

1. Imię i nazwisko

Angelika Muchowicz

(nazwisko panieńskie: Szokalska)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2012 – nadanie stopnia: doktora nauk medycznych

Centrum Biostruktury

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Próby zastosowania inhibitorów tioredoksyny w leczeniu nowotworów”

Promotor prof. dr hab. med. Jakub Gołąb

2008 – nadanie tytułu: magistra inżyniera biotechnologii

Międzywydziałowe Studium Biotechnologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Tytuł pracy magisterskiej: „Badanie cytotoksycznego efektu terapii fotodynamicznej w połączeniu z inhibitorami proteasomu in vitro”.

Promotor prof. dr hab. med. Jakub Gołąb

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Od 2012, asystent naukowy w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

2009-2012 studia doktoranckie, w programie TEAM Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

4. Omówienie osiągnięć

4.1. Tytuł osiągnięcia:

„Przeciwnowotworowe działanie terapii zaburzających równowagę redoks komórki nowotworowej oraz ich wpływ na mikrośrodowisko nowotworu w przedklinicznych badaniach in vitro i in vivo.”

4.2. Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia:

Prace oryginalne:

1. **Muchowicz A**, Firczuk M, Chlebowska J, Nowis D, Stachura J, Barankiewicz J, Trzeciecka A, Kłossowski S, Ostaszewski R, Zagożdżon R, Pu JX, Sun HD, Golab J. Adenanthin targets proteins involved in the regulation of disulphide bonds. *Biochem Pharmacol.* 2014 May 15;89(2):210-6. doi: 10.1016/j.bcp.2014.02.022.
IF: 5.009
2. **Muchowicz A**, Firczuk M, Wachowska M, Kujawa M, Jankowska-Steifer E, Gabrysiak M, Pilch Z, Kłossowski S, Ostaszewski R, Golab J. SK053 triggers tumor cells apoptosis by oxidative stress-mediated endoplasmic reticulum stress. *Biochem Pharmacol.* 2015 Feb 15;93(4):418-27. doi: 10.1016/j.bcp.2014.12.019.
IF: 5.091
3. **Muchowicz A**, Wachowska M, Stachura J, Tonecka K, Gabrysiak M, Wołosz D, Pilch Z, Kilarski WW, Boon L, Klaus TJ, Golab J. Inhibition of lymphangiogenesis impairs antitumour effects of photodynamic therapy and checkpoint inhibitors in mice. *Eur J Cancer.* 2017 Sep;83:19-27. doi: 10.1016/j.ejca.2017.06.004.
IF: 7.191
4. Wachowska M, Stachura J, Tonecka K, Fidyt K, Braniewska A, Sas Z, Kotula I, Rygiel TP, Boon L, Golab J, **Muchowicz A. (autor korespondujący)** Inhibition of IDO leads to IL-6-dependent systemic inflammation in mice when combined with photodynamic therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2020 Jun;69(6):1101-1112. doi: 10.1007/s00262-020-02528-5.
IF: 4.900

Sumaryczny IF: 22,191

Punkty MNiSW: 40+40+40+140 = 260

Praca poglądowa:

5. Stachura J, Wachowska M, Kilarski WW, Güç E, Golab J, **Muchowicz A (corresponding author)** The dual role of tumor lymphatic vessels in dissemination of metastases and immune response development. *Oncoimmunology.* 2016 May 13;5(7):e1182278. doi: 10.1080/2162402X.2016.1182278.
IF: 7,719

4.3. Opis wyników badań:

Wprowadzenie

Rola enzymów antyoksydacyjnych w proliferacji i przeżyciu komórek nowotworowych

Oddziaływanie reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) na procesy wewnątrzkomórkowe zależy od stężenia w jakim są wydzielane. W niskich stężeniach ROS biorą udział w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych. Natomiast ROS powstające w nadmiernych ilościach powodują stres oksydacyjny, który może prowadzić do śmierci komórki, a często także towarzyszy innym procesom patologicznym, takim jak transformacja nowotworowa [1]. ROS, powstające w obrębie guza, zwiększają wydzielane czynników inicjujących proces angiogenezy, stymulując powstawanie naczyń krwionośnych, a także promują migrację komórek nowotworowych i tworzenie przerzutów [2]. Niemniej, stres oksydacyjny powoduje również uszkodzenia białek, lipidów oraz DNA. Z tego powodu komórki nowotworowe utrzymują zwiększoną ekspresję genów kodujących licznych enzymów antyoksydacyjnych, w celu utrzymania równowagi redoks i uniknięcia apoptozy. Ważną grupę enzymów antyoksydacyjnych stanowi układ tioredoksyny, w skład którego wchodzi tioredoksyna oraz reduktaza tioredoksyny. Układ ten, współpracując z perkosyredoksynami, neutralizuje ROS i zapewnia komórkom przeżycie oraz zdolność do proliferacji [3]. Zarówno tioredoksyna jak i reduktaza tioredoksyny inaktywują ROS w reakcjach bezpośrednich, redukując białka zmienione przez ROS lub też poprzez utrzymywanie w zredukowanej formie inne enzymy antyoksydacyjne. Niemniej rola tioredoksyny nie ogranicza się tylko do utrzymywania stanu równowagi redoks. Układ tioredoksyny jest również zaangażowany w syntezę DNA potrzebną do proliferacji komórki, w przekazywanie sygnałów zależnych od czynnika NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) oraz hamowanie procesu apoptozy poprzez inaktywację ASK1 (ang. apoptosis signal-regulated kinase-1) oraz nitrozylację kaspazy 3 [4, 5]. Dodatkowo, układ tioredoksyny wpływa na działanie układu odpornościowego. W wysokich stężeniach zredukowana tioredoksyna hamuje migrację makrofagów, granulocytów oraz aktywację

dopełniacza [6]. Co więcej, tioredoksyna odpowiada także za utrzymanie aktywności przez metaloproteinazy, enzymy pełniące kluczową rolę w powstawaniu przerzutów nowotworowych [7]. Zwiększoną ekspresję genów kodujących tioredoksynę oraz reduktazę tioredoksyny zaobserwowano w wielu nowotworowych, między innymi w: raku wątroby, macicy, płuc, piersi, żołądka, jelita grubego oraz w szpiczaku mnogim i ostrej białaczce limfoblastycznej [8].

