji, w której to Doktorantka wykazała, że kluczowe w zrozumieniu ekspresji i funkcji genu PFKFB4 w adaptacji metabolicznej komórek czerniaka złośliwego, jest określenie profilu ekspresji na poziomie poszczególnych izoform, gdyż ocena poziomu sumarycznej ekspresji genu PFKFB4 w warunkach hipoksji, nie odzwierciedla indukcji ekspresji poszczególnych izoform. Ponadto analiza na poziomie białek również pozwoliła na wyselekcjonowanie tych izoform, których walidację funkcjonalną należy przeprowadzić, aby w pełni zrozumieć znaczenie ekspresji PFKFB4 w adaptacji metabolicznej komórek czerniaka złośliwego.

„Dyskusja" zawiera podsumowanie uzyskanych wyników w odniesieniu do danych literaturowych. Dyskusja jest wszechstronna i wskazuje niewątpliwie, iż Doktorantka posiada umiejętność krytycznej i wyważonej oceny uzyskanych wyników oraz formułowania wniosków końcowych a także biegle porusza się w dostępnej w swoim obszarze badań literaturze. Zacytowana w pracy bibliografia liczy 200 pozycji obejmujących wszystkie aktualne pozycje literaturowe z obszaru wykonywanych badań. Opracowanie pracy jest staranne, aczkolwiek zdarzają się pojedyncze błędy literowe. Dla wygody czytającego dobrze byłoby dodać kilka schematów we wstępie. Drobne uchybienia nie wpływają jednak na moją wysoką ocenę pracy.

Podsumowanie:

Stwierdzam, iż przedstawiona do oceny praca mgr Soni Trojan zatytułowana „Znaczenie nowotworowo specyficznych izoenzymów fosfofruktokinazy II w progresji czerniaka złośliwego z uwzględnieniem roli niskotlenowego środowiska rozwoju guza" spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" (tekst jednolity: Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z p6:zn. zm.). Praca

stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego zdefiniowanego przez Doktorantkę i przedstawionego w celach pracy. Użycie wielu metod badawczych, w tym szerokie wykorzystanie publicznie dostępnych baz danych wskazuje na umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną i umiejętnością analizy i interpretacji otrzymanych danych eksperymentalnych.

Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Soni Trojan do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej ze względu na wysoką rangę przedstawionych wyników, które zostały już opublikowane w formie trzech publikacji, jak również profesjonalny sposób omówienia wyników w rozprawie.

Z poważaniem,