

AUTOREFERAT



dr n. med. Małgorzata Bobrowicz

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 2024

1. DANE OSOBOWE

Małgorzata Bobrowicz (nazwisko panieńskie: Wańczyk)
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

2. POSIADANE DYPLOMY

2020: dyplom lekarza

I Wydział Lekarski Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

2017: nadanie stopnia doktora nauk medycznych

I Wydział Lekarski Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Tytuł rozprawy: *Wpływ inhibitorów deacetylaz histonów na regulację cząsteczki CD20 w komórkach nowotworowych*

Promotor: prof. dr. hab. n. med. Jakub Gołąb

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Magdalena Winiarska

Recenzenci: prof. dr hab. n. med. Krzysztof Giannopoulos, prof. dr hab. n. med. Przemysław Juszczyński

Rozprawa uzyskała wyróżnienie Rady Naukowej I Wydziału Lekarskiego oraz została wyróżniona

Najwyższą Nagrodą Naukową Prezesa Rady Ministrów za wybitną rozprawę doktorską

2012: dyplom magistra farmacji

Wydział Farmaceutyczny Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Tytuł pracy magisterskiej: *Badanie wpływu terapii fotodynamicznej oraz przeciwciał monoklonalnych na fagocytozę komórek nowotworowych*

Promotor: prof. dr. hab. n. med. Jakub Gołąb

2008: dyplom magistra filologii włoskiej

Wydział Neofilologii Uniwersytetu Warszawskiego

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU

07/2024 – obecnie: Asystent badawczo-dydaktyczny

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Warszawskiego
Uniwersytetu Medycznego

- 01/2022 – obecnie: Lekarz rezydent w trakcie specjalizacji z endokrynologii
Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii, Uniwersyteckie Centrum
Kliniczne WUM
- 02/2017- 04/2024: Adiunkt w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
- 10/2012 – 10/2016: Doktorantka w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu
Medycznego
Studia doktoranckie w ramach Studium Medycyny Molekularnej
- 01/2010-12/2010: Stypendystka w programie MISTRZ Fundacji Nauki Polskiej, beneficjent
subsydium profesorskiego: prof. Jakub Gołąb
- 10/2009-06/2012: Magistrantka w Zakładzie Immunologii WUM, grupa dr Magdaleny
Winiarskiej

ZAGRANICZNE POBYTY NAUKOWE

- 07-10/2018: Staż naukowy w ramach stypendium EMBO Short-term Fellowship, Klinika
Dermatologii, Laboratorium Chłoniaków Skóry, Uniwersytecki Szpital
w Zurychu, Szwajcaria
Opiekun naukowy: prof. Emmanuella Guenova
- 07-09/2017: Staż naukowy w ramach programu 692180-STREAM-H2020-TWINN-2015,
Program UE Horizon 2020, Międzynarodowe Centrum Inżynierii Genetycznej
i Biotechnologii w Trieście, Laboratorium Hematologii Molekularnej, Triest,
Włochy
Opiekun naukowy: prof. Dimitar Efremov
- 07-09/2016: Staż naukowy w ramach stypendium Narodowego Centrum Nauki (NCN)
Etiuda, Klaster Doskonałości Badań nad Starzeniem, Laboratorium Biologii
Molekularnej i Immunologii Przewlekłej Białaczki Limfocytowej, Uniwersytet
w Kolonii, Niemcy
Opiekun naukowy: dr Lukas Frenzel
- 07-09/2015: Staż naukowy w ramach programu unijnego FP7-REGPOT-2012-
CT2012316254, Klaster Doskonałości Badań nad Starzeniem, Laboratorium
Biologii Molekularnej i Immunologii Przewlekłej Białaczki Limfocytowej,
Uniwersytet w Kolonii, Niemcy
Opiekun naukowy: dr Lukas Frenzel

09-12/2013: Staż naukowy w ramach programu unijnego FP7-REGPOT-2012-CT2012316254, Instytut Paoli Calmettes, Laboratorium Immunologii i Nowotworów, Uniwersytet Aix-Marseille Université, Marsylia, Francja
Opiekun naukowy: dr Cyril Fauriat

4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.).

Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO I WYKAZ PUBLIKACJI

Tytuł osiągnięcia: „**Poszukiwanie nowych strategii leczenia chłoniaków**”

Prace oryginalne:

1. Bobrowicz M, Dwojak M, Pyrzyńska B, Stachura J, Muchowicz A, Berthel E, Dalla-Venezia N, Kozikowski M, Kłopotowska M, Miazek N, Zapala P, Domagała A, Bojarczuk K, Malenda A, Barankiewicz J, Graczyk-Jarzynka A, et al. HDAC6 inhibition upregulates CD20 levels and increases the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Blood*. 2017;130(14):1628-1638

IF 2017: **15,132**

Mój wkład w powstanie powyższej publikacji polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części eksperymentów technikami cytometrii przepływowej, Western blotting, qRT-PCR, modyfikacjach genetycznych linii komórkowych, izolacji polisomów, zbadania endocytozy białka CD20, oceny syntezy CD20 de novo z wykorzystaniem metody Click-it, przeprowadzenia analizy wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu i redagowaniu artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów.

2. Bobrowicz M, Ślusarczyk A, Domagała J, Dwojak M, Ignatova D, Chang Y, Iselin C, Miazek-Zapala N, Marhelava K, Guenova E, Winiarska M. Selective inhibition of HDAC6 sensitizes cutaneous T-cell lymphoma to PI3K inhibitors. *Oncology Letters*. 2020;20(1):533-540

IF 2020: **2,967**

Mój wkład w powstanie powyższej publikacji polegał na nawiązaniu międzyośrodkowej współpracy badawczej z instytucją w Szwajcarii, postawieniu hipotezy badawczej, wykonaniu większości

eksperymentów, przeprowadzeniu analizy wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu i redagowaniu artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów.

3. Iselin C, Chang Y, Schlaepfer T, Fassnacht C, Dimitriou F, Nägeli M, Pascolo S, Hoetzenecker W, **Bobrowicz M [autor korespondujący]***, Guenova E*. Enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with treatment response to extracorporeal photopheresis in Sézary syndrome. *OncolImmunology*. 2021;10(1):1-7

IF 2021: **7,723**

*równorzędny udział

Mój wkład w powstanie powyższej publikacji polegał na współtworzeniu koncepcji badawczej, opracowaniu metodologii, wykonaniu wraz z zespołem eksperymentów oceniających cytotoksyczność komórkową za pomocą cytometrii przepływowej, opracowaniu pierwszej wersji manuskryptu oraz redagowaniu artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów.

4. **Bobrowicz M***, Kusowska A*, Krawczyk M, Zhylko A, Forcados C, Ślusarczyk A, Barankiewicz J, Domagała J, Kubacz M, Šmída M, Dostalova L, Marhelava K, Fidyk K, Pępek M, Baranowska I, Szumera-Cieckiewicz A, Inderberg E, Wälchli S, Granica M, Graczyk-Jarzynka A, Majchrzak M, Poreba M, Gehlert C, Peipp M, Firczuk M, Prochorec-Sobieszek M, Winiarska M. CD20 expression regulates CD37 levels in B-cell lymphoma - implications for immunotherapies. *OncolImmunology*. 2024;13(1):1-12

*równorzędny pierwszy autor

IF 2024: **6,500**

Mój wkład w powstanie powyższej publikacji polegał na pozyskaniu finansowania w ramach grantu Sonata NCN, postawieniu hipotezy badawczej, opracowaniu metodologii, nawiązaniu współprac międzyośrodkowych umożliwiających realizację projektu, wykonaniu części eksperymentów in vitro (analiza ekspresji antygenów na powierzchni komórek opornych na rytuksymab oraz komórek z wyciszeniem genu dla CD20 metodą cytometrii przepływowej, analiza cytotoksyczności przeciwciał anti-CD37 w powyższych modelach metodą cytometrii przepływowej, ocena ekspresji CD37 metodą Western blotting w lizatach komórek z wyciszoną ekspresją CD20, zbadanie kolokalizacji białek CD20 i CD37 metodą PLA), nadzorowaniu pracy zespołu, stworzeniu ostatecznej wersji manuskryptu i redagowaniu artykułu zgodnie z sugestiami recenzentów.

Prace przeglądowe:

5. **Bobrowicz M**, Kubacz M, Ślusarczyk A, Winiarska M. CD37 in B Cell Derived Tumors-More than Just a Docking Point for Monoclonal Antibodies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(24):1-16

IF 2020: **5,924**

Mój wkład w powstanie powyższej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu i przeprowadzeniu analizy piśmiennictwa, zaplanowaniu rycin, nadzorowaniu pracy zespołu, przygotowaniu manuskryptu i jego modyfikacji zgodnie z sugestiami recenzentów.

6. Miązek-Zapała N, Ślusarczyk A, Kusowska A, Zapała P, Kubacz M, Winiarska M, **Bobrowicz M [autor korespondujący]**. The “Magic Bullet” Is Here? Cell-Based Immunotherapies for Hematological Malignancies in the Twilight of the Chemotherapy Era. *Cells*. 2021;10(6):1-23

IF 2021: **7,666**

Mój wkład w powstanie powyższej publikacji polegał na współdziałaniu w opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu i przeprowadzeniu analizy piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu wraz z zespołem i jego modyfikacji zgodnie z sugestiami recenzentów.

Sumaryczny Impact Factor cyklu publikacji: **45,912**

- w tym prace oryginalne: **32,322**

4.2. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

4.2.1. Wprowadzenie

Nowotwory, obok schorzeń układu krążenia, należą do najczęstszych przyczyn zgonów. W związku z tym, jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny jest opracowanie skutecznych, a zarazem bezpiecznych terapii przeciwnowotworowych. Chłoniaki, które znajdują się w pierwszej dziesiątce najczęściej diagnozowanych chorób nowotworowych, stanowią heterogenną grupę nowotworów wywodzących się z limfocytów. Schemat leczenia zależy od tego, z której linii limfocytów wywodzi się dany podtyp chłoniaka, jak manifestuje się klinicznie i jaki jest stopień zaawansowania choroby. W terapii chłoniaków stosuje się tradycyjne metody leczenia takie jak chemio-, radio- oraz immunoterapia, a także aktywnie poszukuje się nowych, skuteczniejszych form istniejących metod leczenia i dąży do optymalizacji już stosowanych metod.

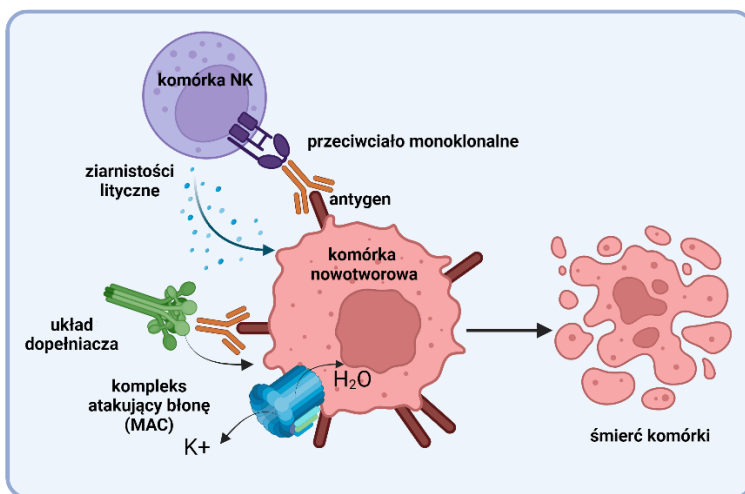
Zastosowanie immunoterapii w leczeniu chłoniaków

W ostatnich dziesięcioleciach coraz ważniejszą rolę w hematologii odgrywa immunoterapia. Immunoterapia jest podejściem terapeutycznym wykorzystującym mechanizmy efektorowe układu odpornościowego do zwalczania nowotworu. Obecnie w terapii chłoniaków wykorzystywane są zarówno metody immunoterapii biernej jak i czynnej, związki swoiście i nieswoiście aktywujące mechanizmy układu odpornościowego. Do najczęściej stosowanych w terapii chłoniaków metod immunoterapii należą obecnie:

A) Przeciwciała monoklonalne

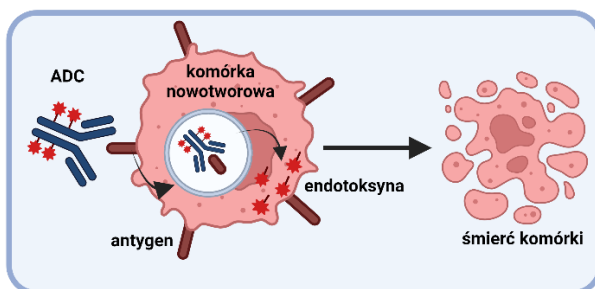
Do tej grupy zaliczamy:

- tzw. nagie przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko antygenom błonowym typowym dla limfocytów np. przeciwciała monoklonalne anty-CD20 - rytuksymab, obinutuzumab; przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi dla chemokin CCR4 - mogamulizumab, przeciwciało anty-CD38 - daratumumab. Przeciwciała te poprzez koniec Fc indukują m.in. cytotoksyczność mediowaną przez układ dopełniacza (ang. *complement-dependent cytotoxicity*, CDC) np. rytuksymab oraz cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (ang. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) np. rytuksymab, mogamulizumab (Ryc. 1).



Rycina 1. Schemat przedstawiający mechanizm cytotoksycznego działania przeciwciał monoklonalnych związany z aktywacją cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza i cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał. Zmodyfikowano na podstawie (Kubacz...Bobrowicz. 2022).

- immunotoksyny, czyli koniugaty przeciwciał z lekami (ang. *antibody-drug conjugates*, ADC) np. polatuzumab wewodotyny skierowany przeciwko cząsteczce CD79b. Przeciwciała te po związaniu się z antygenem ulegają internalizacji i uwalniają we wnętrzu komórki toksynę prowadząc do śmierci komórki nowotworowej (Ryc. 2).

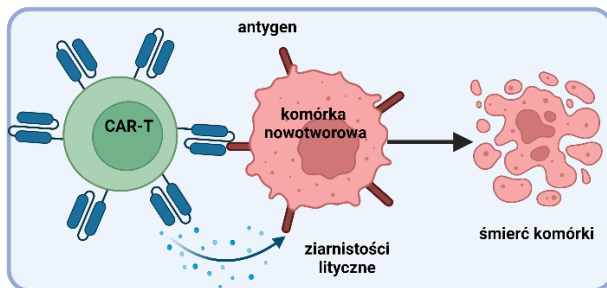


Rycina 2. Schemat przedstawiający mechanizm cytotoksycznego działania immunotoksyn. Zmodyfikowano na podstawie (Kubacz...Bobrowicz. 2022).

- przeciwciała bispecyficzne, które wiążą antygen obecny na powierzchni komórki nowotworowej oraz antygen obecny na powierzchni komórki efektorowej układu odpornościowego np. epkoritamab – przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko CD20 i CD3.
- przeciwciała skierowane przeciwko punktom kontrolnym układu odpornościowego, których działanie polega na odblokowaniu mechanizmów chroniących przed nadmierną aktywacją odpowiedzi immunologicznej np. pembrolizumab skierowany przeciwko cząsteczce PD-1.

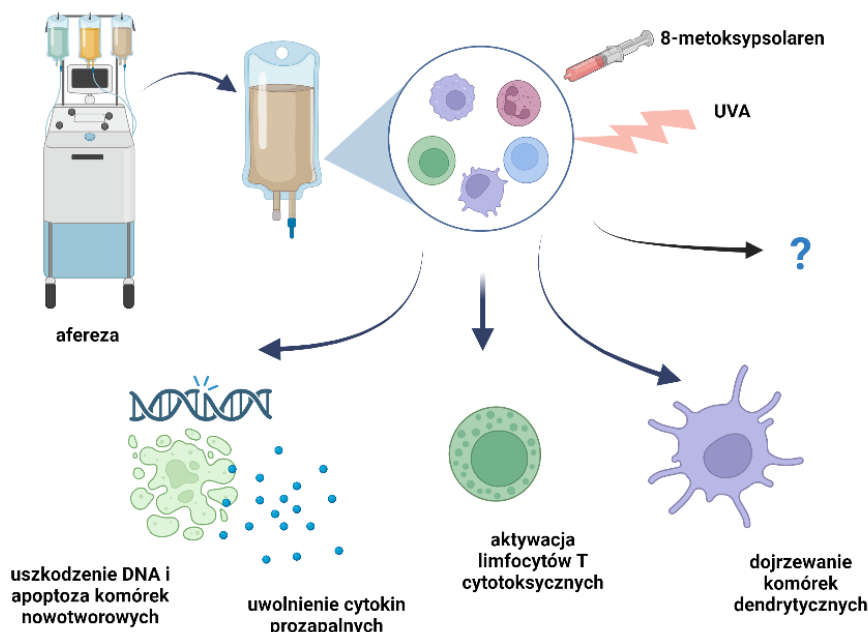
B) Terapie adoptywne polegające na pobraniu od pacjenta komórek układu odpornościowego, ich modyfikacji, a następnie ponownym ich podaniu pacjentowi.

Obecnie najszerzej rozwijaną terapią adoptywną w leczeniu chłoniaków jest zastosowanie limfocytów T z chimerycznymi receptorami antygenowymi (ang. *chimeric antigen receptor, CAR*) np. skierowany przeciwko cząsteczce CD19 konstrukt tisagenlecleucel. Limfocyty CAR T mają zdolność rozpoznawania antygenów i niszczenia komórek nowotworowych bez konieczności wcześniejszego rozpoznawania antygenów prezentowanych przez cząsteczki MHC (Ryc. 3).



Rycina 3. Schemat przedstawiający mechanizm cytotoksycznego działania CAR T. Zmodyfikowano na podstawie (Kubacz...Bobrowicz. 2022)).