Reaktywne formy tlenu w terapiach przeciwnowotworowych.

Równowagę oksydacyjno-redukcyjną komórek nowotworowych można zakłócić przynajmniej na dwa sposoby. Pierwszy z nich wykorzystuje fakt, że komórki nowotworowe wykazują wzmożoną produkcję ROS w stosunku do komórek zdrowych. Dlatego podejmuje się próby zahamowania aktywności jednego z głównych układów antyoksydacyjnych komórek: układu glutationu, układu tioredoksyny lub dysmutazy ponadtlenkowej. Dodatkową zaletą takiego podejścia jest uwrażliwienie komórek opornych na działanie leków, których mechanizm działania opiera się na indukcji stresu oksydacyjnego [9]. Z tego powodu zostało opracowanych i przetestowanych w badaniach przedklinicznych i klinicznych wiele inhibitorów układów redoks w tym również układu tioredoksyny [10, 11, 12]. W trakcie moich studiów doktoranckich w ścisłej współpracy z chemikami z Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk przetestowałam wiele związków chemicznych w poszukiwaniu nowego inhibitora układu tioredoksyny. Najbardziej obiecujący okazał się związek o nazwie SK053, a mechanizm działania tego związku oraz innych inhibitorów układu tioredoksyny był jednym z obszarów moich badań także w czasie stażu podoktorskiego [13].

Terapia fotodynamiczna

Innym podejściem stosowanym w terapiach prooksydacyjnych nowotworów jest indukcja masywnego stresu oksydacyjnego. Podczas terapii fotodynamicznej (ang. photodynamic therapy ,PDT), pod wpływem światła związek chemiczny reaguje z tlenem cząsteczkowym i powoduje powstanie ROS, w stężeniach toksycznych dla komórek nowotworowych [14]. Terapia fotodynamiczna jest wykorzystywana w leczeniu pacjentów w dermatologii, okulistyce oraz w onkologii. PDT wymaga podania fotouczulacza, który ma zdolność do gromadzenia się w wysokim stężeniu w tkance zmienionej nowotworowo.

Następnie zmiana nowotworowa jest naświetlana światłem o określonej długości fali, powodując aktywację fotouczulacza i powstanie toksycznych dla komórek ROS. PDT powoduje także uszkodzenie naczyń krwionośnych oraz powstanie stanu zapalnego. Wielokrotnie wykazano, że stres oksydacyjny, indukowany przez PDT, jest związany z wydzielaniem mediatorów prozapalnych oraz z zaangażowaniem i aktywacją komponentów nieswoistej oraz swoistej odpowiedzi immunologicznej. W naszych pracach jak również pracach innych grup potwierdzono, że PDT powoduje powstanie na komórkach nowotworowych struktur molekularnych związanych z sygnałem niebezpieczeństwa (ang. danger-associated molecular patterns, DAMPs), co w szczególnych przypadkach może doprowadzić do aktywacji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej i zlikwidowania nowotworu [15, 16, 17]. Niemniej, PDT równolegle z rozwojem zapalenia i odpowiedzi przeciwnowotworowej indukuje również mechanizmy immunosupresyjne [18]. Wykazano, że w mysich modelach PDT zwiększa odsetek limfocytów regulatorowych, które wydzielają immunosupresyjne cytokiny takie jak interleukina 10 czy transformujący czynnik wzrostu beta 1 [19]. Mechanizmy hamujące odpowiedź immunologiczną, indukowane przez PDT są słabo opisane i wymagają większej uwagi. Dodatkowo, przebudowanie struktur mikrośrodowiska guza, zachodzące pod wpływem stresu oksydacyjnego, może mieć również znaczenie dla zrozumienia mechanizmów aktywacji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej.

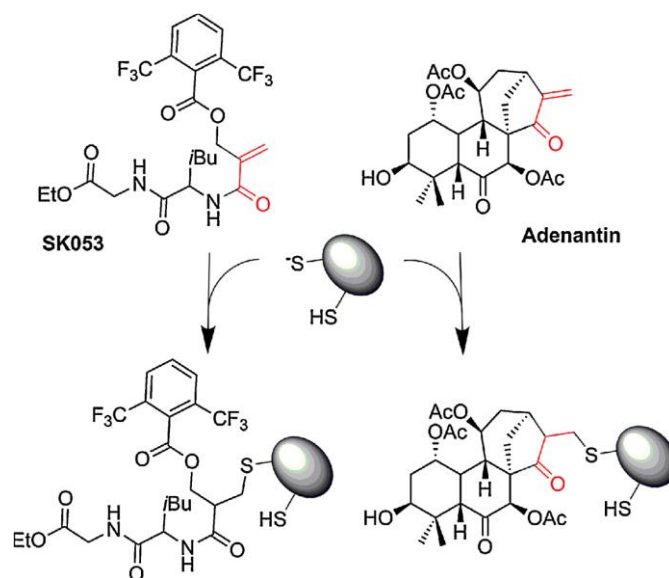
Główne cele prowadzonych badań:

- A. Ocena selektywności nowych inhibitorów tioredoksyny. Zidentyfikowanie nowych celów terapeutycznych dla adenantyny i SK053 oraz ich wpływu na mechanizm działania inhibitorów (publikacje: 1 i 2).
- B. Zbadanie jak stres oksydacyjny, indukowany przez PDT, wpływa na mikrośrodowisko guza. Zidentyfikowanie i próba zahamowania mechanizmów immunosupresyjnych, aktywowanych PDT (publikacje: 3 i 4).

- A. Ocena selektywności nowych inhibitorów tioredoksyny. Zidentyfikowanie nowych celów terapeutycznych dla adenantyny i SK053 oraz ich wpływu na mechanizm działania inhibitorów (publikacje: 1 i 2).

