



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

Department of Pharmaceutical Biochemistry
and Molecular Diagnostics
with Laboratory of Molecular Diagnostics
& Pharmacogenomics
tel/fax: +48 42 677-91-26
E-mail: marek.mirowski@umed.lodz.pl

Zakład Biochemii Farmaceutycznej
i Diagnostyki Molekularnej
z Pracownią Diagnostyki Molekularnej
i Farmakogenomiki
tel/fax: +48 42 677-91-26
E-mail: marek.mirowski@umed.lodz.pl

prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski

Łódź, 10 maja 2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Roberta Łukasza Kleszcza pt.: "Modulacja kanonicznej ścieżki Wnt w komórkach płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi – poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych" przedstawionej Radzie Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Rozprawa doktorska mgr Roberta J. Kleszcza jest wynikiem badań przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Baer-Dubowskiej i dr Jarosława Paluszczaka jako promotora pomocniczego.

Dysertacja dotyczy poszukiwania potencjalnych terapeutycznych punktów uchwytu kanonicznej ścieżki Wnt w płaskonabłonkowych nowotworach głowy i szyi, które mogłyby być wykorzystane w ich terapii. Obecnie stosowane procedury postępowania terapeutycznego nie są wystarczająco skuteczne a roczny odsetek zgonów wśród pacjentów onkologicznych dla grupy zdiagnozowanej z płaskonabłonkowymi nowotworami głowy i szyi wynosi około 5%. Nawet najnowsze terapie celowane wykorzystujące jako terapeutyczny punkt uchwytu receptor EGFR z użyciem chimerycznego przeciwciała monoklonalnego cetuximabu, czy inhibitora kinaz tyrozynowych erlotinibu lub receptora PD-1 z przeciwciałem humanizowanym niwelumabem nie przynoszą spodziewanych efektów leczenia, dlatego wybór tematu przez Doktoranta jest trafny i w pełni uzasadniony. Dysertację charakteryzuje typowy układ.

W 36 stronicowym wstępie Autor wprowadza czytelnika w historię odkrycia szlaku sygnałowego Wnt ścieżki kanonicznej i niekanonicznej, powiązania z patogenezą chorób nowotworowych a szczególnie z rozwojem raka okrężnicy. Szczegółowo omawia strukturę organizacyjną i regulację kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt sposób jej regulacji m. in. przez rodzinę dziewiętnastu białek Wnt ich ligandy, inhibitory ligandów Wnt, porcupinę (błonową o-acylotransferazę), białko Wntless (Wls), receptory Frizzled, β -kateninę, E-kadherynę, białko APC, cyklinę D1, czynnik transkrypcyjny c-Myc, metaloproteinazę MMP-7, surwiwinę. Omawia czynniki biorące udział w aktywacji transkrypcji genów docelowych szlaku Wnt w tym rodzinę czynników transkrypcyjnych TCF/LEF, acetylotransferazy histonów,

metylotransferazy i demetylazy. Biorąc pod uwagę, że lista genów szlaku Wnt zależnego od β -kateniny zawiera ponad 100 pozycji Doktorant w sposób kompetentny podsumował skomplikowane mechanizmy związane z aktywacją omawianego szlaku sygnałowego ilustrując go dodatkowo trzema rycinami.

W kolejnym podrozdziale wstępu opisuje klasyfikację kliniczną nowotworów głowy i szyi wg umiejscowienia i prezentuje szczegółowe dane epidemiologiczne z roku 2014, czynniki egzogenne indukujące powstawanie tych nowotworów (palenie tytoniu, alkohol wysokoprocentowy, przewlekłe mechaniczne drażnienie śluzówek, wirusy onkogenne – HPV i EBV). Wskazuje także na endogenne czynniki promujące proces kancerogenezy do których zalicza zmiany na poziomie chromosomalnym w analizę których swój wkład wnieśli pracownicy Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Wskazuje najważniejsze onkogeny, geny supresorowe, geny układu detoksykacji, naprawy DNA oraz geny ulegające epigenetycznemu wyciszeniu na drodze hipermetylacji. W tym ostatnim aspekcie duży wkład wniósł promotor pomocniczy z pracownikami Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej jak i Autorem dysertacji. Podrozdział ten kończy porównanie, dobrze opisanego, kanonicznego szlaku sygnałowego Wnt w nowotworach jelita grubego z coraz bardziej budzącym zainteresowanie naukowców i klinicystów szlakiem sygnałowym Wnt w HNSCC.