Ponadto, od wielu lat w terapii chłoniaków skóry wywodzących się z limfocytów T (ang. *cutaneous T-cell lymphoma, CTCL*) stosowana jest fotoforeza pozaustrojowa (ang. *extracorporeal photopheresis, ECP*). Metoda ta polega na aferezie leukocytów z krwi obwodowej, ich aktywacji za pomocą 8- metoksypsolarenu, a następnie ich ekspozycji na promieniowanie UVA i reinfuzji do krwiobiegu. ECP ma długą tradycję stosowania w leczeniu nie tylko białaczkowej postaci CTCL – zespołu Sézary’ego (ang. *Sézary syndrome, SS*), ale również u pacjentów z chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *graft- versus- host disease, GVHD*). Choć ECP jest najdłużej stosowaną na świecie formą immunoterapii nowotworów, jej mechanizm działania nie został w pełni poznany (Cho et al., 2018).



Rycina 4. Schemat przedstawiający poznane mechanizmy przeciwnowotworowego działania fotoforezy pozaustrojowej w leczeniu CTCL.

Powszechnie uważa się, że oprócz indukowania apoptozy komórek nowotworowych, ECP ma szerokie działanie immunomodulujące m.in. powoduje zmniejszenie liczby limfocytów regulatorowych Treg, dojrzewanie komórek dendrytycznych, indukcję cytokin pro-zapalnych i aktywację limfocytów CD8 (Akilov, 2023) (Ryc. 4). Niemniej ze względu na nowe możliwości zastosowania w leczeniu CTCL form terapii celowanej, w tym przeciwciała monoklonalne mogamulizumabu, szczególnie istotne jest dogłębne poznanie mechanizmów przeciwnowotworowego działania ECP, zwłaszcza w kontekście wpływu na komórki efektorowe mające zdolność do ADCC.

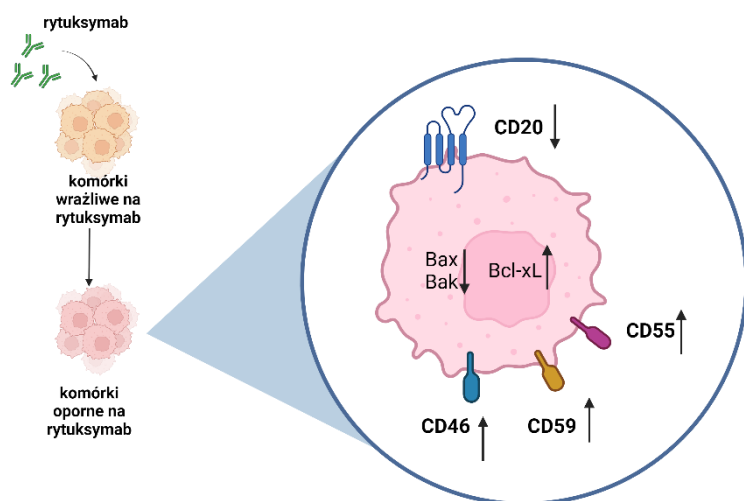
Mechanizmy oporności na immunoterapię

Do mechanizmów ucieczki komórek nowotworowych przed rozpoznaniem przez układ odpornościowy należą (podsumowane w (Piper et al., 2023; Sharma et al., 2017)) m.in.:

- wyciszenie ekspresji genów dla cząsteczek z rodziny MHC,
- wyciszenie ekspresji swoistych antygenów związanych z nowotworem (ang. *tumor-associated antigens*, TAA),
- nadekspresję ligandów dla punktów kontrolnych układu immunologicznego,
- mutacje prowadzące do nadekspresji onkogenów np. osi RAS/RAF czy kaskady kinazy 3- fosfatydyloinozytolu (PI3K)-AKT,
- immunosupresyjny wpływ mikrośrodowiska nowotworu mediowany m.in. przez makrofagi związane z guzem, limfocyty Treg, komórki supresyjne pochodzenia mieloidalnego.

Poza pierwotną opornością na działanie immunoterapii istotnym problemem terapeutycznym jest indukcja nabytej oporności na stosowane leczenie. Mechanizmy nabytej oporności na immunoterapię przeciwciałami monoklonalnymi zostały dobrze opisane na przykładzie rytuksymabu na podstawie obserwacji *in vitro* w modelach linii komórkowych opornych na rytuksymab (podsumowane w pracy mojego zespołu (Kusowska et al., 2022)) (Ryc. 5). Mechanizmy te obejmują m.in.:

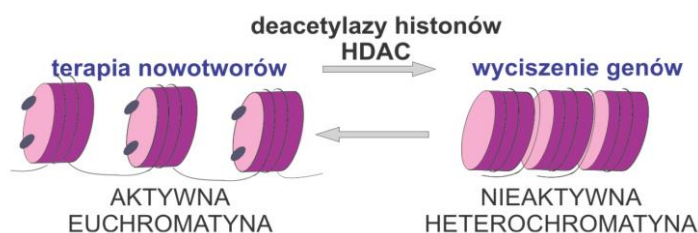
- zmniejszoną ekspresję antygeny CD20,
- nadekspresję inhibitorów układu dopełniacza (CD46, CD55, CD59),
- nadekspresję białek antyapoptotycznych (Bcl-xL) i zmniejszenie ekspresji białek proapoptotycznych (Bax, Bak).



Rycina 5. Schemat przedstawiający wybrane mechanizmy nabytej oporności na immunoterapię na przykładzie przeciwciała anti-CD20 rytuksymabu.

Rola terapii celowanych w hematologii

Celem przełamania oporności i wzmocnienia efektu cytotoksycznego postuluje się łączenie immunoterapii z innymi lekami w terapiach skojarzonych. Jednym z najczęstszych mechanizmów prowadzących do modyfikacji ekspresji białek w komórkach nowotworowych są modyfikacje epigenetyczne, w tym modyfikacje acetylacji chromatyny przez enzymy z grupy deacetylaz histonowych (ang. *histone deacetylase*, HDAC) (Wanczyk et al., 2011). Deacetylazy histonów poprzez zmianę konformacji chromatyny zmniejszają jej dostępność dla czynników transkrypcyjnych i tym samym hamują transkrypcję genów. Deacetylacja reszt lizynowych histonów prowadzi do wzrostu ich dodatniego ładunku, co w konsekwencji ułatwia oddziaływanie histonów z ujemnie naładowanymi resztami kwasu fosforowego w nici DNA i prowadzi do powstania skondensowanej, nieczynnej transkrypcyjnie heterochromatyny (Ryc. 6). Natomiast zastosowanie inhibitorów HDAC prowadzi do rozluźnienia struktury chromatyny i inicjacji transkrypcji.



Rycina 6. Schemat działania enzymów HDAC na organizację chromatyny.

W komórkach nowotworowych aktywność deacetylaz jest wysoka, co przekłada się na wyciszenie ekspresji genów kodujących wiele białek działających jako białka supresorowe nowotworów. Inhibitory HDAC są od lat intensywnie badane pod kątem ich aktywności przeciwnowotworowej, szczególnie w modelach nowotworów układu krwiotwórczego i limfatycznego

(Li et al., 2020; Parveen et al., 2023; Zain & O'Connor, 2010). Jak dotąd cztery nieselektywne inhibitory HDAC zostały zarejestrowane przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków FDA do leczenia nowotworów wywodzących się z układu limfatycznego, niemniej istotnym ograniczeniem tej terapii jest odsetek działań niepożądanych. W związku z powyższym, w badaniach naukowych i próbach klinicznych intensywnie eksplorowane są specyficzne inhibitory pojedynczych izoform HDAC charakteryzujące się selektywnym działaniem.

Inhibitory HDAC są jedną z form terapii celowanych stosowanych w hematologii. Terapie celowane nakierowane są na specyficzne molekularne cele, które są kluczowe dla wzrostu i przetrwania komórek nowotworowych. Inną formą terapii celowanej, o ugruntowanym już znaczeniu w hematologii jest hamowanie aktywności kinaz wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału. Inhibitory kinaz z powodzeniem stosowane są w terapii skojarzonej z immunoterapią za pomocą przeciwciał monoklonalnych (Hough et al., 2024). Terapie skojarzone łączące ze sobą metody terapeutyczne o różnych, uzupełniających się wzajemnie mechanizmach działania są od lat stosowane w hematologii. W tym przypadku równoczesne stosowanie metod terapeutycznych o różnych, uzupełniających się mechanizmach działania potencjalizuje skuteczność leczenia. Przykładami takich zarejestrowanych kombinacji są chemoimmunoterapia oparta o rytuksymab w schemacie R-CHOP (rytuksymab, cyklofosfamid, doksorubicyna, winkrystyna, prednizon), ibrutynib w skojarzeniu z rytuksymabem oraz lenalidomid w połączeniu z bortezomibem i deksametazonem. Zachęcające wyniki badania klinicznego fazy 1b/2 połączenia ViPOR testującego wielolekowy schemat wolny od chemioterapii: wenetoklaks (inhibitor anty-apoptotycznego białka Bcl-2), ibrutynib (inhibitor kinazy Btk), prednizon, obinutuzumab (przeciwciało anty-CD20) oraz związek immunomodulujący lenalidomid u pacjentów z opornym na leczenie chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B (ang. *diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL) wskazują na skuteczność i korzystny profil bezpieczeństwa takiego podejścia (Melani et al., 2024).

Stosowanie terapii skojarzonych pozwala na zwiększenie skuteczności leczenia poprzez wykorzystanie komplementarnych mechanizmów cytotoksyczności, zapobieganiu powstawaniu oporności na stosowane terapie, a także redukcję dawek i poprawę profilu bezpieczeństwa terapii (Jin et al., 2023). Nieustannie poszukuje się więc nowych możliwości terapeutycznych opartych o kombinacje istniejących już leków. W pierwszej kolejności należy jednak szczegółowo zbadać molekularne efekty takich połączeń i możliwe interakcje między testowanymi lekami w modelach przedklinicznych.

4.2.2. Cel naukowy:

W moich badaniach skupiłam się na poszukiwaniu nowych strategii terapeutycznych w dwóch typach chłoniaków o niekorzystnej prognozie: DLBCL oraz białaczkowej postaci chłoniaka z limfocytów T –

zespole Sézary'ego. Chłoniak rozlany z dużych komórek B jest najczęściej występującym typem chłoniaka i charakteryzuje się agresywnym przebiegiem. Odsetek niepowodzeń terapeutycznych po zastosowaniu pierwszej linii leczenia (schemat R-CHOP) jest znaczny - sięga 30-50%, a oporność na immunochemioterapię koreluje w gorszą prognozą (Coiffier & Sarkozy, 2016; Maurer et al., 2014). Obecnie intensywnie poszukiwane są czynniki warunkujące odpowiedź na R-CHOP (Wenzl et al., 2024), a wysiłki naukowców od lat skupiają się na optymalizacji metod stosowanego dotychczas leczenia. Zespół Sézary'ego jest rzadką, agresywną postacią chłoniaka z limfocytów T, charakteryzującą się przewlekłym przebiegiem (Bobrowicz, Fassnacht, et al., 2020; Olsen et al., 2024). Pacjenci z tym schorzeniem mają ograniczone opcje terapeutyczne, a stosowane terapie rzadko prowadzą do długotrwałej remisji. Moje badania miały na celu zidentyfikowanie nowych podejść terapeutycznych, które mogłyby przewyciężyć oporność na standardowe terapie oraz skuteczniej eliminować komórki nowotworowe.

Szczegółowymi celami naukowym prezentowanego poniżej cyklu publikacji były:

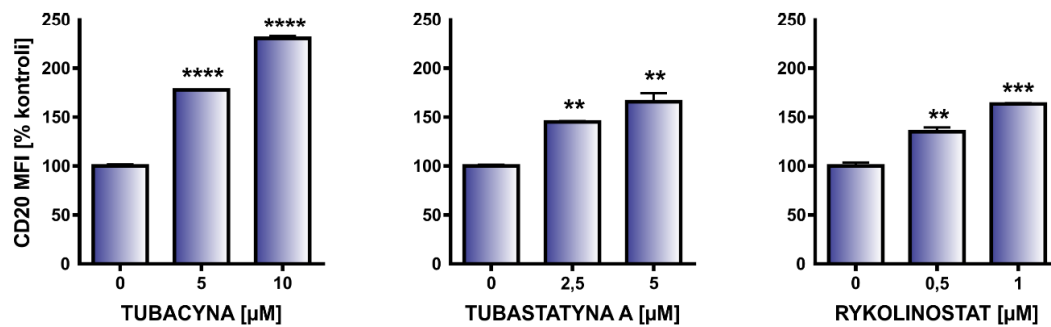
- ocena potencjału terapii skojarzonych opartych o inhibitory HDAC w leczeniu chłoniaków (publikacja 1 i 2),
- poszukiwanie strategii zwiększających skuteczność immunoterapii chłoniaków za pomocą przeciwciał monoklonalnych (publikacja 1,2 i 3),
- zbadanie konsekwencji zmniejszonej ekspresji antygenów powierzchniowych w kontekście skuteczności różnych rodzajów immunoterapii (publikacja 1 i 4).

4.2.3. Omówienie wyników badań w kontekście poszczególnych publikacji:

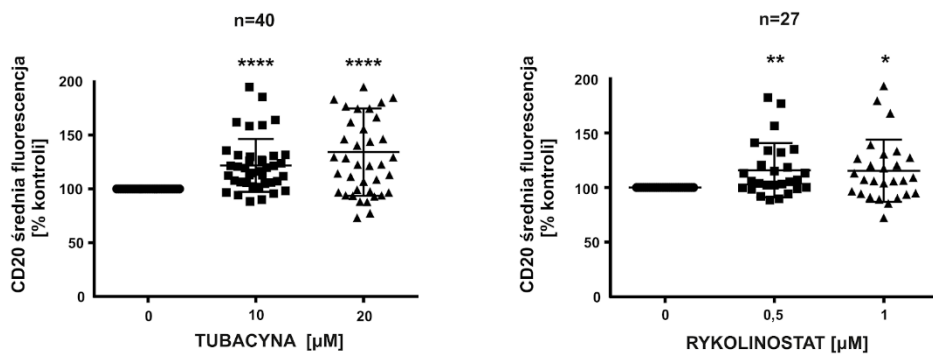
Ad 1) HDAC6 inhibition upregulates CD20 levels and increases the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies.

Pomimo przełomu jaki stanowiło wprowadzenie do terapii schematu R-CHOP, problem nabytej oporności na tę terapię dotyczy prawie połowy pacjentów leczonych R-CHOP (Glass et al., 2017). Jak wspomniano, cytotoksyczność mediowana przez rytuksymab zależy między innymi od dostępności antygenu CD20 na powierzchni komórki nowotworowej. Wieloletnie obserwacje naszego zespołu (Pyrzyska et al. 2018; Winiarska et al. 2012, 2014) oraz doświadczenia innych grup badawczych (podsumowane przez (Pavlasova & Mraz, 2020)) wskazują, że ilość antygenu CD20 może być regulowana na różnych etapach. W mojej pracy doktorskiej zajmowałam się badaniem regulacji ekspresji CD20 przez inhibitory deacetylaz histonów. Jako pierwsza wykazałam, że ekspresja CD20 ulega w znacznej mierze regulacji zarówno przez niespecyficzne pan-inhibitory HDAC jak i specyficzne inhibitory izoformy HDAC6. Badania nad możliwością wykorzystania inhibitorów HDAC6 w terapii celowanej chłoniaków kontynuowałam po sfinalizowaniu badań wchodzących w skład rozprawy

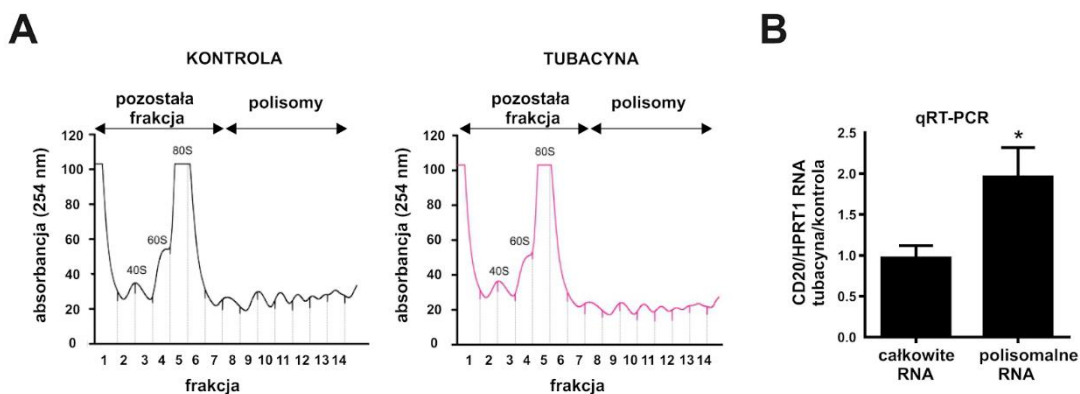
doktorskiej. **Wyniki moich badań *in vitro*** (w oparciu o ustalone modele linii komórkowych nowotworów wywodzących się z limfocytów B) i *ex vivo* (w komórkach nowotworowych wyizolowanych od pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową) **wskazują, że jedną z możliwości zwiększenia ekspresji CD20 w komórkach nowotworowych jest zastosowanie selektywnych inhibitorów HDAC6** (Ryc. 7 i 8). W moich badaniach, z wykorzystaniem ilościowej analizy mRNA we frakcji polisomów wyizolowanych z komórek poddanych inkubacji z inhibitorem HDAC6, odkryłam, że to właśnie nasilona transkrypcja mRNA dla CD20 jest przyczyną obserwowanego wzrostu ekspresji CD20 w komórkach z zahamowaną aktywnością HDAC6 (Ryc. 9).



Rycina 7. Wpływ specyficznych inhibitorów HDAC6 na ilość białka CD20 na powierzchni komórek Raji. Analiza metodą cytometrii przepływowej. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al., 2017).