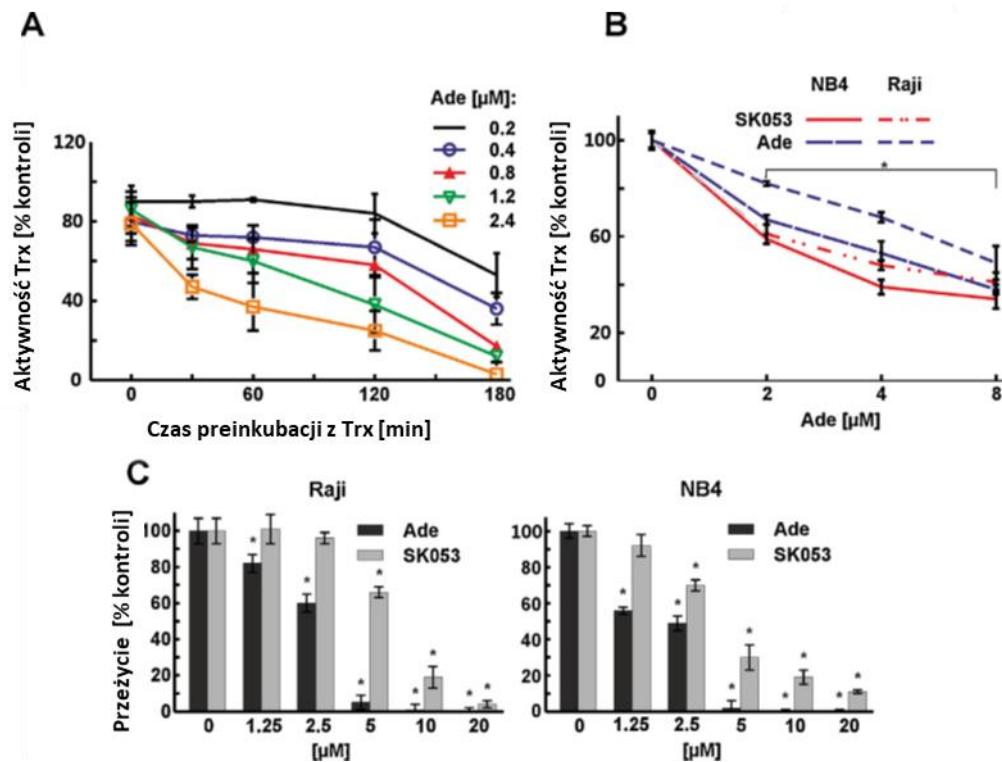
Adenatyna po raz pierwszy została opisana jako inhibitor peroksyredoksyn, indukujący różnicowanie komórek ostrej białaczki szpikowej [20]. Dodatkowo, wykazano, że adenantyna poprzez zahamowanie szlaków sygnałowych zależnych od NF- κ B, hamuje rozwój stwardnienia rozsianego w mysim modelu tej choroby [21].

Adenantyna, podobnie jak SK053 posiada grupy funkcyjne umożliwiające nukleofilowy atak cysteiny, znajdującej się w centrum aktywnym enzymu, na inhibitor. Zachodzi wówczas reakcja addycji do wiązania podwójnego inhibitora (Rycina 1).



Rycina 1. Struktura chemiczna oraz mechanizm działania SK053 oraz adenantyny. Oba inhibitory posiadają aktywne podwójne wiązanie (zaznaczone w kolorze czerwonym), które reaguje z cysteinami centrum aktywnego enzymów [22].

Dlatego też, celem badań było sprawdzenie, czy mechanizm działania adenantyny umożliwia zhamowanie aktywności nie tylko opisanych peroksyredoksyn, ale również białek z rodziny tioredoksyny. W tym celu zastosowano reakcje enzymatyczne, w których porównano efektywność hamowania aktywności tioredoksyn przez adenantynę i SK053. Zbadano również działanie cytostatyczne/cytotoksyczne związków w modelach ostrej białaczki promielocytowej (NB4) oraz chłoniaka Burkitta (Raji) (Rycina 2.).



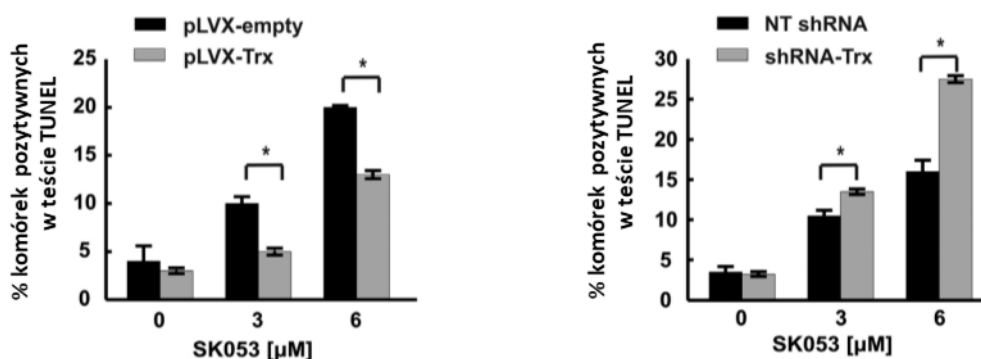
Rycina 2. Adenantyna (Ade) hamuje aktywność rekombinowanej tioredoksy (Trx) (A) oraz tioredoksy wewnątrzkomórkowej po 4 godzinach inkubacji z komórkami linii nowotworowej Raji oraz NB4 (B). Działanie cytostatyczne/cytotoksyczne adenantyny oraz SK053 badane testem MTT po 24 godzinach inkubacji (C). * $P < 0.05$ [22].

Uzyskane wyniki wskazują, że adenantyna jest efektywnym i nieodwracalnym inhibitorem tioredoksy. Ponadto zaobserwowano, że adenantyna hamuje nie tylko rekombinowaną tioredoksynę ale także tioredoksynę wewnątrzkomórkową, w obu wykorzystanych w badaniach liniach komórek nowotworowych NB4 oraz Raji. Adenantyna wykazuje również zależne od zastosowanego stężenia, działanie cytostatyczne/cytotoksyczne, silniejsze niż SK053.