Oryginalny jest również poruszony we wstępie związek pomiędzy aktywnością szlaku Wnt i nasileniem tlenowej glikolizy komórek rakowych określanej jako efekt Warburga dobrze poznany w przypadku raka okrężnicy. Autor omawia proces glikolizy i glutaminolizy w komórkach nowotworowych kładąc nacisk na pobudzanie glikolizy w sposób pośredni z udziałem czynników transkrypcyjnych HIF-1 α i c-MYC, które z kolei mogą być modulowane przez białka z grupy modyfikatorów epigenetycznych do których Autor zalicza istotne w metabolizmie komórek nowotworowych sirtuiny, co zostało podsumowane w wieloautorskiej pracy poglądowej przygotowanej ze współudziałem Doktoranta (pierwszy autor). Ta część wstępu zawiera trzy ryciny, pozwalające lepiej zrozumieć czytelnikowi omawiane aspekty regulacji metabolizmu w komórkach nowotworowych.

Ostatni podrozdział podsumowuje terapie stosowane w płaskonabłonkowych nowotworach głowy i szyi poczynając od terapii konwencjonalnych poprzez terapie celowane oparte o zmiany molekularne ścieżek sygnałowych opisywanych w HNSCC. Autor wyjaśnia możliwe korzyści ze stosowania inhibicji kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt za pomocą niesteroidowych leków przeciwzapalnych, pochodnej sulindaku (eksisulind), imatynibu, endostatyny i witamin A i D, niklozamidu – leku przeciw pasożytniczemu z opisaną aktywnością przeciwnowotworową, inhibitorów porcupiny, tankyrazy, nowych leków biologicznych, interferującego RNA oraz licznych związków pochodzenia naturalnego.

Wstęp został przygotowany w sposób przejrzysty i klarowny. Mogę jedynie zwrócić uwagę na drobne błędy edytorskie. Cytowana publikacja [Port et al., 2011] na str. 13 w piśmiennictwie odnotowana jest w roku 2010, brak w piśmiennictwie cytowanej na str 20 publikacji [Li et al., 2012]. Również cytowana na str 145 praca [Mates et al., 2010] w

piśmiennictwie jest odnotowana z rokiem 2013. Sugerowałbym również ujednolicenie pisowni genów np. na str 27, 28.

Cel pracy, jaki postawił Doktorant jest nowatorski, bardzo obszerny i jego realizacja wymagała opanowania szerokiego warsztatu metodycznego, a przez to olbrzymiego zaangażowania eksperymentatora, dotyczył selekcji najkorzystniejszych punktów uchwytu w kanonicznym szlaku sygnałowym Wnt w celu ich wykorzystania w terapii płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi.

Badania przeprowadzono na 7 komercyjnych liniach komórkowych pochodzących z nowotworów głowy i szyi, 2 liniach nowotworowych, jednej pochodzącej z gruczolakoraka jelita grubego i drugiej z raka okrężnicy. Wykorzystano również komórki ludzkich, immortalizowanych hTERT keratynocytów i nienowotworowe, dysplastyczne keratynocyty. Do modulacji szlaku Wnt w wybranych liniach komórkowych zastosowano 16 różnych związków. Do badania żywotności komórek Doktorant zastosował dwa testy – MTT dla związków PKF118-310, niklozamid, resweratrolu, DMU-212, KG-548, 10058-F4, 2-deoksyglukozy, kwasu aminooctowego (n=8) oraz test z użyciem resazury dla związków będących drobnocząsteczkowymi inhibitorami ścieżki sygnałowej Wnt (Dvl-PDZ Domain inhibitor II, GSK-J4, GSK-LSD1, IWP-2, ML324, MM102, MS049, PRI-724).

Z hodowanych i traktowanych różnymi związkami komórek izolowano RNA, który poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji w celu syntezy cDNA. Ilościowej oceny ekspresji genów dokonywano techniką PCR w czasie rzeczywistym (R-T PCR) – dwóch genów referencyjnych, 6-ściu genów docelowych dla kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt, 13 genów związanych z metabolizmem glukozy i glutaminy i 16 genów docelowych dla wybranych cząsteczek siRNA. Ponadto, Doktorant wykorzystał kilka testów enzymatycznych (oznaczanie mleczanu i amoniaku) i testy funkcjonalne takie jak test migracji komórek, indukcji apoptozy i test umożliwiający analizę wpływu badanych związków na cykl komórkowy. Opanował metodę transfekcji komórek za pomocą plazmidów reporterowych, których aktywność zależy od stopnia pobudzenia ścieżki sygnałowej. Kotretransfekcja komórek cząsteczkami siRNA pozwalała na wyciszenie ekspresji genów kodujących badane białka (n=43) co umożliwiało wskazanie najkorzystniejszego punktu uchwytu efektywnego zahamowania aktywności kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt. W 14 stronicowym suplemencie Doktorant przedstawia wyniki optymalizacji transfekcji komórek HNSCC pozwalające na wybór najlepiej funkcjonującego zestawu komercyjnego jak również dobór stężeń odczynników używanych do transfekcji. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorant zamieścił 7 Tabel i 8 Rycin.