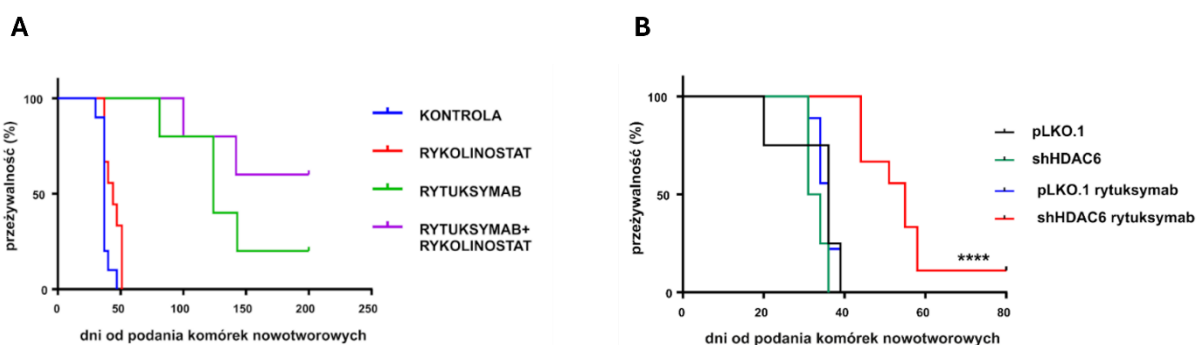


Rycina 8. Wpływ tubacyny oraz rykolinostatu na ilość CD20 na powierzchni komórek pierwotnych wyizolowanych od chorych z przewlekłą białaczką limfocytową. Analiza metodą cytometrii przepływowej. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al., 2017).



Rycina 9. Analiza frakcji polisomów w komórkach Raji inkubowanych z tubacyną. (A) Lizaty cytoplazmatyczne komórek Raji kontrolnych i preinkubowanych z inhibitorem HDAC6 ultrawirowano aż do uzyskania frakcji polisomalnej. Wykres przedstawia absorbancję przy długości fali $\lambda=254$ nm dla frakcji mRNA ultrawirowanego w gradiencie sacharozy. (B) Ilość mRNA dla CD20 analizowano we frakcji polisomalnej oraz w całkowitym lizacie cytoplazmatycznym z użyciem odczynnika SYBRGreen. Wykres przedstawia stosunek mRNA dla CD20 w odniesieniu do mRNA dla genu referencyjnego HPRT1 we frakcji polisomalnej w porównaniu do całkowitej ilości mRNA dla CD20 w odniesieniu do mRNA dla HPRT1. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al., 2017).

U części pacjentów leczonych rytuksymabem obserwuje się zmniejszenie ilości antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych (Davis et al., 1999; Hiraga et al., 2009; Kennedy et al., 2002; Maeshima et al., 2009; Seliem et al., 2006). Zatem skojarzenie inhibitorów HDAC6 i przeciwciał anti-CD20 wydaje się być atrakcyjną opcją terapeutyczną dla pacjentów z chłoniakami B-komórkowymi. Ze względu na współdziałanie różnych mechanizmów cytotoxyczności mediowanych przez kaskadę białek dopełniacza oraz komórki układu odpornościowego u pacjentów leczonych schematami opartymi o immunoterapię przeciwciałami anti-CD20, bardzo istotne jest zbadanie potencjału terapeutycznego proponowanej kombinacji w modelu *in vivo*. W tym celu przeprowadziłam, wraz ze współpracownikami, eksperymenty w mysim modelu ludzkiego chłoniaka B-komórkowego. Do eksperymentów użyto myszy SCID, którym podano podskórnie komórki nowotworowe linii Raji (reprezentującej chłoniaka Burkitta) cechujące się szybkim wzrostem (czas podziału ok. 24h) i stabilną ekspresją białka CD20. Obserwowano wydłużone przeżycie myszy leczonych kombinacją rykolinostat-rytuksymab w porównaniu do grupy leczonej rytuksymabem w monoterapii (Ryc. 10A). Eksperymenty z użyciem komórek Raji z selektywnym wyciszeniem enzymu HDAC6 za pomocą shRNA wskazują, że efekt wynikał z zahamowania aktywności HDAC6 (Ryc. 10B).



Rycina 10. Przeżywalność myszy SCID, którym wszczepiono (A) komórki nowotworowe Raji i leczono rykolinostatem, (B) komórki Raji kontrolne (pLKO.1) lub ze zmniejszoną ekspresją HDAC6 (shHDAC6), a następnie podawano rytuksymab. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al., 2017).

W trakcie realizacji moich badań przeprowadziłam kompleksową optymalizację metodologii i posługiwałam się nowoczesnymi, aktualnie stosowanymi i wzajemnie uzupełniającymi się technikami badawczymi. Zastosowałam m.in. cytometrię przepływową, Western blotting, analizę transkrypcji za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR), izolację frakcji polisomów i ocenę translacji mRNA związanego z polisomami. **W toku projektu nawiązałam liczne**

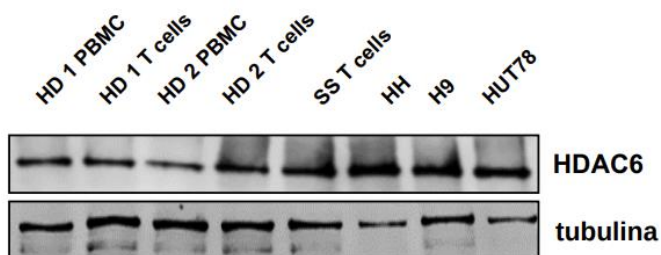
współprace badawcze, co pozwoliło na poszerzenie metodologii i uzyskanie bardziej wszechstronnych danych. Współpracowałam z zespołem dr Nicole dalla Venezia z Centre Léon Bérard, Centrum Badań nad Rakiem w Lyonie we Francji, z którą prowadziliśmy wspólne analizy profilu polisomów. Współpraca z prof. Ewą Lech-Marańdą z Kliniki Hematologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie umożliwiła pozyskanie próbek od pacjentów z nowotworami wywodzącymi się z limfocytów B. Z kolei we współpracy z prof. Lukaszem Frenzelem z Kliniki Hematologii Uniwersyteckiego Szpitala w Kolonii, Niemcy, pozyskałam próbki od pacjentów z nowotworami limfocytów B oraz wykonałam część eksperymentów *in vitro* podczas stażu naukowego w Kolonii. **Nowatorskie wyniki projektu, zastosowanie nowoczesnego warsztatu naukowego oraz zawarcie trwałych współprac międzyośrodkowych pozwoliły na opublikowanie wyników moich badań w 2017 r. w wiodącym piśmie o tematyce hematologicznej wydawanym przez Amerykańskie Towarzystwo Hematologiczne *Blood* (Bobrowicz et al., 2017).**

Wyniki tego badania, oprócz wartościowego uzupełnienia wcześniejszych badań naszego zespołu na temat możliwości regulacji CD20 przez różne klasy leków przeciwnowotworowych, wpisują się w dyskusję na temat możliwości zwiększania efektywności terapii celowanych przez selektywne inhibitory HDAC6. Badania przeprowadzone przez inne grupy badawcze wskazują, że zastosowanie związków hamujących enzym HDAC6 może wspomagać skuteczność immunoterapii również w innych modelach nowotworów. Szczególnie interesujące wydaje się być zastosowanie zahamowania HDAC6 w połączeniu z przeciwciałami anti-PD-L1. Obiecujące wyniki takich kombinacji wykazano jak dotąd w komórkach pierwotnych szpiczaka plazmocytozy (Ray et al., 2018), mysim modelu raka jajnika (Fukumoto et al., 2019), a także liniach komórkowych raka jelita grubego (Wen et al., 2024) oraz czerniaka (Peng et al., 2023). Ostatnie lata przyniosły także wiele odkryć na temat zastosowania inhibitorów HDAC6 jako immunomodulatorów. Wykazano m.in., że inhibitory HDAC6 stymulują prezentację antygenów poprzez MHC klasy I, przyczyniając się do zwiększenia cytotoksyczności limfocytów CD8+ (Rana et al. 2024). Poprzez zwiększenie ekspresji cząsteczek MHC klasy II biorą udział w rekrutacji limfocytów CD4+, a także promują różnicowanie makrofagów obecnych w guzie w kierunku makrofagów M1 (Ducellier et al., 2024) i stymulują fagocytozę poprzez zmniejszenie ekspresji CD47 na powierzchni komórek nowotworowych (Gracia-Hernandez et al., 2024). Jak dotąd żaden z selektywnych inhibitorów HDAC6 nie uzyskał jeszcze rejestracji do leczenia. Trwają jednak zaawansowane badania II fazy w kontekście efektu przeciwnowotworowego wynikającego z selektywnego zahamowania HDAC6 zarówno w rozrostach hematologicznych (badanie NCT05563844) jak i guzach litych (badanie NCT05268666).

Ad 2) Selective inhibition of HDAC6 sensitizes cutaneous T-cell lymphoma to PI3K inhibitors.

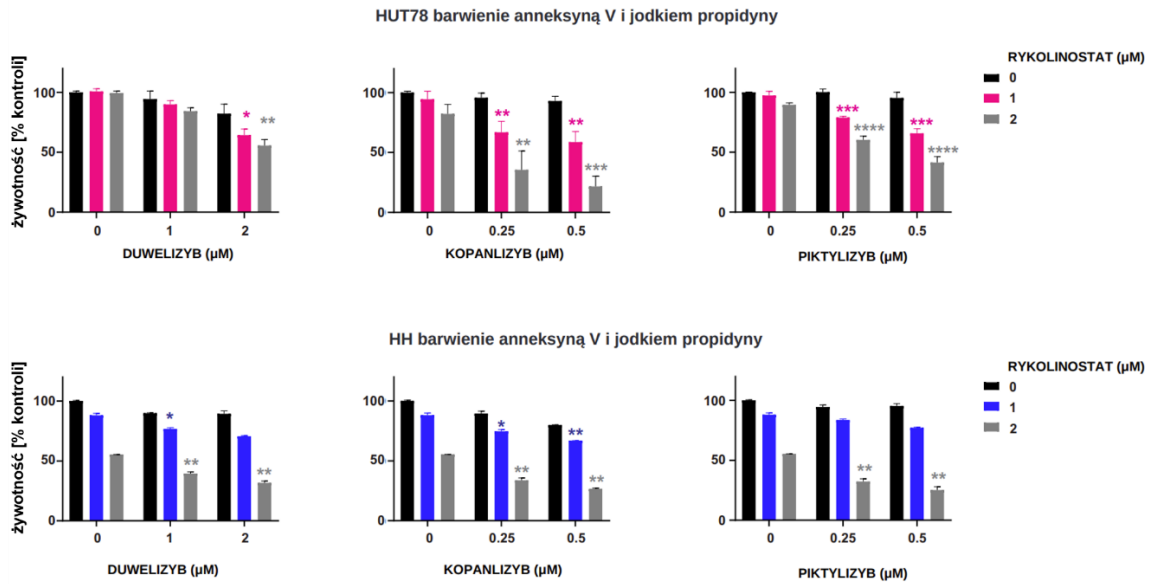
Pan-inhibitory HDAC (worinostat i belinostat) są zarejestrowane do leczenia opornego chłoniaka skóry wywodzącego się z limfocytów T (CTCL), a nowotworowe limfocyty w CTCL cechuje zwiększona ekspresja enzymu HDAC6 (Marquard et al., 2008). Obiecujące rezultaty badań z wykorzystaniem inhibitorów HDAC6 w modelu chłoniaków B-komórkowych, a także wspomniane doniesienie literaturowe były przyczynkiem do zbadania możliwości zastosowania inhibitorów HDAC6 w CTCL. Wyniki badania *in vitro* w modelach linii komórkowych CTCL traktowanych niespecyficznym pan-inhibitorem HDAC worinostatem w połączeniu z inhibitorami kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) wskazują na synergistyczne działanie tej kombinacji (Wozniak et al., 2010). Inhibitor PI3K duwalizyb był już testowany w badaniu klinicznym I fazy u pacjentów z CTCL, gdzie odnotowano częściową odpowiedź na to leczenie (Horwitz et al., 2018). Wiadomo również, że HDAC6 deacetyluje kinazę Akt, jedno z głównych białek efektorowych szlaku przekazywania sygnału przez kinazę PI3K (Iaconelli et al., 2017). W moim projekcie ostawiłam hipotezę, że zastosowanie inhibitorów HDAC6 uwrażliwia komórki CTCL na inhibitory PI3K. Badania dotyczące zastosowania inhibitorów HDAC6 w terapii CTCL zrealizowałam we współpracy z grupą Prof. Emmanuelli Guenovy w Klinice Dermatologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Zurychu, dzięki przyznanemu mi prestiżowemu stypendium Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej (EMBO).

W moich badaniach, potwierdziłam podwyższoną ekspresję enzymu HDAC6 w liniach komórkowych CTCL wywodzących się zarówno ze skórnej jak i białaczkowej postaci choroby (Ryc. 11).

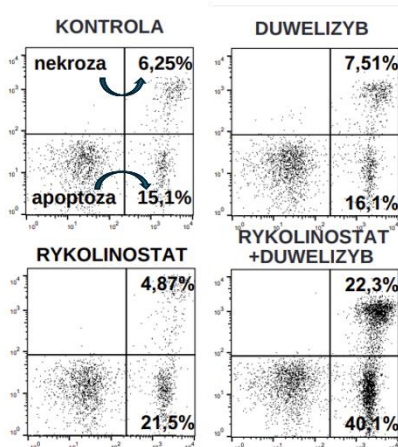


Rycina 11. Ocena ekspresji HDAC6 w komórkach wyizolowanych od zdrowych dawców (HD), pacjentów z zespołem Sézary'ego (SS) oraz w komórkach linii komórkowych CTCL (HH, H9 i HUT 78). Analiza metodą Westetn blotting. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al. 2020).

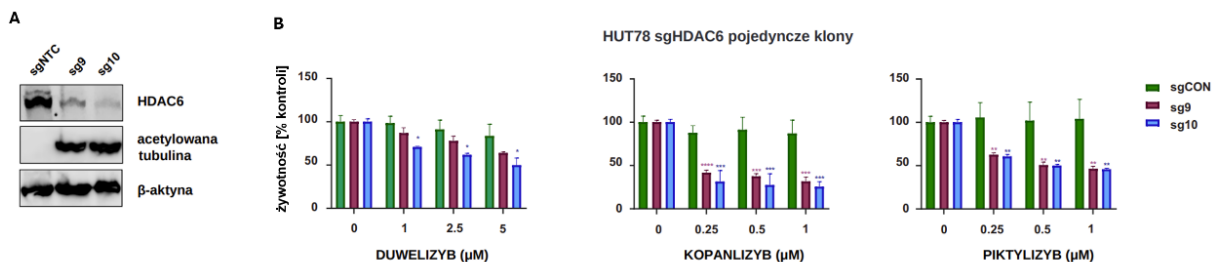
Ponadto zaobserwowałam addytywny efekt działania kombinacji inhibitorów PI3K (duwelizybu, kopanlizybu i piktilizybu) wraz z inhibitorem HDAC6 rykolinostatem (Ryc. 12 i 13). Wykorzystując linie komórkowe z wyciszoną ekspresją enzymu HDAC6 wykazałam, że obserwowany efekt zależy od zahamowania HDAC6 (Ryc. 14).



Rycina 12. Ocena żywotności komórek linii komórkowych CTCL inkubowanych przez 24h z inhibitorem HDAC6 rykolinostatem oraz inhibitorami PI3K duwelizybem, kopanlizybem i piktylizybem. Analiza metodą cytometrii przepływowej. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al. 2020).



Rycina 13. Ocena żywotności pierwotnych komórek nowotworowych wyizolowanych od pacjenta z zespołem Sézary'ego po 24 h inkubacji z inhibitorem HDAC6 rykolinostatem oraz inhibitorem PI3K duwelizybem. Analiza metodą cytometrii przepływowej. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al. 2020).



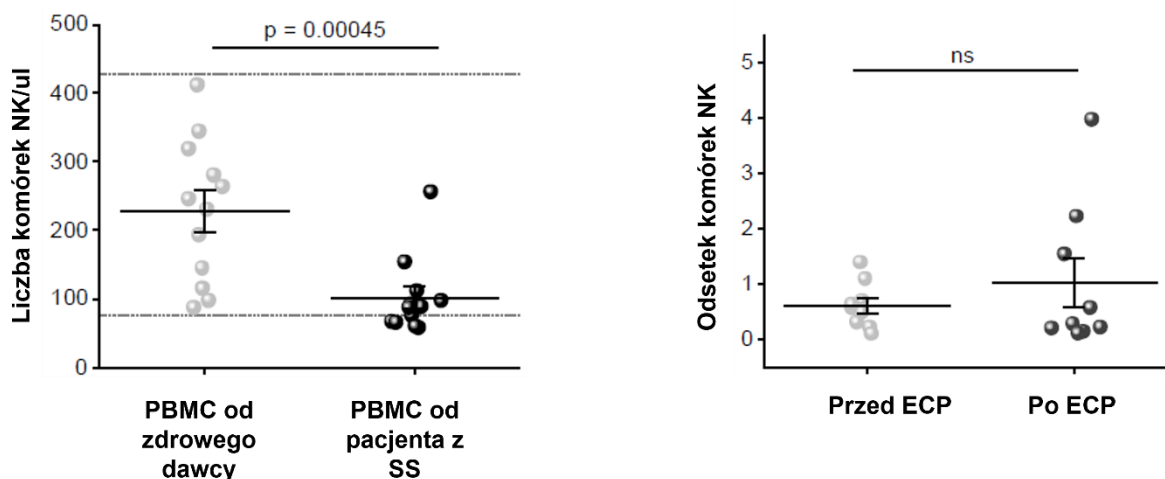
Rycina 14. (A) Ocena skuteczności wyciszenia HDAC6 w komórkach linii HUT78 transdukowanych plazmidami z sgRNA wyciszającymi sekwencję HDAC6. Analiza metodą Western blotting. (B) Ocena żywotności komórek z wyciszoną ekspresją HDAC6 poddanych 24h inkubacji z inhibitorami PI3K. Analiza metodą cytometrii przepływowej. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al. 2020).