Dodatkowo, w kolejnych doświadczeniach opartych na reakcjach enzymatycznych wykazano, że adenantyna hamuje również aktywność innego białka z rodziny tioredoksy: izomerazy dwusiarczkowej białek (ang. protein disulfide isomerase, PDI). Jedną z ważniejszych funkcji PDI jest udział w procesie fałdowania i składania białek w siateczce śródplazmatycznej [23]. Zahamowanie działania PDI może powodować zakłócenie procesu dojrzewania białek i wywołać stan opisywany jako stres siateczki śródplazmatycznej. Natomiast wzmożony lub przedłużający się w czasie stres siateczki śródplazmatycznej,

może być przyczyną śmierci komórki na drodze apoptozy [24]. Biorąc pod uwagę podobieństwo w budowie adenantyny i SK053 oraz fakt, że w poprzednich badaniach zaobserwowaliśmy, że SK053 również wpływa na ekspresję/fosforylację białek związanych z siateczką śródplazmatyczną, wróciliśmy ponownie do badań nad mechanizmem działania SK053. Rozszerzając badania prowadzone w czasie studiów doktoranckich zaproponowałam nowe modele, które pozwoliły dokładniej wyjaśnić mechanizm działania SK053. Apoptoza indukowana stresem siateczki śródplazmatycznej jest związana ze wzrostem ekspresji genu kodującego czynnika transkrypcyjnego CHOP (ang. C/EBP homologous protein, CHOP) oraz aktywacją kaspazy 12 [25]. Dlatego w kolejnych doświadczeniach wykorzystano model modyfikowanych mysich fibroblastów pozbawionych ekspresji CHOP (knock-out CHOP^{-/-} MEFs) oraz kontrolnych, prawidłowych komórek (WT MEFs). Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że komórki CHOP^{-/-} MEFs były odporne na działanie SK053. CHOP okazał się więc kluczowym czynnikiem, odpowiedzialnym za, zależną od kaspazy 12, apoptozę komórek nowotworowych poddanych działaniu SK053.

Następnie, za pomocą transdukcji lentiwirusowej, zmodyfikowano również komórki linii nowotworowej Raji zwiększając (pLVX-Trx) lub zmniejszając (shRNA-Trx) ekspresję genu kodującego tioredoksynę. Zaobserwowano, że tioredoksyna chroni komórki nowotworowe przed apoptozą indukowaną SK053 (Rycina 3). Uzyskane wyniki sugerują, że podobnie jak w wypadku adenantyny, układ tioredoksyny nie jest jednym celem dla SK053.



Rycina 3. Wrażliwość komórek Raji na SK053 zależy od ilości tioredoksyny (A) Procent komórek apoptotycznych, z nadekspresją tioredoksyny (pLVX-Trx), komórek ze zmniejszoną ekspresją tioredoksyny (shRNA-Trx) oraz komórek kontrolnych (pLVX-

empty, NT shRNA) po 24-godzinnej inkubacji z SK053, oceniony metodą TUNEL. *P < 0.05. [26].

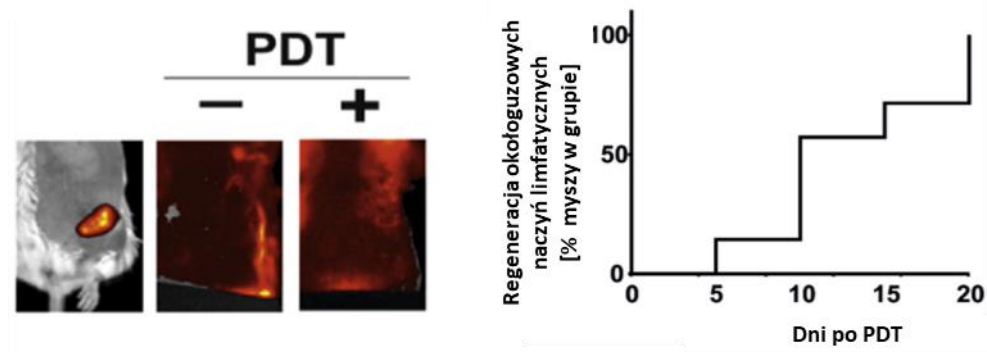
Najważniejsze wnioski części A (publikacja 1 i 2):

1. Adenantyna jest nieselektywnym inhibitorem peroksyredoksyn. Efektywnie hamuje aktywność układu tioredoksyny oraz innych enzymów antyoksydacyjnych, których miejsce aktywne zbudowane jest z cystein, tworzące mostki dwusiarczkowe.
2. Mechanizmy działania SK053 i adenantyny są do siebie bardzo podobne. Dlatego, można wnioskować, że układ tioredoksyny nie jest jedynym celem dla tych inhibitorów. Działanie cytotoksyczne SK053 na komórki nowotworowe wymaga ekspresji CHOP oraz aktywacji kaspazy 12.

- B. Zbadanie jak stres oksydacyjny indukowany przez PDT wpływa na mikrośrodowisko guza. Zidentyfikowanie i próba zahamowania mechanizmów immunosupresyjnych, aktywowanych PDT (publikacje: 3 i 4).

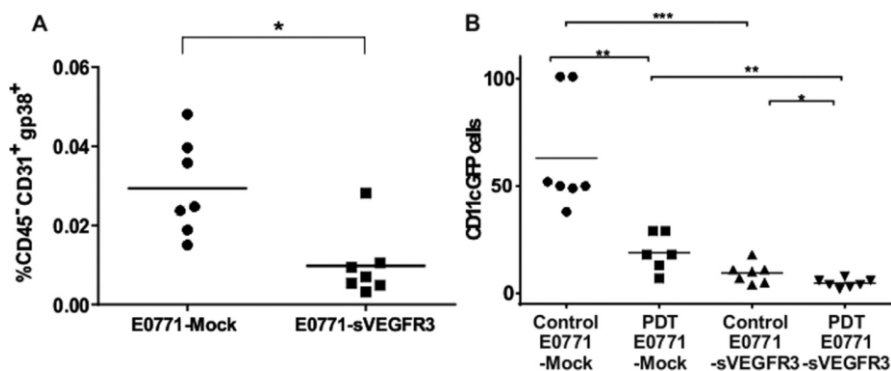
Terapia fotodynamiczna jest kolejną metodą stosowaną w celu zakłócenia równowagi redoks w komórkach nowotworowych. Jednak stres oksydacyjny indukowany przez PDT nie tylko jest toksyczny dla komórek nowotworowych, ale również powoduje reorganizację mikrośrodowiska nowotworu. Początkowo zaobserwowano, że niektóre fotouczulacze np. werteporfina gromadzą się w śródbłonku naczyń krwionośnych, powodując ich uszkodzenie [14]. Jednak nie tylko naczynia krwionośne ulegają zniszczeniu w wyniku działania PDT. PDT wpływa także na działanie naczyń limfatycznych co było przedmiotem naszych badań w czasie mojego stażu podoktorskiego. Badania te prowadzone były we współpracy z prof. Melody Swartz oraz dr Witoldem Kilarskim z École Polytechnique Fédérale de Lausanne, z Szwajcarii. W pierwszej wspólnej publikacji wykorzystaliśmy PDT do selektywnego zamknięcia naczyń limfatycznych skóry myszy [27]. Ciekawą obserwacją było, że w niskich dawkach PDT hamowała przepływ limfy przez naczynia limfatycznie, nie powodując uszkodzeń naczyń krwionośnych.

Naczynia limfatyczne transportują płyny, cytokiny, antygeny oraz komórki układu odpornościowego do węzłów limfatycznych, są więc kluczowe dla rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Jednakże, podobnie jak angiogeneza, limfangiogeneza jest ważna dla wzrostu guza oraz sprzyja tworzeniu przerzutów nowotworowych [28]. Dlatego kontynuowaliśmy badania, by sprawdzić jak zniszczenie okołoguzowych naczyń limfatycznych wpłynie, na indukowaną przez PDT, przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną. W tym celu wykorzystano dwa mysie, ortotopowe modele raka sutka: 4T1 i E0771 oraz werteporfinę jako fotouczulacz. W pierwszych doświadczeniach zaobserwowaliśmy, że PDT powoduje odwracalne uszkodzenie okołoguzowych naczyń limfatycznych, które ulegają procesowi regeneracji w pięć do dwudziestu dni po zastosowaniu terapii (Rycina 4).



Rycina 4. PDT hamuje przepływ limfy (znakowany fluorescencyjnie deks tranem) z guza do pachowego węzła limfatycznego myszy. Przepływ ten jest przywracany począwszy od 5 dnia po PDT (n = 7) [29].

Następnie zmodyfikowano komórki linii E0771 oraz 4T1, wprowadzając do nich wektor kodujący gen rozpuszczalnej formy receptora dla czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego 3 (ang. soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 3, sVEGFR3). sVEGFR3 hamuje powstawanie naczyń limfatycznych w modelach in vivo. Zaobserwowano, że zarówno uszkodzenia naczyń limfatycznych przez PDT jak i wydzielanie sVEGFR3 przez komórki nowotworowe uniemożliwiło transport komórek dendrytycznych z guza do drenujących węzłów limfatycznych (Rycina 5).

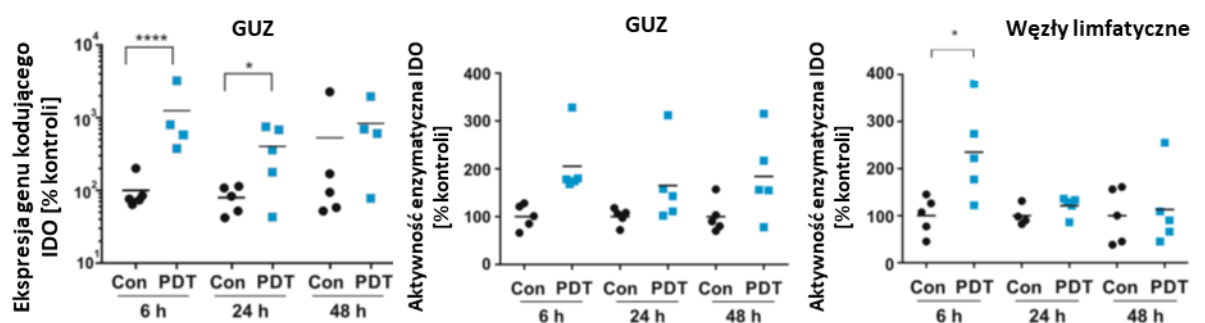


Rycina 5 Wpływ sVEGFR wydzielanego przez komórki nowotworowe (E0771-sVEGFR3) na odsetek komórek śródbłonka naczyń limfatycznych (CD45⁻, CD31⁺, gp38⁺) guza (A) oraz na transport GFP-dodatnich komórek dendrytycznych z guza do węzłów limfatycznych po PDT (B). Wykres przedstawia całkowitą liczbę komórek dendrytycznych GFP-dodatnich, wykrytych w pachwinowym węzłach limfatycznych 48 godzin po podaniu komórek dendrytycznych i 24 godziny po PDT, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 [29].

Ostatecznie okazało się, że ekspresja genu kodującego sVEGFR3 w guzach w obu zastosowanych modelach, zmniejszyła przeciwnowotworowe działanie

terapii fotodynamicznej. Funkcjonalne naczynia limfatyczne są więc niezbędne do działania PDT. Zahamowanie powstawania naczyń limfatycznych guza lub ich zniszczenie uniemożliwia rozwinięcie się skutecznej, przeciwnowotworowej, odpowiedzi immunologicznej po PDT.