W tej części pracy zastosowany skrót hTERT nie znalazł się w wykazie skrótów. Badane związki str 47 i 48 mogłyby być zaprezentowane w formie tabelarycznej z podaniem bardziej szczegółowej ich charakterystyki. Również w tym rozdziale nie znalazłem zastosowanego stężenia DMSO dla prób kontrolnych (str 63-65). Z czego wynikało zastosowanie dwóch różnych termocyklerów (Chromo4 – BioRad i LightCycler, Roche)? Dlaczego w przypadku niektórych eksperymentów w hodowli komórek *in vitro* obniżano

stężenie FBS do 5%? Z czego wynika zastosowanie dwóch testów do określenia żywotności komórek (MTT i resazuryna)?

Wyniki. Swoje badania Doktorant rozpoczął od selekcji podatnych na modulację kanonicznej ścieżki Wnt nowotworowych linii komórkowych HNSCC (BICR6, BICR18, CAL27, FaDu, H314, SCC-25) i linii nienowotworowych OKF4/TERT-1 i DOK. Do modulacji wybrał chlorek litu (induktor) w stężeniach opartych o dane z piśmiennictwa i związek PKF118-310 (inhibitor), którego wybór stężenie poprzedzono przeprowadzeniem testu żywotności komórek. Otrzymane wyniki pozwoliły na selekcję dwóch linii komórkowych HNSCC jednej wywodzącej się z raka języka (CAL27) drugiej z gardła (FaDu). Spośród badanych transkryptów genów (*AXIN2*, *CTNNB1*, *CCND1*, *MMP7*, *c-MYC*, *BIRC5*) najlepszymi markerami aktywności szlaku Wnt okazały się transkrypty mRNA *AXIN-γ2* i *MMP7*. Dalsze badania zostały ukierunkowane na poszukiwania potencjalnych farmakologicznych punktów uchwytu w badanej ścieżce sygnałowej. W tym celu Doktorant wykorzystał kotransfekcję siRNA i plazmidu reporterowego kodującego białko zielonej fluorescencji (GFP), które przy udziale czynników transkrypcyjnych i β-kateniny pozwala na pomiar fluorescencji świadczącej o aktywności transkrypcyjnej β-kateniny. Trudności związane ze zbyt niską aktywnością szlaku Wnt w komórkach HNSCC zobligowały Eksperymentatora do włączenia do doświadczenia komórek HCT116 raka okrężnicy (CRC) jako linii modelowej. W wyniku tak przeprowadzonych analiz wyselekcjonowano osiem białek (porcupinę, dishevelled 1, acetylotransferazę CBP, demetylazy KDM1A, KDM4C, KDM6A, metylotransferazy CARM1, KMT2A) które wpływały na szlak Wnt w komórkach linii CAL27 i FaDu i raka okrężnicy (HCT116).

Przeprowadzona ocena skuteczności wyciszenia 16 genów docelowych dla siRNA w komórkach HCT116, CAL27 i FaDu pozwoliła na dalszą ocenę 6 genów docelowych kanonicznej ścieżki Wnt (*AXIN2*, *CCND1*, *MMP7*, *c-MYC*, *BIRC5*, *VEGF*) i wykazanie, że najistotniejsze znaczenie dla modulacji szlaku posiadają geny kodujące porcupinę (*PORCN*) i białko dishevelled 1 (*DVL1*) oraz acetylotransferazę CBP, demetylazy *KDM1A*, *KDM4C*, *KDM6A* i metylotransferazy *CARM1* i *KMT2A*. Ich wyciszenie powoduje zmniejszenie ekspresji genów kodujących aksynę 2 i metaloproteinazę 7.