Podsumowując, w moich badaniach wykazałam, że **zastosowanie inhibitorów HDAC6** **uważliwia komórki CTCL na inhibitory kinazy PI3K**. Co istotne, analizy przeprowadzone na platformie

opartej o modele ksenograftów od pacjentów z CTCL również wskazały równoczesne hamowanie aktywności kinazy PI3K (za pomocą selektywnego inhibitora buparlizybu) i deacetylaz histonów (stosowano pan-inhibitory HDAC hamujące również enzym HDAC6) jako jedną z możliwych i najskuteczniejszych strategii terapeutycznych (Wu et al., 2021). Synergistyczne działanie kopanlizybu z pan-inhibitorami HDAC obserwowane było również w panelu linii komórkowych CTCL (Tarantelli et al., 2020). **Moje badania stanowią wartościowe uzupełnienie w toczącej się od wielu lat dyskusji nt. możliwości zastosowania inhibitorów HDAC w leczeniu CTCL** (Lopez et al., 2018; Ott & Wu, 2017; Pavlidis et al., 2021; Rangwala et al., 2012). Chociaż wspomniane pan-inhibitory HDAC worinostat oraz belinostat zostały zarejestrowane przez FDA do leczenia pacjentów z opornym na leczenie CTCL, ich zastosowanie w praktyce klinicznej jest ograniczone ze względu na wysoki odsetek działań niepożądanych. Jednocześnie pojawiają się doniesienia o wysokiej cytotoksyczności inhibitorów HDAC w CTCL w badaniach *in vitro* (L. Zhao et al., 2022), w szczególności w połączeniu z innymi związkami przeciwnowotworowymi np. inhibitorem BCL2 wenetoklaksem (Cyrenne et al., 2017). Badania z użyciem bardziej selektywnych inhibitorów HDAC są niezbędne w celu zidentyfikowania izoform charakteryzujących się silnym efektem przeciwnowotworowym i równocześnie powodujących mniej działań niepożądanych. **Wyniki moich eksperymentów mogą stanowić wstęp do zaprojektowania pierwszych prób klinicznych z selektywnymi inhibitorami poszczególnych izoform w CTCL.**

Ad 3) Enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with treatment response to extracorporeal photopheresis in Sézary syndrome.

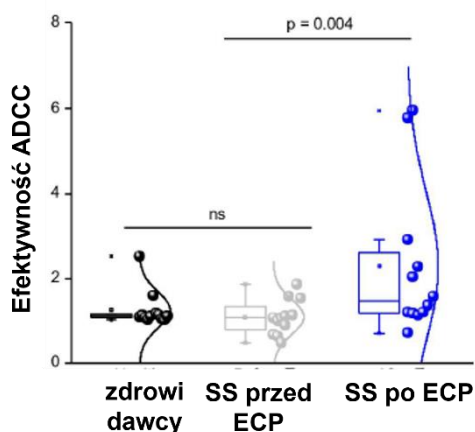
Poszukiwania nowych strategii terapeutycznych dla pacjentów z chłoniakiem skóry kontynuowałam w modelu białaczkowej postaci choroby - zespole Sézary'ego. Jako pierwsza linia leczenia w zespole Sézary'ego stosowana jest fotoforeza pozaustrojowa. Pomimo wielu lat stosowania w praktyce klinicznej, mechanizmy działania ECP nadal nie zostały dostatecznie poznane. W projekcie realizowanym w trakcie mojego pobytu badawczego w Klinice Dermatologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Zurychu postawiliśmy hipotezę, że ECP wpływa również na funkcję komórek NK, które są efektorami ADCC. Na początkowym etapie projektu oceniliśmy liczbę komórek NK u pacjentów z SS przed zastosowanym leczeniem i u zdrowych dawców. Zauważyliśmy statystycznie znamienne zmniejszenie liczby komórek NK w krwi obwodowej pacjentów z SS w porównaniu ze zdrowymi dawcami (Ryc. 15). Następnie, w serii eksperymentów *in vitro* z wykorzystaniem komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) od pacjentów przed i po ECP pokazaliśmy, że zastosowanie ECP zwiększa odsetek komórek NK w krwi obwodowej (Ryc. 16).



Rycina 15. Analizy liczby komórek NK wśród komórek PBMC zdrowych dawców (n=12) oraz pacjentów z SS (n=9). Analiza metodą cytometrii przepływowej. Zmodyfikowano na podstawie (Iselin...Bobrowicz and Guenova. 2021)

Rycina 16. Analizy odsetka komórek NK wśród PBMC w próbkach od pacjentów z SS przed i po przeprowadzeniu fotoforesy pozaustrojowej. Analiza metodą cytometrii przepływowej. Zmodyfikowano na podstawie (Iselin...Bobrowicz and Guenova. 2021).

Co niezwykle istotne, w eksperymentach *in vitro* oceniających zdolność komórek PBMC od pacjentów przed i po ECP do indukowania ADCC wobec komórek nowotworowych opłaszczonych rytuksymabem, zaobserwowaliśmy zwiększenie skuteczności ADCC po zastosowaniu ECP (Ryc. 17).



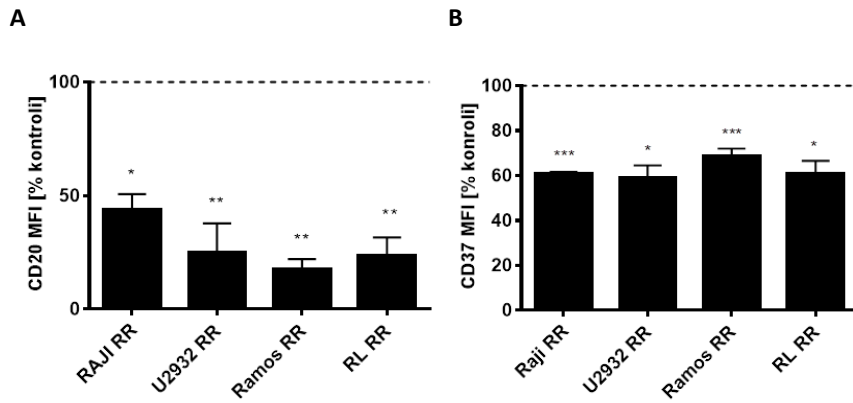
Rycina 17. Ocena efektywności ADCC komórek PBMC od zdrowych dawców oraz pacjentów z SS przed i po terapii ECP. Analiza metodą cytometrii przepływowej. Zmodyfikowano na podstawie (Iselin...Bobrowicz and Guenova. 2021).

Co więcej, zwiększenie efektywności ADCC obserwowano częściej w eksperymentach z użyciem komórek pochodzących od pacjentów z lepszą odpowiedzią kliniczną na ECP, mierzoną jako zmniejszenie odsetka komórek białaczkowych we krwi. W świetle tych obserwacji wydaje się zatem, że zwiększenie cytotoksyczności NK jest jednym z mechanizmów przeciwnowotworowego działania ECP, a zwiększona efektywność ADCC może być biomarkerem odpowiedzi klinicznej u pacjentów leczonych tą formą immunoterapii.

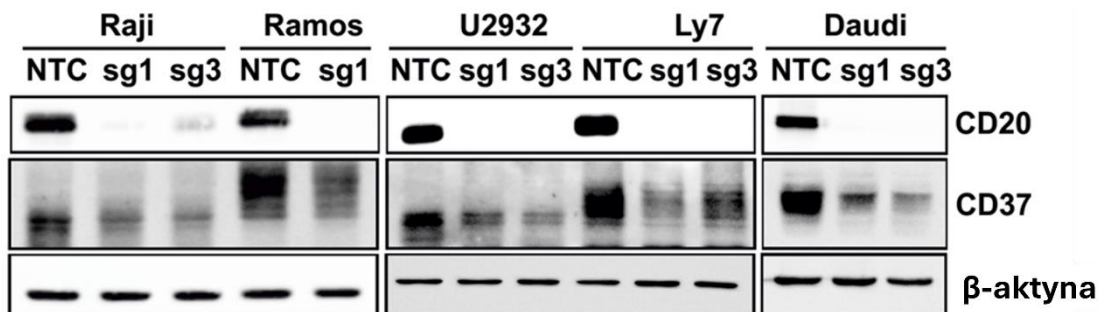
Wyniki prezentowanej publikacji mają **istotne implikacje kliniczne w kontekście stosowania w leczeniu CTCL przeciwciała monoklonalnego mogamulizumabu** skierowanemu przeciwko receptorowi chemokinowemu CCR4. Jako że jednym z głównych mechanizmów działania mogamulizumabu jest ADCC (Duvic et al., 2016), terapia skojarzona łącząca ECP z tym przeciwciałem wydaje się atrakcyjną opcją terapeutyczną. Rzeczywiście, **wyniki opublikowanych niedawno retrospektywnych analiz pokazują na skuteczność takiej terapii skojarzonej** (Ninosu et al., 2023; Rubio-Muniz et al., 2024). Przeprowadzone przeze mnie we współpracy z zespołem z Zurychu badania wskazują, że **stosowane obecnie immunoterapie mogą się wzajemnie uzupełniać** i stanowią istotny wkład w zrozumienie mechanizmów stanowiących o skuteczności takiego połączenia.

Ad 4) CD20 expression regulates CD37 levels in B-cell lymphoma - implications for immunotherapies.

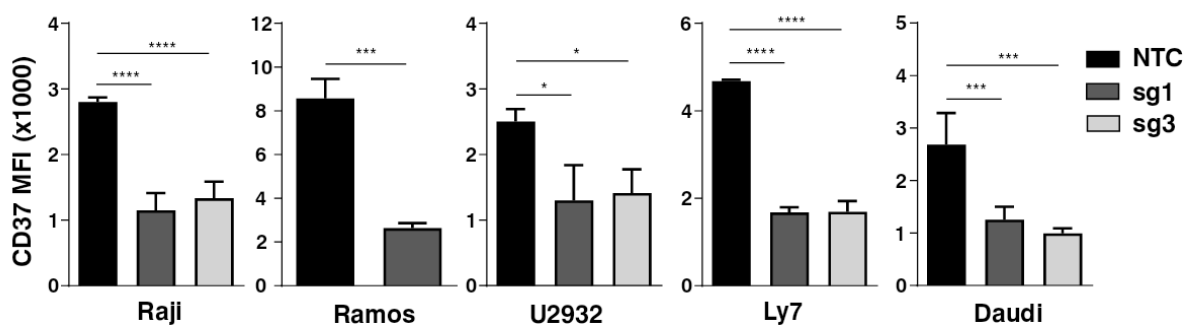
Kolejna praca niniejszego cyklu dotyczyła zbadania konsekwencji zmniejszonej ekspresji niektórych antygenów na powierzchni komórek chłoniaka opornych na leczenie rytuksymabem. W eksperymentach skupiłam się na antygenach, które są celami molekularnymi dla stosowanych obecnie terapii przeciwnowotworowych. Jak wcześniej wspomniano, stosowanie immunoterapii z użyciem przeciwciał monoklonalnych może prowadzić do powstawania oporności w przynajmniej kilku mechanizmach. Ponieważ materiał biologiczny od pacjentów z chłoniakami opornymi na leczenie jest trudnodostępny (przy wznowie bardzo rzadko wykonuje się biopsję węzła chłonnego), informacje na temat mechanizmów regulujących ekspresję CD20 oraz powstawanie wtórnej oporności na rutyksymab prowadzone są w modelach linii komórkowych o wyidukowanej oporności na to przeciwciało (Jazirehi et al., 2007; Olejniczak et al., 2008; Takei et al., 2006). Linie te, choć nieidealnie odzwierciedlają złożoność procesów biologicznych w komórce nowotworowej, pozwalają na prowadzenie powtarzalnych badań mających na celu m.in. poszukiwanie nowych opcji terapeutycznych dla pacjentów z opornością na I linię leczenia. W niniejszej pracy, posługując się czterema liniami ludzkich chłoniaków B-komórkowych z wyindukowaną opornością na rytuksymab, przeprowadziłam szczegółową analizę ekspresji antygenów powierzchniowych typowych dla limfocytów B. Wykazałam, że wszystkie zbadane modele oprócz obniżonej ekspresji cząsteczki CD20 (Ryc. 18A), cechuje również obniżona ekspresja antygenu CD37 (Ryc. 18B), będącego celem dla immunoterapii zarówno za pomocą przeciwciał monoklonalnych mających zdolność do indukcji CDC, ADCC, jak i immunotoksyn ADC oraz CAR T. Biorąc pod uwagę dane literaturowe (Oostindie et al., 2019), w moich badaniach postawiłam hipotezę, że białka CD20 i CD37 tworzą kompleks, a białko CD20 reguluje ilość białka CD37 w błonie komórkowej. Celem sprawdzenia tej hipotezy, wraz ze współpracownikami, stworzyłam modele linii komórkowych z wyciszoną ekspresją cząsteczki CD20 (Ryc. 19). Zaobserwowałam, że linie te charakteryzowała również zmniejszona ekspresja CD37 (Ryc. 19 i 20).



Rycina 18. Ocena ekspresji CD20 (A) i CD37 (B) w liniach komórkowych chłoniaków z wyindukowaną opornością na rytuksymab (RR) w porównaniu z komórkami kontrolnym z zachowaną wrażliwością na rytuksymab. Analiza metodą cytometrii przepływowej. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al. 2024).



Rycina 19. Ocena wyciszenia ekspresji CD20 oraz ocena ekspresji CD37 w komórkach modyfikowanych za pomocą sgRNA (sg1 i sg3 – sekwencje wyciszające CD20, NTC – sekwencja niewyciszająca). Analiza metodą Western blotting. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al. 2024).



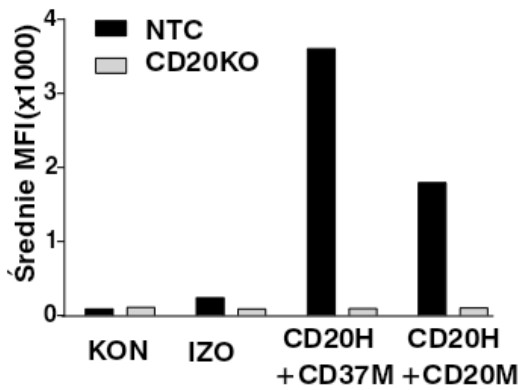
Rycina 20. Ocena ekspresji CD37 w liniach komórkowych chłoniaków B-komórkowych z wyciszoną ekspresją CD20 za pomocą sgRNA. Ekspresję CD37 porównano do komórek modyfikowanych konstruktem NTC. Analiza metodą cytometrii przepływowej. MFI – średnia intensywność fluorescencji. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al. 2024).

W kolejnych etapach projektu wykorzystując zbudowany w toku mojej wieloletniej pracy warsztat naukowy, wraz z zespołem, przeprowadziłam eksperymenty mające na celu zbadanie mechanizmów regulacji ekspresji CD37 w komórkach ze zmniejszoną ekspresją CD20. Wykluczyłam m.in. udział

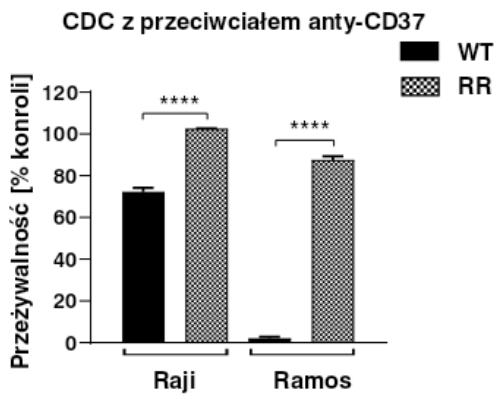
transkrypcyjnej regulacji CD37. Celem weryfikacji hipotezy na temat kompleksu tworzonego przez CD20 i CD37 w błonie komórkowej, zastosowałam technikę PLA (*Proximity Ligation Assay*). PLA wykorzystuje pary skoniugowanych z oligonukleotydami przeciwciał skierowanych przeciwko badanym białkom. Gdy oba przeciwciała zwiążą swoje docelowe białka, a białka te znajdują się w odległości do 40 nm, dochodzi do ligacji oligonukleotydów, ich amplifikacji, a następnie wykrycia produktu za pomocą sondy związanej z fluoroforem, co umożliwia analizę metodą cytometrii przepływowej. Posługując się liniami komórkowymi z wyciszoną ekspresją CD20 udowodniłam, że białka CD20 i CD37 rzeczywiście tworzą w błonie komórkowej kompleks (Ryc. 21).

Zmniejszenie ekspresji CD37 w komórkach CD20-negatywnych, a co bardziej istotne w komórkach opornych na rytuksymab, ma poważne konsekwencje w kontekście doboru kolejnej linii leczenia. W moich badaniach, wraz z zespołem, rozpatrywałam konsekwencje zmniejszonej ekspresji CD37 dla skuteczności zarówno przeciwciał monoklonalnych indukujących CDC, jak i immunotoksyn ADC oraz terapii CAR T. W celu pozyskania testowanych związków, nawiązałam liczne współprace: z dr Sebastianem Wälchli z Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Oslo (pozyskanie konstruktów CAR skierowanych przeciwko cząsteczce CD37), firmą biotechnologiczną Genmab A/S (pozyskanie przeciwciał anty-CD37 do indukcji CDC), prof. Marcinem Porębą z Politechniki Wrocławskiej (opracowanie przeciwciała anty-CD37 skoniugowanego z toksyną). Ponadto, dzięki nawiązaniu współpracy z grupą prof. Matthiasa Peippa z Uniwersytetu w Kilonii możliwe było przeprowadzenie eksperymentów mających na celu zbadanie internalizacji cząsteczki CD37, co niewątpliwie podniosło walory naukowe pracy, którą opublikowaliśmy w prestiżowym piśmie *OncolImmunology* (Bobrowicz et al., 2024).