Intensywny stres oksydacyjny, powstający w skutek aktywacji fotouczulacza, powoduje silne uszkodzenie tkanek. Zniszczenie guza skutkuje rozwojem zapalenia, które jest jednym z kluczowych zdarzeń dla efektywnego działania PDT. Jednakże, dla utrzymania ważnej dla przeżycia organizmu równowagi, pomiędzy aktywacją a hamowaniem układu odpornościowego, procesom zapalnym zawsze towarzyszą mechanizmy immunosupresyjne. Również w wypadku PDT dochodzi do aktywacji mechanizmów, które mają zapobiegać dalszemu zniszczeniu tkanek przez komponenty układu odpornościowego. W kolejnej publikacji zidentyfikowaliśmy enzym - dioksygenazę 2,3 - indoloaminy - (ang. indoleamine 2,3-dioxygenase,IDO) jako mechanizm immunosupresyjny, indukowany przez PDT. IDO katalizuje reakcję degradacji tryptofanu, który jest niezbędny dla prawidłowej aktywacji i funkcji limfocytów T [30]. Produktem końcowym reakcji są kynureniny, które także hamują działanie limfocytów T oraz dodatkowo powodują polaryzację limfocytów CD4⁺ w komórki regulatorowe. W naszych badaniach, z użyciem mysich modeli raka sutka, zaobserwowaliśmy, że PDT powoduje wzrost zarówno ekspresji genu kodującego IDO jak i wzrost aktywności enzymatycznej IDO (Rycina 6).



Rycina 6. Ekspresja genu kodującego IDO w guzach myszy zaszczepionych ortotopowo komórkami linii E0771 (wykres po lewej) oznaczana za pomocą qPCR w różnych czasach po PDT. Aktywność enzymatyczna IDO w guzach (wykres środkowy) oraz w drenujących guz węzłach limfatycznych (wykres po prawej) w różnych czasach po PDT n = 4–6; *P < 0.05; **P < 0.01 [31].

Wyniki wykazały również, że w guzach powstałych po inokulacji komórek E0771, głównym źródłemIDO są granulocyty ale również monocyty/makrofagi, napływające intensywnie do guza po PDT. Komórki te w doświadczeniach ex vivo silnie hamowały proliferację limfocytów T.

W celu zahamowaniaIDO wykorzystano inhibitor testowany w badaniach klinicznych – epakadostat. Zahamowanie aktywnościIDO zmniejszyło odsetek limfocytów regulatorowych, zwykle zwiększony pod wpływem PDT. Niespodziewanie okazało się również, żeIDO jest jednym z kluczowych mechanizmów chroniących organizm przed nadmierną aktywacją układu odpornościowego po PDT. PDT w połączeniu z epakadostatem spowodowało, zależną od interleukiny 6, silną, toksyczną reakcję w obu zastosowanych modelach raka sutka. Letalność wynikająca z zastosowanej terapii została zniesiona dopiero po zastosowaniu przeciwciał neutralizujących interleukinę 6. Badania te pokazują znaczenieIDO w kontekście opisanej regulacji swoistej odpowiedzi immunologicznej, ale też podkreślają wpływ tego enzymu na nieswoiste komponenty układu odpornościowego. W świetle sukcesów jakie odnoszą immunoterapie w leczeniu pacjentów onkologicznych a także nieudanych prób klinicznych z inhibitoramiIDO, nasze wyniki podkreślają wagę dalszych badań nad zrozumieniem roli katabolizmu tryptofanu, w rozwoju przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej.

Najważniejsze wnioski części B (publikacje 3 i 4):

- ROS indukowane przez PDT powodują uszkodzenia naczyń limfatycznych. Upośledzenie funkcji naczyń limfatycznych uniemożliwia rozwój skutecznej przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej po PDT.
- Stres oksydacyjny, powstający pod wpływem PDT powoduje uszkodzenie tkanek oraz aktywacjęIDO – enzymu o działaniu immunosupresyjnym. ZahamowanieIDO po PDT skutkuje letalną reakcją, wskazując na kluczową rolęIDO w zachowaniu równowagi pomiędzy aktywacją a hamowaniem odpowiedzi immunologicznej po PDT.

Wykaz literatury

1. Finkel T, Signal transduction by reactive oxygen species *J Cell Biol.* 2011 Jul 11; 194(1): 7–15.
2. Aggarwal V, et al. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements, *Biomolecules.* 2019 Nov; 9(11): 735.
3. Kaimul AM et al., Thioredoxin and Thioredoxin-Binding protein-2 in Cancer and Metabolic Syndrome *Free Radic Biol Med* 2007 Sep 15;43(6):861-8.
4. Kekulandara DN et al., Redox-Inactive Peptide Disrupting Trx1-Ask1 Interaction for Selective Activation of Stress Signaling, *Biochemistry.* 2018 Feb 6; 57(5): 772–780.
5. Mitchell DA, Marletta MA, Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine *Nature Chemical Biology* volume 1, pages154–158(2005)
6. King BC, et al. Truncated and full-length thioredoxin-1 have opposing activating and inhibitory properties for human complement with relevance to endothelial surfaces *J Immunol.* 2012 Apr 15;188(8):4103-12.
7. Farina AR, et al. Thioredoxin alters the matrix metalloproteinase/tissue Inhibitors of metalloproteinase balance and stimulates human SK-N-SH neuroblastoma cell invasion *Eur J Biochem.* 2001 Jan;268(2):405-13.
8. Hanschmann E, et al. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling, *Antioxid Redox Signal.* 2013 Nov 1; 19(13): 1539–1605
9. Liu J, et al., Inhibition of Thioredoxin Reductase by Auranofin Induces Apoptosis in Adriamycin-Resistant Human K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells *Pharmazie,* 2011 Jun;66(6):440-4.
10. Urig S, et al. On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* 2006. PMID: 17056271
11. Baker AF, et al. The antitumor thioredoxin-1 inhibitor PX-12 (1-methylpropyl 2-imidazolyl Disulfide) decreases thioredoxin-1 and VEGF levels in cancer patient plasma *J Lab Clin Med.* 2006 Feb;147(2):83-90
12. Graczyk-Jarzynka A, et al. New insights into redox homeostasis as a therapeutic target in B-cell malignancies, *Curr Opin Hematol* 2017 Jul;24(4):393-401.
13. Kłossowski S, et al Studies toward novel peptidomimetic inhibitors of thioredoxin-thioredoxin reductase system. *J Med Chem.* 2012 *J Med Chem.* 2012 Jan 12;55(1):55-67.
14. Agostinis P, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011 Jul-Aug;61(4):250-81.
15. Garg AD, et al. DAMPs and PDT-mediated photo-oxidative stress: exploring the unknown. *Photochem Photobiol Sci.* 2011 May;10(5):670-80.
16. Castano AP, et al. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer.* 2006 Jul;6(7):535-45.
17. Wachowska M, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine potentiates antitumour immune response induced by photodynamic therapy. *Eur J Cancer.* 2014 May;50(7):1370-81.
18. Mroz P, Hamblin MR. The immunosuppressive side of PDT. *Photochem Photobiol Sci.* 2011 May;10(5):751-8.
19. Reginato E, et al Photodynamic Therapy Plus Regulatory T-cell Depletion Produces Immunity Against a Mouse Tumour That Expresses a Self-Antigen *Br J Cancer.* 2013 Oct 15;109(8):2167-74.
20. Liu C. X., et al.. Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. 2012 *Nat. Chem. Biol.* 8: 486–493
21. Qian-Qian Y, et al. Preventive and therapeutic effects of adenanthin on experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting NF- κ B signaling *J Immunol* 2013, 191 (5) 2115-2125