W celu weryfikacji potencjalnych terapeutycznych punktów uchwytu ścieżki Wnt zastosowano 8 niskocząsteczkowych inhibitorów białek, których wyciszenie siRNA powodowało obniżoną ekspresję genów docelowych szlaku Wnt. Analizy wykonano z zastosowaniem komórek CAL27, FaDu, BICR6, H314, SCC-25 i wprowadzonej dodatkowo linii UM-SCC-1. Były to Dvl-PDZ Domain inhibitor II – inhibitor domeny PDZ białek dishevelled, GSK-J4 – inhibitor demetylazy histonów KDM6A/B, GSK-LSD1 - inhibitor demetylazy histonów KDM1A, IWP-2 – inhibitor porcupiny, ML324 - inhibitor demetylazy histonów KDM4C, MM102 - inhibitor metylotransferazy histonów KMT2A, MS049 - inhibitor metylotransferazy histonów CARM1, PRI-724 – inhibitor interakcji CBP/β-katenina. Analizę ekspresji genów poprzedzały badania żywotności komórek, którą starano się utrzymać na poziomie powyżej 70%. Powyższa analiza pozwoliła wytypować cztery potencjalne

farmakologiczne punkty uchwytu w kanonicznej ścieżce Wnt. Najbardziej obiecującymi związkami okazały się PRI-724 – inhibitor interakcji CBP/ β -katenina i IWP-2 – inhibitor porcupiny. Z kolei Dvl-PDZ Domain inhibitor II i MS049 działały słabiej ale bardziej wybiórczo. Dla tych związków wykonano testy komórkowe (linie BICR6, CAL27, FaDu, SCC-25, UM-SCC-1) weryfikujące efekty ich działania (test migracji, badanie cyklu komórkowego i procesu apoptozy). Najlepsze efekty w teście migracji jak i w teście indukcji apoptozy uzyskano dla związków PRI-724 i IWP-2. Inhibitory acylotransferazy CBP i porcupiny zaburzały też cykl komórkowy i wykazywały największą skuteczność inhibicji.

Końcowym elementem prowadzonych w dysertacji badań była ocena potencjalnego związku pomiędzy modulacją ścieżki sygnałowej Wnt w komórkach HNSCC a regulacją metabolizmu energetycznego. Eksperymenty wstępne wykonane na linii FaDu porównały wpływ resweratrolu i jego metoksy pochodnej DMU-212 oraz niskocząsteczkowych inhibitorów HIF-1 α (KG-548) i c-MYC (10058-F4) i potencjalnych induktorów SIRT6 z efektami działania inhibitorów glikolizy (2-deoksyglukoza) i glutaminolizy (kwas aminooksyoctowy). Stężenia związków, podobnie do wcześniejszych badań, ustalono w teście żywotności komórek tak aby ich żywotność wynosiła powyżej 70%. Analizie techniką Real-Time PCR poddano geny kodujące białka transportowe (GLUT1, SLC1A5), wybrane enzymy glikolizy (heksokinaza, fosfofruktokinaza M, kinaza pirogronianowa M2, dehydrogenaza mleczanowa A) i glutaminolizy (glutaminaza, dehydrogenaza glutaminianowa), czynniki transkrypcyjne HIF-1 α i c-MYC oraz SIRT6 (rodzina deacetylaz histonów). Ekspozycja komórek na resweratrol i kwas aminooksyoctowy indukowała ekspresję HIF-1 α a inhibitor HIF-1 (KG-548 i AOAA) indukował poziom c-MYC. W pożywkach hodowlanych oznaczono także zmiany poziomu mleczanu, amoniaku, metabolitów glikolizy i glutaminolizy. Zawartość mleczanu była obniżana o około 30% przez inhibitory HIF-1 i c-MYC a także przez 2-deoksyglukozę.

W poszukiwaniu związku pomiędzy modulacją metabolizmu energetycznego komórek HNSCC (FaDu, BICR6 i H314) a aktywnością szlaku sygnałowego Wnt Doktorant wykorzystuje niklozamid, lek przeciwpasożytniczy, który zaburza metabolizm tlenowy glukozy w procesie fosforylacji oksydacyjnej i dodatkowo wykazuje cechy antagonisty szlaku Wnt. W komórkach linii FaDu powodował wyraźne (50%) obniżenie poziomu transkryptu genu *MMP7* i tendencję spadkową dla genu *Axin2*.