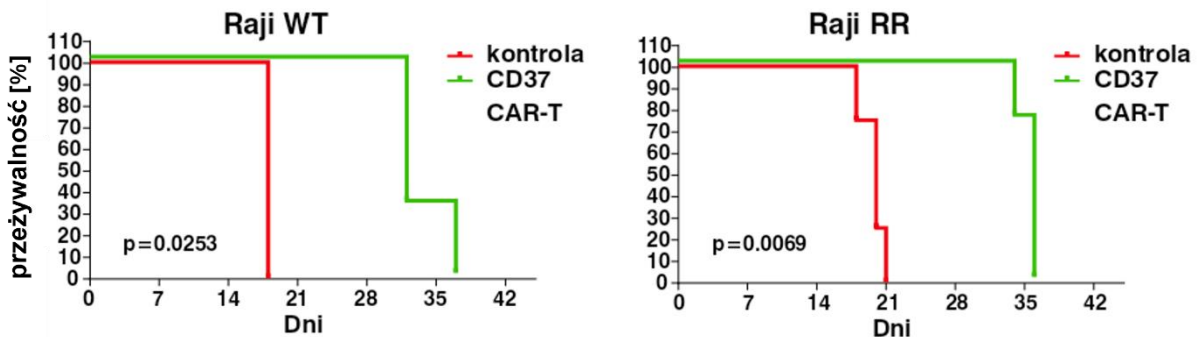
W kolejnych eksperymentach zaobserwowałam, że o ile zmniejszenie ilości CD37 w błonie znacząco upośledza działanie przeciwciał w mechanizmie CDC (Ryc. 21), to komórki ze zmniejszoną ilością CD37 pozostawały wrażliwe na cytotoksyczne działanie przeciwciała sprzężonego z toksyną oraz limfocytów T zmodyfikowanych CAR rozpoznającym cząsteczkę CD37 (Ryc. 22). Co istotne, obserwacje w modelach *in vitro* potwierdziliśmy w eksperymentach *in vivo* z użyciem myszy SCID, którym podano komórki linii Raji WT lub odporne na rytuksymab (Ryc. 23), a następnie leczono z zastosowaniem limfocytów CAR T anty-CD37.



Rycina 21. Ocena kolokalizacji białek CD20 i CD37 metodą PLA. Kompleksy kolokalizujących białek znakowano sondą z FITC i analizowano metodą cytometrii przepływowej. KON- kontrola, IZO – kontrola izotopowa. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al. 2024).



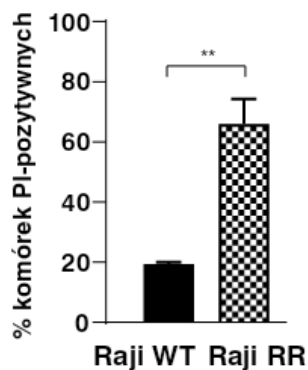
Rycina 22. Ocena cytotoksyczności przeciwciała anti-CD37 w mechanizmie CDC w liniach komórkowych Raji i Ramos kontrolnych (WT) i opornych na rytuksymab (RR). Analiza metodą cytometrii przepływowej. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al. 2024).



Rycina 23. Przeżywalność myszy SCID, którym wszczepiono komórki nowotworowe Raji WT i RR, a następnie leczono CAR T skierowanym przeciwko antygenowi CD37. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al., 2024).

Podsumowując, w przedstawionej pracy kompleksowo zbadano mechanizmy regulacji ilości antygeny CD37 przez białko CD20 oraz znaczenie tego zjawiska w kontekście stosowania immunoterapii anti-CD37. Na podstawie wykonanych w trakcie realizacji projektu eksperymentów uzyskano dwie istotne z punktu widzenia toczących się obecnie badań klinicznych obserwacje. Po pierwsze, stwierdzono, że nawet dwukrotne zmniejszenie ilości białka CD37 na powierzchni komórki nowotworowej nie upośledza efektywności immunoterapii za pomocą limfocytów CAR T skierowanych przeciwko temu antygenowi. Niedawno opublikowane wyniki badania klinicznego (NCT04136275) I fazy CD37 CAR T w leczeniu opornych chłoniaków wskazują dobrą

tolerancję i cytotoksyczność testowanego konstruktu (Frigault et al., 2024). Po drugie, **wyniki moich badań** z wykorzystaniem przeciwciała anty-CD37 skoniugowanego z toksyną (Ryc. 24), **wykazały zwiększoną cytotoksyczność przeciwciał ADC w komórkach opornych na rytuksymab**. Co istotne, w literaturze opisywano już zwiększenie skuteczności przeciwciała anty-CD37 skoniugowanego z toksyną za sprawą zwiększenia endocytozy CD37 przez równocześnie stosowany rytuksymabem (Hicks et al., 2017).



Rycina 24. Ocena cytotoksyczności przeciwciała anty-CD37 skoniugowanego z jednometylowaną aurystatyną E (MMAE) w liniach komórkowych Raji i Ramos kontrolnych (WT) i opornych na rytuksymab (RR) po 96 godzinach inkubacji. Odsetek komórek martwych czyli ulegających barwieniu za pomocą jodku propidyny zanalizowano metodą cytometrii przepływowej. Zmodyfikowano na podstawie (Bobrowicz et al. 2024).

Zarówno w badaniach innych grup badawczych (Xu-Monette et al., 2016) jak i w prezentowanej pracy, w barwieniach immunohistochemicznych bioptatów od pacjentów z DLBCL aż 50% pacjentów wykazuje bardzo niską ekspresję CD37. Moje wyniki wskazują, że immunoterapia za pomocą CD37 CAR T i ADC anty-CD37 może być skuteczna u niektórych pacjentów mimo niskiej ekspresji CD37 w błonie komórkowej. Ponadto, **uzyskane wyniki są dopełnieniem toczącej się dyskusji na temat kształtowania wrażliwości komórek nowotworowych na kolejne terapie przeciwnowotworowe przez pierwszą linię leczenia**. Na przykład, niedawno opublikowane obserwacje pokazują, że nabycie oporności na przeciwciała anty-CD37 sprzężone z toksyną prowadzi do uwrażliwienia komórek na inhibitor Bcl-2 wenetoklaks (Arribas et al., 2023). Wyniki te, a także **obserwacje mojego zespołu wskazują zatem na konieczność analizowania molekularnych konsekwencji nabytej oporności na stosowane leczenie, ponieważ scharakteryzowanie zmian zachodzących w fenotypie komórek opornych może doprowadzić do projektowania nowych terapii celowanych dla wyselekcjonowanych grup pacjentów**.

Ad 5 i 6) CD37 in B Cell Derived Tumors-More than Just a Docking Point for Monoclonal Antibodies oraz **The “Magic Bullet” Is Here? Cell-Based Immunotherapies for Hematological Malignancies in the Twilight of the Chemotherapy Era**.

Do prezentowanego cyklu zaliczyłam również dwie prace przeglądowe, które uważam za wartościowe uzupełnienie moich badań eksperymentalnych. Pierwsza z nich wyczerpująco analizuje znaczenie antygenu CD37 w kontekście patofizjologii chłoniaków oraz możliwości wykorzystania tej cząsteczki

jako celu molekularnego dla przeciwciał monoklonalnych. Z kolei druga publikacja jest przeglądem dostępnych obecnie metod immunoterapii komórkowych, ze szczególnym uwzględnieniem terapii za pomocą CAR T. W pracach kompleksowo podsumowałam aktualny stan wiedzy na temat nowoczesnych form immunoterapii rozrostów hematologicznych przy użyciu CAR-T oraz terapii anty-CD37. Dogłębna analiza dostępnych danych literaturowych potwierdziła znaczenie podejmowanych przeze mnie tematów badawczych i uzyskanych wyników eksperymentalnych dla rozwoju obecnego stanu wiedzy.

4.2.4. Podsumowanie:

W niniejszym cyklu prac eksperymentalnych poszukiwałam nowych strategii leczenia chłoniaków przy użyciu modeli dwóch agresywnych chłoniaków (DLBCL oraz białaczkowej postaci CTCL).

Za najważniejsze osiągnięcia wynikające z badań przedstawionych w moim cyklu prac uważam:

1. Zbadanie mechanizmu regulacji ekspresji CD20 przez izoformę HDAC6 i udowodnienie, że selektywne zahamowanie aktywności tego enzymu prowadzi do zwiększenia skuteczności terapii przeciwciałami anty-CD20 w modelach *in vitro* i *in vivo* (Bobrowicz et al., 2017);
2. Wskazanie, że inhibitory HDAC6 uwrażliwiają komórki chłoniaków wywodzących się z limfocytów T na działanie związków przeciwnowotworowych – inhibitorów kinazy PI3K (Bobrowicz et al., 2020);
3. Wskazanie, że zastosowanie fotoforezy pozaustrojowej prowadzi do zwiększenia cytotoksyczności komórek NK i jest wartościowym uzupełnieniem terapii za pomocą przeciwciał monoklonalnych w leczeniu CTCL (Iselin et al., 2021);
4. Zbadanie wpływu zmniejszonej ilości antygenów powierzchniowych CD20 i CD37 na skuteczność immunoterapii za pomocą przeciwciał monoklonalnych, immunotoksyn oraz CAR T (Bobrowicz et al., 2017, 2024)

5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ

5.1. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO NA PODSTAWIE ANALIZY BIBLIOMETRYCZNEJ

Mój dorobek naukowy na dzień wykonania dołączonej do autoreferatu analizy bibliometrycznej (25.10.2024) obejmuje 32 publikacje, w tym:

- 14 pełnotekstowych prac oryginalnych w czasopismach z IF; w tym 11 po uzyskaniu stopnia doktora

- 12 prac poglądowych; w tym 11 w czasopiśmie z IF; w tym 9 prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora
- 2 listy do redakcji opublikowane w pismach z IF; opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora
- 2 opisy przypadku opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora
- 2 rozdziały w podręczniku *Endokrynologia w przypadkach* wydany przez PZWL

Szczegółowy wykaz danych bibliometrycznych, z uwzględnieniem publikacji pod nazwiskiem panińskim:

	PRZED DOKTORATEM		PO DOKTORACIE	
	IF	MNiSW	IF	MNiSW
Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe	13,287	100	93,085	1330
Opisy przypadków	-	-	3,800	40
Prace poglądowe	8,637	80	38,748	1070
RAZEM	21,924	180	135,633	2640

łącznie (przed i po doktoracie):

IF = 157,557

MNiSW = 2820

Dwa listy do redakcji nieuwzględnione w powyższej analizie o łącznym IF: **14,842**

Liczba cytowań (według bazy Web of Science, bez autocytowań) **659**

Indeks Hirscha (według bazy Web of Science) **15**

5.2. PRZEBIEG KARIERY NAUKOWEJ

5.2.1. Badania dotyczące terapii fotodynamicznej nowotworów

Swoje badania w obszarze biologii molekularnej i nauk przedklinicznych rozpoczęłam jeszcze w czasie studiów magisterskich na kierunku farmacja. Na III roku studiów dołączyłam do zespołu Prof. Jakuba Gołąba w Zakładzie Immunologii WUM, który realizował wówczas projekt TEAM finansowany przez Fundację Nauki Polskiej skupiający się na metodach zwiększenia skuteczności terapii fotodynamicznej (PDT) nowotworów. Próby wykorzystania PDT do uwrażliwienia komórek nowotworowych na działanie immunoterapii za pomocą przeciwciał monoklonalnych stały się tematem mojej pracy magisterskiej

pt. *Badanie wpływu terapii fotodynamicznej oraz przeciwciał monoklonalnych na fagocytozę komórek nowotworowych*. Jako magistrantka zaangażowana byłam również w przygotowanie pracy poglądowej dotyczącej zastosowania kwasu aminolewulinowego jako fotouczulacza: Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, Gabrysiak M, Winiarska M, **Wańczyk M**, Bojarczuk K, Gołąb J. Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules*. 2011;16(5):4140-4164. IF 2011: **2,386**. Jak dotąd praca ta była cytowana aż 229 razy.

5.2.2. Prace dotyczące biologii chłoniaków B-komórkowych

Równoległe z realizacją pracy magisterskiej pracując w zespole dr hab. n. med. Magdaleny Winiarskiej zaangażowana byłam w prace dotyczące badania mechanizmów regulacji antygenu CD20.

CD20, kodowane przez gen MS4A1, jest białkiem błonowym charakterystycznym dla prawidłowych i nowotworowo zmienionych limfocytów B, wykorzystywanym jako cel dla immunoterapii przeciwciałami monoklonalnymi od prawie 30 lat. Początkowo uważano, że antygen CD20 cechuje duża stabilność na powierzchni komórki, niemniej dane literaturowe dostępne obecnie wskazują, że ilość CD20 podlega regulacji w wielu mechanizmach (Pavlasova & Mraz, 2020), co może przekładać się na skuteczność immunoterapii za pomocą przeciwciał monoklonalnych.

Efektem naszej pracy była identyfikacja nowych białek, szlaków molekularnych oraz związków chemicznych, często testowanych w zaawansowanych etapach badań klinicznych, które wpływają zarówno korzystnie, jak i niekorzystnie na skuteczność przeciwnowotworową przeciwciał anti-CD20. Prace te dotyczyły:

- mechanizmów regulacji ekspresji CD20 na różnych etapach powstawania tego antygenu
- wpływu nowych leków na skuteczność rytuksymabu w mechanizmach CDC, ADCC, immunofagocytozy
- regulacji ekspresji inhibitorów dopełniacza przez leki przeciwnowotworowe oraz jej konsekwencji w kontekście skuteczności immunoterapii za pomocą przeciwciał anti-CD20

1. Winiarska M, Nowis D, Bil J, Glodkowska-Mrowka E, Muchowicz A, **Wańczyk M**, Bojarczuk K, Dwojak M, Firczuk M, Wilczek E, Wachowska M, Roszczenko K, Miaczynska M, Chlebowska J, Basak GW, Golab J. Prenyltransferases regulate CD20 protein levels and influence anti-CD20 monoclonal antibody-mediated activation of complement-dependent cytotoxicity. *J Biol Chem*. 2012 Sep 14;287(38):31983-93. IF 2012: **4,651**

W pracy tej po raz pierwszy pokazaliśmy, że ilość CD20 może być modulowana przez inhibitory prenylacji białek na poziomie transkrypcyjnym. W serii eksperymentów in vitro pokazaliśmy, że zastosowanie inhibitorów transferazy farnesyly aktywuje promotor MS4A1 poprzez nasilone wiązanie czynników transkrypcyjnych PU.1 oraz Oct-2 do miejsc regulatorowych w obrębie promotora. Praca ta ma potencjalne implikacje praktyczne biorąc pod uwagę rozwój inhibitora farnesyazy tipifarnibu.

2. Winiarska M, Bojarczuk K, Pyrżyńska B, Bil J, Kłopotowska M, Dwojak M, **Bobrowicz M**, Miązek N, Zapala P, Zagożdżon A, Krol M, Syta A, Podszywalow-Bartnicka P, Pilch Z, Dabrowska-Iwanicka A, Juszczyński P, Efremov D, Slabicki M, Zenz T, Le Roy A, Olive D, Rygiel T, Leusen J, Gołąb J. Inhibitors of SRC kinases impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *mAbs*. 2014;6(5):1300-1313. IF 2014: **4,558**

W pracy opisaliśmy molekularne mechanizmy regulacji ekspresji CD20 przez jeden z inhibitorów kinaz tyrozynowych – dazatynib będący inhibitorem kinaz BCR-ABL oraz kinaz z rodziny SRC. W czasie prowadzenia projektu potencjał tego związku był intensywnie eksplorowany w badaniach klinicznych, w tym wśród pacjentów z opornymi na leczenie chłoniakami nie-Hodgkina. W naszym badaniu pokazaliśmy, że dazatynib nie tylko zmniejsza ilość CD20 w błonie komórkowej w mechanizmie transkrypcyjnym, ale również całkowicie znosi zdolność rytuksymabu oraz ofatumumabu do aktywacji CDC. Stosując inne specyficzne inhibitory kinazy SRC pokazaliśmy, że proces regulacji genu MS4A1 przez dazatynib jest zależny od aktywności kinazy AKT, jednej z kinaz aktywowanych w trakcie przekazywania sygnału przez receptor limfocytów B - BCR.

3. Bojarczuk K, Kłopotowska M, Dwojak M, **Bobrowicz M**, Pyrżyńska B, Gaj P, Karp M, Giannopoulos K, Efremov D, Fauriat C, Gołąb J, Winiarska M. B-cell receptor pathway inhibitors affect CD20 levels and impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia*. 2014;28(5):1163-1167. IF 2014: **10,431**

W pracy tej badaliśmy wpływ inhibitorów innych kinaz tyrozynowych związanych z przekazywaniem sygnału przez BCR. W czasie powstawania niniejszej pracy ibrutynib (inhibitor kinazy BTK) oraz idelalizyb (inhibitor PI3K) były testowane w III fazie badań klinicznych w kombinacji z rytuksymabem u pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową. Wyniki naszych badań pokazują, że zahamowanie aktywności kinaz BTK i PI3K, tak jak w przypadku zablokowania aktywności kinazy SRC, zmniejsza transkrypcję MS4A1, co przekłada się na upośledzenie działania przeciwciał anti-CD20 w mechanizmie CDC. Ponadto pokazaliśmy, że zahamowanie kinazy BTK może prowadzić do upośledzenia cytotoksycznej aktywności komórek NK. Wyniki naszej pracy zostały potwierdzone przez innych badaczy, co pośrednio stało się impulsem do poszukiwania nowych, bardziej selektywnych inhibitorów szlaku BCR.

4. Pyrżyńska B, Dwojak M, Zerrouqi A, Morlino G, Zapala P, Miązek N, Zagożdżon A, Bojarczuk K, **Bobrowicz M**, Siernicka M, Machnicki M, Gobessi S, Barankiewicz J, Lech-Maranda E, Efremov D, Juszczyński P, Calado D, Gołąb J, Winiarska M. FOXO1 promotes resistance of non-Hodgkin lymphomas to anti-CD20-based therapy. *Oncolmmunology*. 2018;7(5):1-9 IF 2018: **5,333**

Kontynuując wątek regulacji ilości CD20 w błonie komórkowej przez inhibitory kinaz związanych z BCR, zidentyfikowaliśmy mechanizm molekularny tego zjawiska związany z aktywacją kinazy AKT. Zidentyfikowaliśmy zależny od AKT czynnik transkrypcyjny FOXO1, który wiążąc się z promotorem MS4A1 uczestniczy w regulacji ekspresji CD20. Co ważne, u pacjentów z DLBCL z inaktywującą mutacją FOXO1 obserwuje się gorszą odpowiedź na terapię R-CHOP niż u pacjentów z niezmutowanym FOXO1.

5. Dwojak M, **Bobrowicz M**, Bil J, Bojarczuk K, Pyrzyńska B, Kłopotowska M, Malenda A, Lech-Maranda E, Tomczak W, Giannopoulos K, Gołąb J, Winiarska M. Sorafenib improves rituximab and ofatumumab efficacy by decreasing the expression of complement regulatory proteins. *Blood Cancer Journal*. 2015;5(4):1-4. IF 2015: **4,411**

W pracy przedstawiliśmy molekularny mechanizm odpowiedzialny za zwiększenie skuteczności rytuksymabu przez sorafenib, pan-inhibitor kinaz serynowo-treoninowych. W serii eksperymentów in vitro pokazaliśmy, że zastosowanie sorafenibu zarówno w liniach komórkowych chłoniaków B-komórkowych jak i w pierwotnych komórkach nowotworowych wyizolowanych od pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową, zmniejsza ekspresję inhibitorów dopełniacza: CD46, CD55 i CD59, co prowadzi do nasilonego wbudowywania w błonę komórkową kompleksu C5b-9. Pokazaliśmy, że zmniejszenie ekspresji inhibitorów dopełniacza związane jest z hamującym wpływem sorafenibu na fosforylację czynnika transkrypcyjnego STAT3. Nasze odkrycie ma znaczne implikacje praktyczne, ponieważ pokazuje uniwersalny mechanizm uwrażliwienia komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie przeciwciał w mechanizmie CDC.

Badanie mechanizmów regulacji ekspresji antygenu CD20 było również tematem mojej pracy doktorskiej, którą obroniłam z wyróżnieniem w 2017 r. W mojej pracy doktorskiej skupiłam się na inhibitorach HDAC, wówczas nowej klasie leków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Jak wspomniano wcześniej, deacetylazy histonów są heterogenną grupą enzymów odpowiedzialnych za epigenetyczną regulację ilości białek. Rodzina enzymów HDAC składa się z 18 izoform o różnej roli i ilości w komórce. Dane na temat regulacji ekspresji CD20 przez niespecyficzne inhibitory HDAC takie jak entinostat i worinostat były już publikowane (Frys et al., 2015; Shimizu et al., 2010; Sugimoto et al., 2009; W.-L. Zhao et al., 2007), niemniej nie została zidentyfikowana konkretna izoforma odpowiedzialna za ten efekt. W mojej pracy doktorskiej w modelach ludzkich nowotworów wywodzących się z limfocytów B przeprowadziłam analizę wpływu zahamowania poszczególnych izoenzymów należących do rodziny HDAC. W moich badaniach stosowałam zarówno niespecyficzne tzw. pan-inhibitory HDAC jak i związki selektywne hamujące kilka lub jeden izoenzym HDAC. Po raz pierwszy wykazałam, że ilość białka CD20 w błonie komórkowej może być regulowana przez selektywne zahamowanie aktywności enzymu HDAC6.

Celem doskonalenia mojego warsztatu naukowego w trakcie studiów doktoranckich odbyłam liczne staże naukowe. Szczególnie wart nadmieniać był staż w Laboratorium Hematologii Molekularnej, Międzynarodowego Centrum Inżynierii Genetycznej i Biotechnologii w Trieście, Włochy, gdzie pod opieką prof. Dimitara Efremova nabywałam doświadczenie w mysich modelach przewlekłej białaczki limfocytowej i DLBCL. Efektem tej współpracy jest publikacja: Sasi B, Martines C, Xerxa E, Porro F, Kalkan H, Fazio R, Turkalj S, Bojnik E, Pyrzyńska B, Stachura J, Zerrouqi A, **Bobrowicz M**, Winiarska M, Priebe V, Bertoni F, Mansouri L, Rosenquist R, Efremov D. Inhibition of SYK or BTK augments venetoclax sensitivity in SHP1-negative/BCL-2-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2019;33(10):2416-2428, IF 2019: 8,665;

Po obronie doktoratu skupiłam się na kontynuacji badań dotyczących wpływu zahamowania HDAC6 na skuteczność immunoterapii, a wyniki badań moich wraz z zespołem zawarłam w publikacji (Bobrowicz et al., 2017) omówionej powyżej w ramach cyklu. Moje zainteresowanie rolą HDAC6 w nowotworach wywodzących się z limfocytów zaowocowało również nawiązaniem przeze mnie współpracy z prof. Emmanuellą Guenową z Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Zurychu, gdzie realizowałam stypendium EMBO. Współpracę z zespołem prof. Guenovy kontynuowałam po przeniesieniu się zespołu do Uniwersytetu w Lozannie.

Moje obserwacje dotyczące regulacji cząsteczki CD20 w komórce nowotworowej skłoniły mnie do podjęcia badań na temat konsekwencji zmniejszonej ekspresji antygenu CD20 w kontekście skuteczności immunoterapii. Odkryłam, że komórki z selektywnie wyciszoną ekspresją dla genu kodującego CD20 cechuje zmniejszona ekspresja cząsteczki CD37. W ramach projektu Sonata pt. *Zbadanie roli tetraspanin CD20 i CD37 w biologii ludzkich nowotworów wywodzących się z limfocytów B* finansowanego przez NCN badałam mechanizmy molekularne tego zjawiska, czego efektem była publikacja pracy (Bobrowicz et al., 2024), omówionej powyżej w ramach cyklu. W trakcie prowadzonych badań niezbędne było nawiązanie współprac z innymi ośrodkami naukowymi i partnerami w Polsce i za granicą (opisane w cyklu publikacji).

W trakcie realizacji projektu doktorskiego zainteresowałam się również biologią komórek NK, które są jednymi z głównych komórek efektorowych zaangażowanych w proces ADCC. Celem pogłębienia mojej wiedzy na temat podstawowych procesów biologicznych dotyczących limfocytów NK odbyłam staż w zespole prof. Daniela Olive Laboratorium Immunologii i Nowotworów, Uniwersytet Aix-Marseille Université, Marsylia, Francja. Wątek udziału komórek NK w cytotoksycznym działaniu rytuksymabu jest obecnie kontynuowany przez doktorantkę mgr inż. Aleksandrę Kusowską w ramach projektu Preludium pt. *Zbadanie roli dopełniacza w kształtowaniu oporności na cytotoksyczność komórek NK*, którego jestem opiekunem naukowym. W projekcie tym zaobserwowano, że komórki nowotworowe linii opornych na działanie rytuksymabu w mechanizmie CDC cechuje również oporność na cytotoksyczność komórek NK, chociaż komórki nowotworowe nigdy nie miały z nimi kontaktu.

W oparciu o tę obserwację, postawiono hipotezę, że przeciwciała monoklonalne indukują zmiany w komórkach nowotworowych, które prowadzą do oporności nie tylko na CDC, ale także na cytotoksyczność komórek NK. Projekt skupia się na zbadaniu roli białka CD59 – inhibitora układu dopełniacza ulegającego zwiększonej ekspresji na powierzchni komórek opornych na CDC, który wedle danych literaturowych może również hamować aktywność perforyny w błonie komórkowej. Dlatego celem tego projektu jest wyjaśnienie zjawiska oporności krzyżowej zarówno na CDC, jak i ADCC. Wyniki uzyskane w projekcie mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za upośledzone działanie przeciwciał monoklonalnych i zaproponowania strategii poprawiających skuteczność dostępnych immunoterapii lub wyznaczyć nowe schematy leczenia dla pacjentów z nawrotem/opornością na leczenie. Projekt ten realizowany jest we współpracy z ekspertem w dziedzinie badań nad komórkami NK - Prof. Carstenem Watzlem z Zakładu Immunologii, Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, Uniwersytet Techniczny w Dortmundzie, Niemcy. Na kontynuację naszych wspólnych badań otrzymaliśmy finansowanie w konkursie Weave Unisono w ramach współpracy dwustronnej polsko-niemieckiej finansowanego ze środków Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) oraz NCN.

5.2.3. Prace dotyczące mechanizmów immunosupresji w patogenezie chłoniaków skóry i wykorzystania immunoterapii w dermatoonkologii

Moje zainteresowanie izoenzymem HDAC6 i jego unikatową rolą w komórce skłoniły mnie do kontynuacji moich badań w innych modelach nowotworów. Ponieważ pan-inhibitor HDAC worinostat jest zarejestrowany do leczenia opornego chłoniaka skóry wywodzącego się z limfocytów T (CTCL), nawiązałam współpracę z ośrodkiem specjalizującym się w leczeniu CTCL – Kliniką Dermatologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Zurychu. Dzięki pozyskaniu stypendium Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej (EMBO) miałam możliwość realizacji stażu naukowego w grupie badawczej Prof. Emmanuelli Guenovy, z którą nadal współpracuję. Poza ujętymi w przedstawionym powyżej cyklu pracami (Bobrowicz et al., 2020; Iselin et al., 2021) moja współpraca z zespołem Prof. Guenovy zaowocowała pracami dotyczącymi mechanizmów immunosupresji w CTCL oraz wykorzystania immunoterapii w dermatoonkologii:

1. Anzengruber F, Ignatova D, Schlaepfer T, Chang Y, French L, Pascolo S, Contassot E, **Bobrowicz M**, Hoetzenecker W, Guenova E. Divergent LAG-3 versus BTLA, TIGIT, and FCRL3 expression in Sézary syndrome. *Leukemia & Lymphoma*. 2019;60(8):1899-1907. IF 2019: **2,969**

Celem naszego badania było lepsze poznanie mechanizmów immunosupresji w CTCL. W projekcie zbadaliśmy ekspresję cząsteczek będących punktami kontrolnymi układu immunologicznego w komórkach pochodzących od pacjentów z białaczkową postacią CTCL tzw. zespołem Sézary'ego.

Wyniki naszych badań wykazały zwiększoną ekspresję cząsteczek BTLA, FRCL3 oraz TIGIT w komórkach CTCL w porównaniu do prawidłowych limfocytów CD4+, co sugeruje, że cząsteczki te mogą być dobrym celem dla immunoterapii. Mój udział w niniejszej publikacji obejmował analizę wyników oraz udział w napisaniu manuskryptu.

2. Saulite I, Ignatova D, Chang Y, Fassnacht C, Dimitriou F, Varypataki E, Anzengruber F, Nägeli M, Cozzio A, Dummer R, Scarisbrick J, Pascolo S, Hoetzenecker W, **Bobrowicz M**, Guenova E. Blockade of programmed cell death protein 1 (PD-1) in Sézary syndrome reduces Th2 phenotype of non-tumoral T lymphocytes but may enhance tumor proliferation. *Oncolimmunology*. 2020;9(1):1-12. IF 2020: **8,110**
Badanie to miało na celu zrozumienie mechanizmów działania immunoterapii skierowanej przeciwko cząsteczce PD-1 w leczeniu białaczkowej postaci CTCL. W projekcie zaobserwowaliśmy zwiększoną ekspresję cząsteczki PD-1 w nowotworowych limfocytach T pochodzących od pacjentów z zespołem Sézary'ego, co jest jednym z mechanizmów odpowiadających za immunosupresję w CTCL. Ponadto, w doświadczeniach in vitro zbadaliśmy wpływ zastosowania przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko PD-1 na funkcję i proliferację limfocytów T w zespole Sézary'ego. Nieoczekiwanie zaobserwowaliśmy, że zastosowanie niwolumabu oprócz zmniejszenia efektu immunosupresyjnego mediowanego przez limfocyty T, zwiększało również proliferację komórek nowotworowych. Wyniki naszych badań sugerują, że immunoterapia ukierunkowana na oś PD-1-PDL-1 powinna być stosowana z ostrożnością u pacjentów z CTCL. Jest to szczególnie istotne w świetle aktualnie toczących się badań klinicznych oceniających skuteczność przeciwciał anti-PD-1 w CTCL. Mój udział w niniejszej pracy polegał na analizie wyników, przeglądzie literatury oraz współudziale w napisaniu manuskryptu.

3. Tsai Y, Schlaepfer T, Ignatova D, Chang Y, Valaperti A, Amarov B, Blanchard G, Pehr K, Vonow-Eisenring M, Urosevic-Maiwald M, Hoetzenecker W, Pascolo S, Iselin C, Fassnacht C, Dimitriou F, **Bobrowicz M**, Guenova E. Boost of innate immunity cytokines as biomarkers of response to extracorporeal photopheresis in patients with leukaemic cutaneous T-cell lymphoma. *British Journal of Dermatology*. 2023;189(5):603-611 IF 2022: **11,000**

W badaniu zidentyfikowaliśmy kluczowe cytokiny ulegające nadekspresji u pacjentów z białaczkową postacią CTCL – zespołem Sézary'ego po zastosowaniu fotoforezy pozaustrojowej. Wyniki naszej pracy poza lepszym zrozumieniem mechanizmów działania fotoforezy pozaustrojowej w leczeniu CTCL, pozwoliły na wytypowanie biomarkerów odpowiedzi na tę formę immunoterapii. Mój udział w niniejszej publikacji polegał na analizie wyników, przeglądzie literatury oraz współudziale w napisaniu manuskryptu.

4. Chang Y, Prompsy P, Kimeswenger S, Tsai Y, Ignatova D, Pavlova O, Iselin C, French L, Levesque M, Kuonen F, **Bobrowicz M**, Brunner P, Pascolo S, Hoetzenecker W, Guenova E. MHC-I upregulation safeguards neoplastic T cells in the skin against NK cell-mediated eradication in mycosis fungoides. Nature Communications. 2024;15:752. IF 2023: **14,700**

W badaniu zidentyfikowaliśmy mechanizm unikania odpowiedzi immunologicznej wykorzystywany przez komórki ziarniniaka grzybiastego, skórnej manifestacji CTCL. W pracy pokazaliśmy, że komórki ziarniniaka grzybiastego są odporne na cytotoksyczne działanie komórek NK w mechanizmie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał, co znacznie utrudnia zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w praktyce klinicznej. W serii eksperymentów in vitro pokazaliśmy po raz pierwszy, że komórki ziarniniaka grzybiastego charakteryzuje zwiększona ekspresja cząsteczek MHC klasy I, które poprzez interakcję z hamującymi receptorami KIR prowadzą do upośledzenia cytotoksyczności komórek NK. Wyniki naszych badań wskazują, że zastosowanie przeciwciał anty-KIR może poprawić wyniki leczenia ziarniniaka grzybiastego. Mój udział w niniejszej publikacji polegał na wykonaniu części eksperymentów in vitro, współudział w zaplanowaniu eksperymentów in vivo, analizie wyników oraz współudział w napisaniu manuskryptu.

W ramach współpracy z zespołem Prof. Guenovy opublikowałam również dwie prace przeglądowe:

1. **Bobrowicz M**, Zagożdżon R, Domagała J, Vasconcelos-Berg R, Guenova E, Winiarska M. Monoclonal Antibodies in Dermatooncology-State of the Art and Future Perspectives. Cancers. 2019;11(10):1-33. IF 2019: **6,126**

Praca podsumowała zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w dermatoonkologii ze szczególnym uwzględnieniem chłoniaków skóry wywodzących się z limfocytów T.

2. **Bobrowicz M***, Fassnacht C*, Ignatova D, Chang Y, Dimitriou F, Guenova E. Pathogenesis and Therapy of Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma: Collegium Internationale Allergologicum (CIA) Update 2020. International Archives of Allergy and Immunology. 2020;181(10):733-745. IF 2020: **2,749**

*równorzędny pierwszy autor

Praca omówiła patogenezę CTCL ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów immunosupresji oraz możliwości terapeutyczne skupiając się w dużej mierze na zastosowaniu immunoterapii.

5.2.4. Projekty badawcze w dziedzinie endokrynologii

W 2020 r ukończyłam I Wydział Lekarski Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, a w styczniu 2022 r. rozpoczęłam szkolenie specjalizacyjne w zakresie endokrynologii w Klinice Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Jak dotąd mój dorobek w dziedzinie endokrynologii obejmuje:

- 2 opisy przypadku

1. **Bobrowicz M**, Ambroziak U. Choroby nadnerczy. 39-letni mężczyzna z narastającym osłabieniem i ciężką hiponatremią. *Medycyna Praktyczna*. 2022;(9):110-116

2. Betlejewska J, **Bobrowicz M**., Gładka A, Koperski L, Toutouchi S, Ambroziak U. (2024). Spindle cell sarcoma of the adrenal gland: an unexpected diagnosis. *Polish archives of internal medicine*, 16853. Advance online publication. <https://doi.org/10.20452/pamw.16853>

- 2 prace poglądowe:

1. **Bobrowicz M**, Pachucki J, Popow M. Hypomagnesaemia leading to parathyroid dysfunction, hypocalcaemia, and hypokalaemia as a complication of long-term treatment with a proton pump inhibitor — a literature review. *Endokrynologia Polska*. 2024;1-7 doi: 10.5603/ep.98576 IF **2,000**

2. **Bobrowicz M**, Górska M, Kusowska A, Skowrońska-Szcześniak A, Bednarczuk T. Endocrine-related adverse events associated with targeted treatment and immune checkpoint blockage in hematological malignancies. *Hematology in Clinical Practice*. 2023;14:11-17

- 1 doniesienie konferencyjne:

Bobrowicz M, Roslon M, Karpilowska A, Nagorska A, Gładka A, Toutouchi S, Koperski L, Ambroziak U. Pheochromocytoma-induced pseudo-Cushing syndrome. *Endocrine Abstracts*. 2024 99 P29 – prezentacja plakatu na kongresie Europejskiego Towarzystwa Endokrynologicznego w Sztokholmie, 05.2024

Do moich głównych zainteresowań naukowych w dziedzinie endokrynologii należą choroby przysadki i nadnerczy. W szczególności interesują mnie biologia oraz farmakoterapia raka kory nadnerczy (RKN), niezwykle rzadkiego nowotworu o niekorzystnej prognozie i bardzo ograniczonych metodach leczenia. W przyszłości chciałabym wykorzystać zbudowany warsztat laboratoryjny i nawiązane współpracy międzyośrodkowe do badań nad nowymi strategiami terapeutycznymi dla chorych z RKN. Wspólnie z prof. Matthiasem Kroissem z Kliniki Endokrynologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Monachium (ekspertem w dziedzinie biologii i immunologii RKN) planuję badanie mające na celu zbadanie roli komórek NK w patofizjologii RKN i odpowiedzi na leczenie. W celu realizacji naszego wspólnego projektu uzyskałam stypendium wyjazdowe im. Walczaka z Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej. Stypendium to pozwoli mi na przeprowadzenie badań w ośrodku w Monachium, a także nawiązanie trwałych kontaktów naukowych oraz transferu praktyk klinicznych do ośrodka, w którym pracuję w Polsce.

Od 2022 r. aktywnie działam w ramach Europejskiej Grupy Badawczej Guzów Nadnerczy (ENSAT), gdzie jestem członkinią grup roboczych zajmujących się rakiem kory nadnercza oraz gruczolakami nadnercza. Jestem również członkinią inicjatywy COST Harmonisation, europejskiego programu współpracy wieloośrodkowej, którego celem jest harmonizacja praktyki klinicznej i działań

naukowych dotyczących guzów nadnerczy. W COST Harmonisation uczestniczę w pracach grupy roboczej ds. harmonizacji badań naukowych dotyczących guzów nadnerczy. Guzy te są stosunkowo rzadkie i jedynie poprzez wielośrodkowe współpracy możliwe jest uzyskanie wiarygodnych danych klinicznych. Badania toczące się w ramach ENSAT są podstawą tworzenia międzynarodowych konsensusów i wytycznych. W ramach sieci ENSAT biorę udział w wielośrodkowych projektach badawczych we współpracy z:

- Dr Barbarą Altieri z Kliniki Endokrynologii Uniwersyteckiego Szpitala w Würzburgu, Niemcy realizujemy 2 projekty naukowe: *Działania niepożądane monoterapii mitotanem u pacjentów z rakiem kory nadnercza oraz Ocena wskaźników stanu zapalnego w surowicy jako predyktorów przeżycia i odpowiedzi na leczenie uzupełniające mitotanem u pacjentów z rakiem kory nadnerczy;*
- Dr Elisabeth Nowak i Prof. Martinem Reincke z Kliniki Endokrynologii Uniwersyteckiego Szpitala w Monachium, Niemcy w ramach projektu: *Ocena długoterminowych powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów z obustronnymi guzami nadnerczy wydzielającymi kortyzol w zależności od zastosowanej terapii;*
- Dr Alessandro Prete z Instytutu Metabolizmu i Badań Systemowych na Uniwersytecie w Birmingham, Wielka Brytania w ramach projektu pt. *Ocena użyteczności testu hamowania z 1 mg deksametazonu do monitorowania pacjentów z incydentaloma nadnerczy;*
- Prof. Giuseppe Reimondo z Kliniki Medycyny Wewnętrznej Uniwersyteckiego Szpitala San Luigi Gonzaga w Orbassano, Uniwersytet w Turynie, Włochy w ramach projektu pt. *Ocena wpływu ekspozycji na nadmiar kortyzolu na chorobowość i śmiertelność pacjentów z incydentaloma nadnerczy.*

Kolejnym projektem naukowym o międzynarodowym zasięgu, w którym aktywnie uczestniczę jest projekt pt. *Charakterystyka obrazu klinicznego, algorytmu diagnostycznego oraz metod i wyników leczenia ektopowego zespołu Cushinga* zainicjowany przez prof. Irinę Bancos z Kliniki Endokrynologii, Diabetologii i Żywienia, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA.

Ponadto, w Klinice jestem odpowiedzialna za włączanie danych do międzynarodowych rejestrów:

- Europejski Rejestr Pacjentów z Guzami Nadnerczy (ENSAT)
- Europejski Rejestr Pacjentów z Zespołem Cushinga (ERCuSyn)
- Międzynarodowy Rejestr Pacjentów z Wrodzonym Przerostem Kory Nadnerczy (w ramach sieci I- DSD – International Registries for Disorders of Sex Development)

W ramach Międzynarodowego Rejestru Pacjentów z Wrodzonym Przerostem Kory Nadnerczy uczestniczę w badaniu pt. *Strategie diagnostyczne w rozpoznawaniu wrodzonego przerostu nadnerczy* zainicjowanym przez dr Irinę Bacilę z Kliniki Endokrynologii Szpitala Dziecięcego w Sheffield, Wielka Brytania. W wyżej wymienionych badaniach moja rola polega na rekrutacji do badania pacjentów

z naszego ośrodka, prowadzenia baz danych i przekazania ich badaczom w ośrodkach nadrzędnych. Aktywnie uczestniczę również w projekcie *Przydatność oceny profilu steroidowego w różnicowaniu przypadkowo wykrytych zmian nowotworowych w nadnerczach* realizowanym we współpracy z dr Piotrem Glinickim z Laboratorium Kliniki Endokrynologii CMKP w ramach grantu Fundacji Naukowej Polpharma.

5.3. UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH

5.3.1. KIEROWANIE PROJEKTAMI BADAWCZYMI:

Umowa w trakcie procedowania Kierownik projektu Weave-Unisono (2023/05/Y/NZ6/00174) pt. *Poszukiwanie strategii zwiększenia skuteczności komórek NK w terapii agresywnych chłoniaków B-komórkowych* w ramach współpracy dwustronnej polsko-niemieckiej finansowanego ze środków Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) oraz NCN

2021- obecnie: Kierownik projektu Sonata NCN (2019/35/D/NZ5/01191) pt. *Zbadanie roli tetraspanin CD20 i CD37 w biologii ludzkich nowotworów wywodzących się z limfocytów B*

2018 – 2020: Kierownik projektu Młodego Badacza WUM (1M19/PM3/18) pt. *Utworzenie linii komórkowych z całkowitym wyciszeniem ekspresji genu CD20 jako narzędzi do oceny potencjału terapeutycznego nowych leków przeciwnowotworowych stosowanych w terapii chłoniaków niehodgkinowskich i przewlekłej białaczki limfocytowej*

2018 - 2019: Kierownik projektu „Najlepsi z najlepszych! 3.0” MNiSW (2019/94/DIR/NN3) pt. *Zbadanie profilu cytotoksyczności i migracji limfocytów NK - rozwój nowoczesnych terapii w immuno-onkologii*

2014 - 2016: Kierownik projektu Preludium NCN (2013/09/N/NZ3/01407) pt. *Identyfikacja białek wpływających na degradację antygeny CD20*

2014 – 2016: Kierownik projektu Młodego Badacza WUM (1M19/PM/112D/14/14) pt. *Wpływ zahamowania HDAC na skuteczność naturalnej cytotoksyczności komórek NK oraz cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał in vitro*

2012 - 2015: Kierownik projektu Diamentowy Grant MNiSW (0212/DIA/2012/41) pt. *Ocena wpływu hamowania deacetylaz histonowych (HDAC) na skuteczność terapii przeciwnowotworowych w modelu ludzkich nowotworów wywodzących się z limfocytów B*

5.3.2. UDZIAŁ W PROJEKTACH NAUKOWYCH

2023 - obecnie Opiekun projektu Preludium NCN (2022/45/N/NZ6/01691) pt. *Zbadanie roli dopełniacza w kształtowaniu oporności na cytotoksyczność komórek NK*

- 2023 - 2024: Wykonawca - Post-doc w projekcie POLNOR19 NCBiR pt. *Opracowanie alternatywnych konstruktów CAR skierowanych przeciwko opornym nowotworom wywodzącym się z limfocytów B (ALTERCAR)*
- 2021 – 2022: Opiekun projektu mini-grantu studenckiego WUM (1M19/1/M/MG/N/21) pt. *Wyprowadzenie opornych na terapię rytuksymabem linii komórkowych wywodzących się z chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (DLBCL) jako modeli do zbadania nowoczesnych strategii terapeutycznych*
- 2017 - 2021: Wykonawca - Post-doc w projekcie Sonata Bis NCN (2015/18/E/NZ6/00702) pt. *Identyfikacja nowych terapii wzmacniających skuteczność immunoterapii przeciwciałami anti-CD20 w modelach in vivo*
- 2014: Wykonawca w grantie Opus NCN 2014/13/B/NZ5/03160 pt. *Integralność białek kompleksu ligazy E3 ubikwityny jako biomarker odpowiedzi na leczenie immunomodulujące u chorych na szpiczaka plazmocytowego*
- 2010 – 2011: Wykonawca w grantie Iuventus Plus MNiSW IP2010 046570 pt. *Wpływ hipoksji na przeciwnowotworową skuteczność rytuksymabu i ekspresje CD20 w komórkach chłoniaka*

6. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA I POPULARYZUJĄCA NAUKĘ

Dydaktyka stanowi istotną część mojej pracy zawodowej:

- Od 10/2023 prowadzę seminaria z endokrynologii onkologicznej w ramach przedmiotu Onkologia dla studentów IV roku kierunku lekarskiego;
- Od 10/2023 prowadzę zajęcia praktyczne z Endokrynologii dla studentów VI roku kierunku lekarskiego oraz jestem zaangażowana w opiekę nad stażystami podyplomowymi z English Division WUM;
- W latach 2009-2017 prowadziłam wykłady i seminaria z Immunologii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego WUM.

Na aktualnym etapie ścieżki zawodowej jestem liderem zespołów i opiekunem prac naukowych młodych badaczy:

- W Zakładzie Immunologii WUM byłam opiekunem naukowym studentki Matyldy Kubacz sprawując nadzór nad realizowanym przez studentkę projektem mini-grantem studenckim WUM (1M19/1/M/MG/N/21)
- Jestem opiekunem projektu Preludium NCN (2022/45/N/NZ6/01691) pt. *Zbadanie roli dopełniacza w kształtowaniu oporności na cytotoksyczność komórek NK* realizowanym przez doktorantkę mgr inż. Aleksandrę Kusowską
- W Klinice Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii jestem opiekunem naukowym studentki Zuzanny Roszkowskiej realizującej projekt dotyczący aktualnych wyzwań w leczeniu pacjentów z rakiem kory nadnercza.

- Jestem promotorem pomocniczym w 2 przewodach doktorskich:
 - Mgr inż. Aleksandry Kusowskiej, tytuł: *Poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych w leczeniu chłoniaka rozlanego z dużych komórek B*
 - Lek. Niny Miązek-Zapały, tytuł: *Regulacja ekspresji antygeny CD20 przez szlak sygnałowy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy AKT w komórkach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B*

W ramach działalności popularyzującej naukę:

- Jestem autorką artykułu popularnonaukowego pt. „Bezpieczne stosowanie antybiotyków” na portalu *Być Zdrowym* (<https://www.byczdrowym.info/immunologia/bezpieczne-stosowanie-antybiotkow/>)
- Jestem autorką artykułu pt: *Wskazówki diagnostyczne przy podejrzeniu pheochromocytoma* w miesięczniku *Po Dyplomie* (wyd. 05/2024)
- Udzieliłam wywiadu na temat mojej pracy naukowej dla pisma *Medycyna, Dydaktyka, Wychowanie* (wyd. 05/2017) wydawanego przez WUM
- W latach 2016-2018 współredagowałam teksty popularnonaukowe publikowane na stronie internetowej projektu *STREAM* finansowanego przez Komisję Europejską w programie Horyzont 2020

7. INNE

7.1. STYPENDIA

- 2024: Stypendium w programie im. Walczaka Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej na realizację stażu naukowego w Klinice Endokrynologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Monachium, Niemcy
- 2024: Stypendium w II edycji programu The Polish Clinical Scholars Research Training realizowanym przez Harvard Medical School Postgraduate Medical Education dla Agencji Badań Medycznych
- 2021 – 2024: Stypendium dla Wybitnych Młodych Naukowców przyznane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
- 2018: Stypendium krótkoterminowe EMBO (EMBO Short Term Fellowship nr. 7637) na pobyt naukowy w Klinice Dermatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Zurychu, Szwajcaria
- 2015-2016: Stypendium ETIUDA NCN (2015/16/T/NZ6/00034) dla doktorantów
- 2012-2016: Stypendium Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dla najlepszych doktorantów

7.2. NAGRODY

- 2020-2023: Zespołowe Nagrody Naukowe JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za publikacje z zakresu onkologii doświadczalnej
- 2018: Najwyższa Nagroda Naukowa Prezesa Rady Ministrów za wybitną rozprawę doktorską
- 2017: Wyróżnienie w konkursie „Innowator Mazowsza” finansowanym ze środków Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Mazowieckiego
- 2015, 2017, 2019: Zespołowa Nagroda Naukowa Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za cykl publikacji z zakresu onkologii eksperymentalnej
- 2012: Nagroda Specjalna w konkursie „Girls of the Future” dla młodych badaczek organizowanym przez magazyn Elle i Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

7.3. STYPENDIA KONFERENCYJNE:

- 2024: COST Harmonisation, stypendium konferencyjne na udział w kongresie Europejskiej Sieci Badawczej Guzów Nadnerczy (ENSAT) w Palma de Mallorca, Hiszpania
- 2024: European Society of Endocrinology Travel Grant, stypendium konferencyjne na udział w kongresie European Congress of Endocrinology w Sztokholmie, Szwecja
- 2023: Stypendium Fundacji hr. Potockiego na udział w kongresie ENSAT w Dubrowniku, Chorwacja
- 2015: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Abstract Award, Grant #1R13AI116024-01, stypendium na udział w konferencji Keystone Antibodies Meeting, Banff, Kanada
- 2013: European Hematology Association, Travel Grant, stypendium na udział w kongresie 18th Congress of European Hematology Association, Sztokholm, Szwecja

7.4. CZŁONKOWSTWO W ORGANIZACJACH I TOWARZYSTWACH NAUKOWYCH

- European Society of Endocrinology – od 2023
- European Network for the Study of Adrenal Tumors – od 2022
- European Hematology Association – od 2013

7.5. DZIAŁALNOŚĆ RECENZENCKA

- A. Recenzowanie publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

- Frontiers in Oncology – 1 manuskrypt
 - Oncology Letters – 1 manuskrypt
- B. Recenzowanie wniosków w konkursach:
- Serbski Fundusz Nauki – ocena wniosków w konkursie *Program for Excellent Projects of Young Researchers – PROMIS* – 6 zrecenzowanych projektów
 - Bułgarski Fundusz Nauki - ocena wniosków w konkursie *Competition for funding of fundamental research on public challenges related to the COVID-19 pandemic – 2020* – 2 zrecenzowane projekty



(podpis wnioskodawcy)

Piśmiennictwo cytowane w opisie osiągnięcia naukowego

Akilov, O. E. (2023). What Does the Future Hold for Biomarkers of Response to Extracorporeal Photopheresis for Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome? *Cells*, 12(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/cells12182321>

Arribas, A. J., Gaudio, E., Napoli, S., Herbaux, C. J. Y., Tarantelli, C., Bordone, R. P., Cascione, L., Munz, N., Aresu, L., Sgrignani, J., Rinaldi, A., Kwee, I., Rossi, D., Cavalli, A., Zucca, E., Stussi, G., Stathis, A., Sloss, C., Davids, M. S., & Bertoni, F. (2023). *PI3K δ activation, IL6 over-expression, and CD37 loss cause resistance to the targeting of CD37-positive lymphomas with the antibody-drug conjugate naratuximab emtansine* (p. 2023.11.14.566994). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.11.14.566994>

Bobrowicz, M., Dwojak, M., Pyrzyńska, B., Stachura, J., Muchowicz, A., Berthel, E., Dalla-Venezia, N., Kozikowski, M., Siernicka, M., Miazek, N., Zapala, P., Domagala, A., Bojarczuk, K., Malenda, A., Barankiewicz, J., Graczyk-Jarzynka, A., Zagodzón, A., Gabrysiak, M., Diaz, J.-J., ... Winiarska, M. (2017). HDAC6 inhibition upregulates CD20 levels and increases the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Blood*, 130(14), 1628–1638. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-736066>

Bobrowicz, M., Kusowska, A., Krawczyk, M., Zhylo, A., Forcados, C., Slusarczyk, A., Barankiewicz, J., Domagala, J., Kubacz, M., Šmída, M., Dostalova, L., Marhelava, K., Fidył, K., Pepek, M., Baranowska, I., Szumera-Cieckiewicz, A., Inderberg, E. M., Wälchli, S., Granica, M., ... Winiarska, M. (2024). CD20 expression regulates CD37 levels in B-cell lymphoma—Implications for immunotherapies. *Oncoimmunology*, 13(1), 2362454. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2024.2362454>

Bobrowicz, M., Slusarczyk, A., Domagala, J., Dwojak, M., Ignatova, D., Chang, Y.-T., Iselin, C., Miazek-Zapala, N., Marhelava, K., Guenova, E., & Winiarska, M. (2020). Selective inhibition of HDAC6 sensitizes cutaneous T-cell lymphoma to PI3K inhibitors. *Oncology Letters*, 20(1), 533–540. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11587>

Cho, A., Jantschitsch, C., & Knobler, R. (2018). Extracorporeal Photopheresis—An Overview. *Frontiers in Medicine*, 5, 236. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00236>

- Coiffier, B., & Sarkozy, C. (2016). Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure-what to do? *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2016(1), 366–378. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.366>
- Cyrenne, B. M., Lewis, J. M., Weed, J. G., Carlson, K. R., Mirza, F. N., Foss, F. M., & Girardi, M. (2017). Synergy of BCL2 and histone deacetylase inhibition against leukemic cells from cutaneous T-cell lymphoma patients. *Blood*, 130(19), 2073–2083. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-792150>
- Davis, T. A., Czerwinski, D. K., & Levy, R. (1999). Therapy of B-Cell Lymphoma with Anti-CD20 Antibodies Can Result in the Loss of CD20 Antigen Expression. *Clinical Cancer Research*, 5(3), 611–615.
- Ducellier, S., Demeules, M., Letribot, B., Gaetani, M., Michaudel, C., Sokol, H., Hamze, A., Alami, M., Nascimento, M., & Apcher, S. (2024). Dual molecule targeting HDAC6 leads to intratumoral CD4+ cytotoxic lymphocytes recruitment through MHC-II upregulation on lung cancer cells. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 12(4), e007588. <https://doi.org/10.1136/jitc-2023-007588>
- Duvic, M., Evans, M., & Wang, C. (2016). Mogamulizumab for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma: Recent advances and clinical potential. *Therapeutic Advances in Hematology*, 7(3), 171–174. <https://doi.org/10.1177/2040620716636541>
- Frigault, M. J., Graham, C. E., Berger, T. R., Ritchey, J., Horick, N. K., El-Jawahri, A., Scarfò, I., Schmidts, A., Haradhvala, N. J., Wehrli, M., Lee, W.-H., Parker, A. L., Wiggin, H. R., Bouffard, A., Dey, A., Leick, M. B., Katsis, K., Elder, E. L., Dolaher, M. A., ... Maus, M. V. (2024). Phase 1 study of CAR-37 T cells in patients with relapsed or refractory CD37+ lymphoid malignancies. *Blood*, 144(11), 1153–1167. <https://doi.org/10.1182/blood.2024024104>
- Frys, S., Simons, Z., Hu, Q., Barth, M. J., Gu, J. J., Mavis, C., Skitzki, J., Song, L., Czuczman, M. S., & Hernandez-Ilizaliturri, F. J. (2015). Entinostat, a novel histone deacetylase inhibitor is active in B-cell lymphoma and enhances the anti-tumour activity of rituximab and chemotherapy agents. *British Journal of Haematology*, 169(4), 506–519. <https://doi.org/10.1111/bjh.13318>
- Fukumoto, T., Fatkhutdinov, N., Zundell, J. A., Tcyganov, E. N., Nacarelli, T., Karakashev, S., Wu, S., Liu, Q., Gabilovich, D. I., & Zhang, R. (2019). HDAC6 Inhibition Synergizes with Anti-PD-L1 Therapy in ARID1A-Inactivated Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 79(21), 5482–5489. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1302>
- Glass, B., Dohm, A. J., Truemper, L. H., Pfreundschuh, M., Bleckmann, A., Wulf, G. G., Rosenwald, A., Ziepert, M., Schmitz, N., & German High-grade Lymphoma Study Group (DSHNHL). (2017). Refractory or relapsed aggressive B-cell lymphoma failing (R)-CHOP: An analysis of patients treated on the RICOVER-60 trial. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(12), 3058–3064. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx556>
- Gracia-Hernandez, M., Yende, A. S., Gajendran, N., Alahmadi, Z., Li, X., Munoz, Z., Tan, K., Noonpalle, S., Shibata, M., & Villagra, A. (2024). Targeting HDAC6 improves anti-CD47 immunotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 43(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s13046-024-02982-4>
- Hicks, S. W., Lai, K. C., Gavrilescu, L. C., Yi, Y., Sikka, S., Shah, P., Kelly, M. E., Lee, J., Lanieri, L., Ponte, J. F., Sloss, C. M., & Romanelli, A. (2017). The Antitumor Activity of IMG529, a CD37-Targeting Antibody-Drug Conjugate, Is Potentiated by Rituximab in Non-Hodgkin Lymphoma Models. *Neoplasia*, 19(9), 661–671. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.06.001>

- Hiraga, J., Tomita, A., Sugimoto, T., Shimada, K., Ito, M., Nakamura, S., Kiyoi, H., Kinoshita, T., & Naoe, T. (2009). Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: Its prevalence and clinical significance. *Blood*, *113*(20), 4885–4893. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-175208>
- Horwitz, S. M., Koch, R., Porcu, P., Oki, Y., Moskowitz, A., Perez, M., Myskowski, P., Officer, A., Jaffe, J. D., Morrow, S. N., Allen, K., Douglas, M., Stern, H., Sweeney, J., Kelly, P., Kelly, V., Aster, J. C., Weaver, D., Foss, F. M., & Weinstock, D. M. (2018). Activity of the PI3K- δ,γ inhibitor duvelisib in a phase 1 trial and preclinical models of T-cell lymphoma. *Blood*, *131*(8), 888–898. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-802470>
- Hough, B., Lytvynova, O., Sindel, A., Willard, P., & Yazbeck, V. (2024). New and developing first line pharmacotherapies for treating non-Hodgkin lymphoma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *25*(12), 1677–1689. <https://doi.org/10.1080/14656566.2024.2393759>
- Iaconelli, J., Lalonde, J., Watmuff, B., Liu, B., Mazitschek, R., Haggarty, S. J., & Karmacharya, R. (2017). Lysine Deacetylation by HDAC6 Regulates the Kinase Activity of AKT in Human Neural Progenitor Cells. *ACS Chemical Biology*, *12*(8), 2139–2148. <https://doi.org/10.1021/acschembio.6b01014>
- Iselin, C., Chang, Y.-T., Schlaepfer, T., Fassnacht, C., Dimitriou, F., Nägeli, M., Pascolo, S., Hoetzenecker, W., Bobrowicz, M., & Guenova, E. (2021). Enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with treatment response to extracorporeal photopheresis in Sézary syndrome. *Oncoimmunology*, *10*(1), 1873530. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1873530>
- Jazirehi, A. R., Vega, M. I., & Bonavida, B. (2007). Development of Rituximab-Resistant Lymphoma Clones with Altered Cell Signaling and Cross-Resistance to Chemotherapy. *Cancer Research*, *67*(3), 1270–1281. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2184>
- Jin, H., Wang, L., & Bernards, R. (2023). Rational combinations of targeted cancer therapies: Background, advances and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, *22*(3), 213–234. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00615-z>
- Kennedy, G. A., Tey, S.-K., Cobcroft, R., Marlton, P., Cull, G., Grimmett, K., Thomson, D., & Gill, D. (2002). Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: A retrospective review. *British Journal of Haematology*, *119*(2), 412–416. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03843.x>
- Kusowska, A., Kubacz, M., Krawczyk, M., Slusarczyk, A., Winiarska, M., & Bobrowicz, M. (2022). Molecular Aspects of Resistance to Immunotherapies-Advances in Understanding and Management of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1501. <https://doi.org/10.3390/ijms23031501>
- Li, G., Tian, Y., & Zhu, W.-G. (2020). The Roles of Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.576946>
- Lopez, A. T., Bates, S., & Geskin, L. (2018). Current Status of HDAC Inhibitors in Cutaneous T-cell Lymphoma. *American Journal of Clinical Dermatology*, *19*(6), 805–819. <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0380-7>
- Maeshima, A. M., Taniguchi, H., Nomoto, J., Maruyama, D., Kim, S.-W., Watanabe, T., Kobayashi, Y., Tobinai, K., & Matsuno, Y. (2009). Histological and immunophenotypic changes in 59 cases of B-cell non-Hodgkin's lymphoma after rituximab therapy. *Cancer Science*, *100*(1), 54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.01005.x>

- Marquard, L., Gjerdrum, L. M., Christensen, I. J., Jensen, P. B., Sehested, M., & Ralfkiaer, E. (2008). Prognostic significance of the therapeutic targets histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in cutaneous T-cell lymphoma. *Histopathology*, *53*(3), 267–277. <https://doi.org/10.1111/j.0309-0167.2008.03109.x>
- Maurer, M. J., Ghesquières, H., Jais, J.-P., Witzig, T. E., Haioun, C., Thompson, C. A., Delarue, R., Micallef, I. N., Peyrade, F., Macon, W. R., Jo Molina, T., Ketterer, N., Syrbu, S. I., Fitoussi, O., Kurtin, P. J., Allmer, C., Nicolas-Virelizier, E., Slager, S. L., Habermann, T. M., ... Cerhan, J. R. (2014). Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *32*(10), 1066–1073. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.51.5866>
- Melani, C., Lakhota, R., Pittaluga, S., Phelan, J. D., Huang, D. W., Wright, G., Simard, J., Muppidi, J., Thomas, C. J., Ceribelli, M., Tosto, F. A., Yang, Y., Xu, W., Davies-Hill, T., Pack, S. D., Peer, C. J., Arisa, O., Mena, E., Lindenberg, L., ... Wilson, W. H. (2024). Combination Targeted Therapy in Relapsed Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, *390*(23), 2143–2155. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2401532>
- Ninosu, N., Melchers, S., Kappenstein, M., Booken, N., Hansen, I., Blanchard, M., Guenova, E., Assaf, C., Goerdts, S., & Nicolay, J. P. (2023). Mogamulizumab Combined with Extracorporeal Photopheresis as a Novel Therapy in Erythrodermic Cutaneous T-cell Lymphoma. *Cancers*, *16*(1), 141. <https://doi.org/10.3390/cancers16010141>
- Olejniczak, S. H., Hernandez-Ilizaliturri, F. J., Clements, J. L., & Czuczman, M. S. (2008). Acquired resistance to rituximab is associated with chemotherapy resistance resulting from decreased Bax and Bak expression. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *14*(5), 1550–1560. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1255>
- Oostindie, S. C., van der Horst, H. J., Lindorfer, M. A., Cook, E. M., Tupitza, J. C., Zent, C. S., Burack, R., VanDerMeid, K. R., Strumane, K., Chamuleau, M. E. D., Mutis, T., de Jong, R. N., Schuurman, J., Breij, E. C. W., Beurskens, F. J., Parren, P. W. H. I., & Taylor, R. P. (2019). CD20 and CD37 antibodies synergize to activate complement by Fc-mediated clustering. *Haematologica*, *104*(9), 1841–1852. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.207266>
- Ott, C. J., & Wu, C. J. (2017). HDAC Inhibitors Finally Open Up: Chromatin Accessibility Signatures of CTCL. *Cancer Cell*, *32*(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.008>
- Parveen, R., Harihar, D., & Chatterji, B. P. (2023). Recent histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Cancer*, *129*(21), 3372–3380. <https://doi.org/10.1002/cncr.34974>
- Pavlasova, G., & Mraz, M. (2020). The regulation and function of CD20: An “enigma” of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica*, *105*(6), 1494–1506. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.243543>
- Pavlidis, A., Piperi, C., & Papadavid, E. (2021). Novel therapeutic approaches for cutaneous T cell lymphomas. *Expert Review of Clinical Immunology*, *17*(6), 629–641. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2021.1919085>
- Peng, X., Yu, Z., Surineni, G., Deng, B., Zhang, M., Li, C., Sun, Z., Pan, W., Liu, Y., Liu, S., Yu, B., & Chen, J. (2023). Discovery of novel benzohydroxamate-based histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors with the ability to potentiate anti-PD-L1 immunotherapy in melanoma. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *38*(1), 2201408. <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2201408>

Piper, M., Kluger, H., Ruppin, E., & Hu-Lieskovan, S. (2023). Immune Resistance Mechanisms and the Road to Personalized Immunotherapy. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 43, e390290. https://doi.org/10.1200/EDBK_390290

Pyrzynska, B., Dwojak, M., Zerrouqi, A., Morlino, G., Zapala, P., Miazek, N., Zagodzón, A., Bojarczuk, K., Bobrowicz, M., Siernicka, M., Machnicki, M. M., Gobessi, S., Barankiewicz, J., Lech-Maranda, E., Efremov, D. G., Juszczynski, P., Calado, D., Golab, J., & Winiarska, M. (2018). FOXO1 promotes resistance of non-Hodgkin lymphomas to anti-CD20-based therapy. *Oncoimmunology*, 7(5), e1423183. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1423183>

Rangwala, S., Zhang, C., & Duvic, M. (2012). HDAC inhibitors for the treatment of cutaneous T-cell lymphomas. *Future Medicinal Chemistry*, 4(4), 471–486. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.6>

Ray, A., Das, D. S., Song, Y., Hideshima, T., Tai, Y.-T., Chauhan, D., & Anderson, K. C. (2018). Combination of a Novel HDAC 6 Inhibitor ACY-241 and Anti-PD-L1 Antibody Enhances Anti-Tumor Immunity and Cytotoxicity in Multiple Myeloma. *Leukemia*, 32(3), 843–846. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.322>

Rubio-Muniz, C. A., Sánchez-Velázquez, A., Arroyo-Andrés, J., Agud-de Dios, M., Tarín-Vicente, E. J., Falkenhain-López, D., & Ortiz-Romero, P. L. (2024). Mogamulizumab combined with extracorporeal photopheresis for the treatment of refractory mycosis fungoides and Sézary syndrome. Report of seven cases. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 38(1), e102–e105. <https://doi.org/10.1111/jdv.19457>

Seliem, R. M., Freeman, J. K., Steingart, R. H., & Hasserjian, R. P. (2006). Immunophenotypic changes and clinical outcome in B-cell lymphomas treated with rituximab. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM*, 14(1), 18–23. <https://doi.org/10.1097/01.pai.0000145130.02931.74>

Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., & Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168(4), 707–723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>

Shimizu, R., Kikuchi, J., Wada, T., Ozawa, K., Kano, Y., & Furukawa, Y. (2010). HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells. *Leukemia*, 24(10), 1760–1768. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.157>

Sugimoto, T., Tomita, A., Hiraga, J., Shimada, K., Kiyoi, H., Kinoshita, T., & Naoe, T. (2009). Escape mechanisms from antibody therapy to lymphoma cells: Downregulation of CD20 mRNA by recruitment of the HDAC complex and not by DNA methylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(1), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.059>

Takei, K., Yamazaki, T., Sawada, U., Ishizuka, H., & Aizawa, S. (2006). Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines. *Leukemia Research*, 30(5), 625–631. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2005.09.008>

Tarantelli, C., Lange, M., Gaudio, E., Cascione, L., Spriano, F., Kwee, I., Arribas, A. J., Rinaldi, A., Jourdan, T., Berthold, M., Sturz, A., Sperl, C., Margheriti, F., Scalise, L., Gritti, G., Rossi, D., Stathis, A., Liu, N., Zucca, E., ... Bertoni, F. (2020). Copanlisib synergizes with conventional and targeted agents including venetoclax in B- and T-cell lymphoma models. *Blood Advances*, 4(5), 819–829. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000844>

- Wanczyk, M., Roszczenko, K., Marcinkiewicz, K., Bojarczuk, K., Kowara, M., & Winiarska, M. (2011). HDACi—Going through the mechanisms. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *16*(1), 340–359. <https://doi.org/10.2741/3691>
- Wen, Y., Ye, S., Li, Z., Zhang, X., Liu, C., Wu, Y., Zheng, R., Xu, C., Tian, J., Shu, L., Yan, Q., Ai, F., & Ma, J. (2024). HDAC6 inhibitor ACY-1215 enhances STAT1 acetylation to block PD-L1 for colorectal cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, *73*(1), 7. <https://doi.org/10.1007/s00262-023-03624-y>
- Wenzl, K., Stokes, M. E., Novak, J. P., Bock, A. M., Khan, S., Hopper, M. A., Krull, J. E., Dropik, A. R., Walker, J. S., Sarangi, V., Mwangi, R., Ortiz, M., Stong, N., Huang, C. C., Maurer, M. J., Rimsza, L., Link, B. K., Slager, S. L., Asmann, Y., ... Novak, A. J. (2024). Multiomic analysis identifies a high-risk signature that predicts early clinical failure in DLBCL. *Blood Cancer Journal*, *14*(1), 100. <https://doi.org/10.1038/s41408-024-01080-0>
- Winiarska, M., Bojarczuk, K., Pyrzynska, B., Bil, J., Siernicka, M., Dwojak, M., Bobrowicz, M., Miazek, N., Zapala, P., Zagodzón, A., Krol, M., Syta, A., Podrzywalow-Bartnicka, P., Pilch, Z., Dabrowska-Iwanicka, A., Juszczyński, P., Efremov, D. G., Slabicki, M., Zenz, T., ... Golab, J. (2014). Inhibitors of SRC kinases impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *mAbs*, *6*(5), 1300–1313. <https://doi.org/10.4161/mabs.32106>
- Winiarska, M., Nowis, D., Bil, J., Glodkowska-Mrowka, E., Muchowicz, A., Wanczyk, M., Bojarczuk, K., Dwojak, M., Firczuk, M., Wilczek, E., Wachowska, M., Roszczenko, K., Miaczynska, M., Chlebowska, J., Basak, G. W., & Golab, J. (2012). Prenyltransferases regulate CD20 protein levels and influence anti-CD20 monoclonal antibody-mediated activation of complement-dependent cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(38), 31983–31993. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374751>
- Wozniak, M. B., Villuendas, R., Bischoff, J. R., Aparicio, C. B., Martínez Leal, J. F., de La Cueva, P., Rodriguez, M. E., Herreros, B., Martin-Perez, D., Longo, M. I., Herrera, M., Piris, M. A., & Ortiz-Romero, P. L. (2010). Vorinostat interferes with the signaling transduction pathway of T-cell receptor and synergizes with phosphoinositide-3 kinase inhibitors in cutaneous T-cell lymphoma. *Haematologica*, *95*(4), 613–621. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.013870>
- Wu, C.-H., Yang, C.-Y., Wang, L., Gao, H.-X., Rakhshandehroo, T., Afghani, S., Pincus, L., Balassanian, R., Rubenstein, J., Gill, R., Bandyopadhyay, S., McCormick, F., Moasser, M., & Ai, W. Z. (2021). Cutaneous T-Cell Lymphoma PDX Drug Screening Platform Identifies Cooperation between Inhibitions of PI3K α/δ and HDAC. *The Journal of Investigative Dermatology*, *141*(2), 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.05.110>
- Xu-Monette, Z. Y., Li, L., Byrd, J. C., Jabbar, K. J., Manyam, G. C., Maria de Winde, C., van den Brand, M., Tzankov, A., Visco, C., Wang, J., Dybkaer, K., Chiu, A., Orazi, A., Zu, Y., Bhagat, G., Richards, K. L., Hsi, E. D., Choi, W. W. L., Huh, J., ... Young, K. H. (2016). Assessment of CD37 B-cell antigen and cell of origin significantly improves risk prediction in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, *128*(26), 3083–3100. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-715094>
- Zain, J., & O'Connor, O. A. (2010). Targeting histone deacetylases in the treatment of B- and T-cell malignancies. *Investigational New Drugs*, *28 Suppl 1*(Suppl 1), S58-78. <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9591-3>
- Zhao, L., Hsiao, T., Stonesifer, C., Daniels, J., Garcia-Saleem, T. J., Choi, J., Geskin, L., Rook, A. H., & Wood, G. S. (2022). The Robust Tumoricidal Effects of Combined BET/HDAC Inhibition in Cutaneous

T-Cell Lymphoma Can Be Reproduced by Δ Np73 Depletion. *The Journal of Investigative Dermatology*, 142(12), 3253-3261.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.06.005>

Zhao, W.-L., Wang, L., Liu, Y.-H., Yan, J.-S., Leboeuf, C., Liu, Y.-Y., Wu, W.-L., Janin, A., Chen, Z., & Chen, S.-J. (2007). Combined effects of histone deacetylase inhibitor and rituximab on non-Hodgkin's B-lymphoma cells apoptosis. *Experimental Hematology*, 35(12), 1801–1811. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.06.009>