22. Muchowicz A, et al. Adenanthin targets proteins involved in the regulation of disulphide bonds. *Biochem Pharmacol.* 2014 May 15;89(2):210-6.
23. Grek C,D, Townsend M. Protein disulfide isomerase superfamily in disease and the regulation of apoptosis. *Endoplasmic Reticulum Stress Dis.* 2014 Jan; 1(1): 4–17.
24. Radogna F, et al. Stress-induced cellular responses in immunogenic cell death: Implications for cancer immunotherapy. *Biochem Pharmacol.* 2018 Jul;153:12-23
25. Oyadomari S, et al. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress *Cell Death Differ.* 2004 Apr;11(4):381-9.
26. Muchowicz A, et. al, SK053 triggers tumor cells apoptosis by oxidative stress-mediated endoplasmic reticulum stress. *Biochem Pharmacol.* 2015 Feb 15;93(4):418 27
27. Kilarski WW, Optimization and regeneration kinetics of lymphatic-specific photodynamic therapy in the mouse dermis *Angiogenesis.* 2014 Apr;17(2):347-57.
28. Stachura J, et al. The dual role of tumor lymphatic vessels in dissemination of metastases and immune response development. *Oncoimmunology.* 2016 May 13;5(7):e1182278.
29. Muchowicz A, et al. Inhibition of lymphangiogenesis impairs antitumour effects of photodynamic therapy and checkpoint inhibitors in mice. *Eur J Cancer.* 2017 Sep;83:19-27
30. Lanser L, et al. Inflammation-Induced Tryptophan Breakdown is Related With Anemia, Fatigue, and Depression in Cancer. *Front Immunol.* 2020 Feb 21;11:249.
31. Wachowska M et al. Inhibition of IDO leads to IL-6-dependent systemic inflammation in mice when combined with photodynamic therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2020 Jun;69(6):1101-1112.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną, realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

A. Podsumowanie dorobku naukowego

Liczba publikacji: 35 prac w tym 28 oryginalnych i 7 prac przeglądowych

Sumaryczny impact factor: 174,895

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: 1562

Liczba cytowań (bez autocytacji, Scopus): 666

Indeks H (Scopus) 16

B. Osiągnięcia w trakcie pracy naukowej poza zgłaszanym osiągnięciem

Przed rozpoczęciem studiów doktoranckich:

Jeszcze jako studentka biotechnologii byłam zaangażowana w projekty związane z PDT. Początkowo byłam odpowiedzialna za badanie cytostatycznego/cytotoksycznego działania terapii łączonej PDT z cyglitazonem (Mrówka P. et al. Int J Oncol. 2008). Następnie badałam wpływ cynkowej protoporfiryny IX na działanie PDT (Nowis D et. al. BMC Cancer. 2008). Wykonywałam także doświadczenia, badając działanie kombinacji inhibitorów proteasomu i PDT, które stanowiły treść mojej pracy magisterskiej oraz publikacji w czasopiśmie Cancer Research, gdzie znalazłam się w grupie głównych autorów (Szokalska A, et al Cancer Res. 2009).

Okres studiów doktoranckich

Głównym tematem moich studiów doktoranckich było poszukiwanie nowych inhibitorów tioredoksyny oraz ich wykorzystanie w terapii łączonej z PDT. Projekt był prowadzony we współpracy z grupą prof. Ryszarda Ostaszewskiego z Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk i zakończył się międzynarodowym zgłoszeniem patentowym (numer 306259) oraz publikacją gdzie wraz z dr. Szymonem Kłossowskim jesteśmy równorzędnymi, pierwszymi autorami pracy (Kłossowski S and Muchowicz A, et al J Med Chem. 2012). Poza głównym projektem pracowałam także nad

badaniem regulacji ekspresji genu kodującego CD20 w modelach białaczkowych (Winiarska M et al. J Biol Chem. 2012).

Staż podoktorski

W trakcie stażu podoktorskiego początkowo zaangażowana byłam w projekt finansowany z programu wspierającego polsko-szwajcarską współpracę naukową (Novel therapeutic strategies to target tumor lymphangiogenesis, Polish-Swiss Research Programme, OPI, PSPB-057/2010), gdzie badałam wpływ PDT na naczynia limfatyczne. Oprócz tego badałam skuteczność terapii łączonej: nowych chelatorów żelaza i PDT w wyniku czego jestem współautorem dwóch prac oryginalnych: (Mrozek-Wilczkiewicz A et al. ACS Med Chem Lett. 2014; Serda M et al. PLoS One. 2014). Następnie zaangażowałam się w badanie znaczenia stanu równowagi redoks komórek nowotworowych w różnych modelach białaczek. Badałam działanie kombinacji inhibitorów układów redoks: adenantyny, auranofiny i SK053 (Graczyk-Jarzynka A, et al. Curr Opin Hematol. 2017; Chlebowska-Tuz J et al. Haematologica. 2018; Bajor M, et al. Br J Cancer, 2018; Graczyk-Jarzynka A, et al. Redox Biol. 2019, Fidyk K, et al. Mol Oncol. 2019). Byłam także zaangażowana w projekt dotyczący inhibitorów deacetylazy histonów (HDAC) w kombinacji z rituksymabem. W badaniach tych zajmowałam się oceną skuteczności wymienionej kombinacji leków w modelach in vivo (Bobrowicz M, et al. Blood. 2017).

C. Krajowe współprace naukowe:

- w obrębie Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego: byłam zaangażowana w badanie znaczenia mutacji genu NARP, prowadzone w Zakładzie Genetyki Medycznej (Truszkowska G, et al. Sci Rep. 2017). Z zespołem z Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego prowadzę badania dotyczące funkcji neutrofilów (Manda-Handzlik A, et al. Cell Mol Life Sci. 2019).

- współpracuję również z Instytutem Hematologii i Transfuzjologii w ramach aktualnie prowadzonego projektu, dotyczącego badania roli limfocytów regulatorowych w przewlekłej białaczce limfocytowej.

D. Międzynarodowe współprace naukowe:

- w 2009 roku otrzymałam stypendium ICRETT, sponsorowane przez fundację UICC (Union for International Cancer Control) i spędziłam 3 miesiące w Department of Dermatology, Harvard Medical School, Wellman Center for Photomedicine. Badałam rozwój odpowiedzi immunologicznej po PDT, jak również zajmowałam się optymalizacją działania nowych fotouczulaczy. Współpraca ta zaowocowała dwoma publikacjami oryginalnymi w czasie studiów doktoranckich (Mroz P, et al. PLoS One. 2010 Dec; Mroz P, et al FASEB J. 2010) oraz kolejnymi dwoma w czasie trwania stażu podoktorskiego (Mroz P et al Cancer Res. 2013, Wachowska M, et al. Eur J Cancer. 2014)
- kolejny, 2-miesięczny staż odbyłam w Swiss Federal Institute of Technology (EPFL) w Lozannie w Szwajcarii. Nawiązana współpraca jest wciąż rozwijana i zaowocowała dotychczas trzema oryginalnymi publikacjami (Kilarski WW et al. Angiogenesis. 2014; Wachowska M et al Photodiagnosis Photodyn Ther. 2016; Muchowicz A, et al Eur J Cancer. 2017) oraz jedną pracą poglądową, której jestem autorem korespondującym (Stachura J, et al. Oncoimmunology. 2016).
- w 2014 roku we współpracy z grupą prof. Patricii Agostinis z Leuven Center for Cancer Biology z Belgii badałam rozwój przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej po szczepionce, powstałej z zastosowaniem PDT i melfalanu (Dudek-Perić AM et al Cancer Res. 2015).
- w 2018 roku spędziłam trzy tygodnie w International Centre for Genetic Engineering Biotechnology, Trieste we Włoszech, prowadząc badania, dotyczące roli limfocytów regulatorowych w przewlekłej białaczce limfocytowej (współpraca w ramach kierowanego przeze mnie grantu „OPUS”).

E. Uzyskane finansowanie na badania naukowe – główne projekty (kierownik projektu)

- 2019 - Zbadanie roli limfocytów regulatorowych i 2,3-dioksygenazy indoloaminy w progresji i kształtowaniu immunosupresyjnego

mikrośrodowiska przewlekłej białaczki limfocytowej 2018/29/B/NZ6/01962
OPUS, NCN

- 2015 - Rola enzymu 2,3-dioksygenazy indoloaminy w indukcji swoistej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym poddanym działaniu terapii fotodynamicznej, 2014/13/D/NZ6/01080, SONATA, NCN
- 2011 - Badanie przeciwnowotworowego działania nowych inhibitorów tioredoksyny oraz optymalizacja ich chemicznej struktury N N405 127640, MNiSW

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

- Od 2009 jestem zaangażowana w prowadzenie zajęć z przedmiotu „Immunologia” Początkowo prowadziłam seminaria dla studentów Wydziału Farmaceutycznego, w kolejnych latach również dla studentów Wydziału Lekarskiego oraz English Division Faculty. Prowadzone przez mnie zajęcia są zawsze wysoko oceniane przez studentów w ankietach studenckich.

- byłam promotorem:

Praca inżynierska:

Joanna Stachura, 2014 Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
“Badanie aktywności inhibitorów tioredoksyny oraz mechanizmów ich działania”

Praca magisterska:

Joanna Stachura, 2015 Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
“Badanie oddziaływania rozpuszczalnej formy receptora 3 dla śródbłonkowego czynnika wzrostu ze śródbłonkowym czynnikiem wzrostu -C-.

- byłam promotorem pomocniczym:

Praca magisterska:

Patrycja Łuszczuk, 2013, Warszawski Uniwersytet Medyczny

„Wpływ chelatora żelaza Dp44mT na cytotoksyczne działanie terapii fotodynamicznej.”

- jestem aktualnie promotorem pracy magisterskiej inż. Marty Śledź, której tematyka dotyczy badania fenotypu ludzkich limfocytów regulatorowych w przewlekłej białaczce limfocytowej

- od studiów doktoranckich jestem opiekunem studentów Koła Naukowego działającego przy Zakładzie Immunologii

- wykonuję recenzję dla czasopism naukowych takich jak: International Journal of Cancer, International Journal of Immunology, Pharmaceutics, Experimental Hematology

- jestem współautorem rozdziału w podręczniku „Immunologia” z 2012 oraz 2017 roku

7. Stypendia i nagrody

- 2018 Nagroda Specjalna Rektora Warszawskiego Uniwersytetu medycznego dla wyróżniających się młodych naukowców (poniżej 35 roku życia)
- 2015 Stypendium Ministra Szkolnictwa Wyższego dla Wybitnych Młodych Naukowców
- 2012 L'Oréal-UNESCO Awards for Women in Science
- 2010 START Fundacja na rzecz Nauki Polskiej
- 2009 ICRETT - International Cancer Fellowship Union Against Cancer, Boston, USA
- 2007 Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Studentów