W eksperymencie zamykającym część doświadczeń dysertacji oceniono wpływ chorku litu (stymulatora ścieżki Wnt) i PKF118-310 (inhibitora ścieżki Wnt) na ekspresję kluczowych dla glikolizy enzymów i białek (kinaza dehydrogenazy pirogronianowej 1 – PDK1, transporter mleczanu do przestrzeni międzykomórkowej – MCT1 w komórkach nowotworowych (BICR6, BICR18, CAL27, FaDu, H314, SCC-25) i nienowotworowych (DOK i OKF4/TERT-1). LiCl nie zwiększał ekspresji genów kodujących białka szlaku glikolizy podczas gdy PKF118-310 wyraźnie obniżał poziom transkryptu *PDK1* i *LDHA* w komórkach OKF4/TERT-1. Wyniki nie potwierdziły związku pomiędzy aktywacją szlaku Wnt i wzmożoną aktywnością glikolizy tlenowej w komórkach HNSCC.

Rozdział opisujący wyniki jest bardzo rozbudowany liczy 70 stron. Pomimo ogromu zrealizowanych eksperymentów stanowi logiczną i bardzo spójną całość. Warto podkreślić,

że w tej części pracy Doktorant zaprezentował 102 ryciny i ta część dysertacji świadczy, że mgr Robert Ł. Kleszcz opanował techniki hodowli komórkowych ich transfekcji i analizy w stopniu perfekcyjnym i stał się ekspertem w zakresie badań dotyczących poszukiwania nowych, potencjalnych tarcz działania leków.

W opisie rycin które przedstawiają porównanie z komórkami kontrolnymi traktowanymi DMSO mogłoby znaleźć się jego końcowe stężenie w próbie. Ponadto, pisownia Wnt w tekście i w prezentowanych rycinach powinna być ujednolicona (Wnt versus WNT Ryc. 24). Zastosowane skróty GLS, GDH nie zostały zamieszczone w wykazie.

Dyskusja jest bardzo rzeczowa, liczy 10 stron, świadczy o dojrzałości naukowej Autora. Większość prac do których odnosi się Autor została opublikowana w ostatnich latach i w tym rozdziale Doktorant dyskutuje wszystkie aspekty, które zostały przeze mnie szczegółowo omówione w rozdziale wyniki.

Doktorant z przeprowadzonych w dysertacji badań formułuje sześć wniosków, które dobrze podsumowują uzyskane wyniki. Na 18 stronach zebrał cytowane przez siebie artykuły ułożone w porządku alfabetycznym (ponad 300) i zamieścił 3 źródła internetowe.

Jak wynika z załączonego wykazu publikacji jest współautorem 4 opublikowanych prac z zakresu metylacji regionów promotorowych genów istotnych w procesie nowotworzenia i dwóch z bieżącego roku, zaakceptowanych do druku, obejmujących zagadnienia związane z realizowaną pracą doktorską (Mol. Cell. Biochem. i Adv. Clin. Exp. Med.). Ponadto, jest współautorem 3 prac poglądowych z których dwie omawiają zagadnienia poruszane we wstępie pracy doktorskiej (Pharmacol. Rep. 67, 1068-1080, 2015 i Acta Medicorum Polonorum 5, 24-32, 2015). Jest także współautorem 3 komunikatów prezentowanych ustnie i 10 streszczeń zjazdowych.

Prace zamyka streszczenie w języku polskim i angielskim, aneks opisujący optymalizację procesu transfekcji użytych w pracy komórek oraz optymalizacji metodyki pomiarowej i dwa oświadczenie Doktoranta.

Podkreślić należy fakt finansowania badań ze źródeł Narodowego Centrum Nauki (grant nr 2014/13/D/NZ7/00300 oraz projektów uczelnianych nr 502-14-03302403 i 502-14-03302403-41154.

W podsumowaniu uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska jest nowatorska, świadczy o dużej pracowitości i dojrzałości naukowej mgr Roberta Ł. Kleszcza, która przejawia się w umiejętności syntetycznego przedstawiania licznych danych, logicznego wyciągania wniosków i wyboru właściwych kierunków badawczych w oparciu o uzyskiwane wyniki. Doktorant opanował szeroki wachlarz nowoczesnych technik badawczych.

Biorąc pod uwagę powyżej opisane osiągnięcia mgr Roberta Łukasza Kleszcza z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule

naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę zatem wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr R. Ł. Kleszcza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę nowatorski charakter pracy, potencjalne możliwości wykorzystania uzyskanych wyników badań, nowoczesny warsztat metodyczny, kompleksowe rozwiązanie problemu badawczego, znaczący dorobek naukowy uważam dysertację za wyróżniającą i o ile spełnia ona kryteria wyróżnienia przyjęte na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu zgłaszam wniosek o jej wyróżnienie.

KIEROWNIK
Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi


Prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski