

1. Imię i nazwisko

Małgorzata Firczuk

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

2007: stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

Praca doktorska: „Structural and biochemical studies of LAS enzymes”, obrona w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie”.

Promotor - Prof. dr hab. Matthias Bochtler

2003: tytuł magistra farmacji, specjalność analityka kliniczna, Wydział Farmacji Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku

Praca magisterska: „Charakterystyka interakcji między polimerazą RNA *E. coli* a promotorem A1 faga T7, zmodyfikowanym w regionie –10”

Promotor – Prof. dr hab. Władysław Werel

2002: tytuł magistra biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku

Praca magisterska: „Optymalizacja transferu na błonę PVDF i elucja z żelu mitochondrialnej polimerazy DNA z drożdży *S. cerevisiae*”

Promotor – Prof. dr hab. Jarosław Marszałek

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2016-obecnie: adiunkt naukowy w Zakładzie Immunologii na Wydziale Lekarskim WUM, kierownik dwóch projektów badawczych finansowanych przez NCN oraz lider 7-osobowej grupy badawczej

2012 – 2016: adiunkt w Zakładzie Immunologii Centrum Biostruktury WUM, uczestnik stażu podoktorskiego w programie BASTION, finansowanym w ramach 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej

2009 – 2012: adiunkt w Zakładzie Immunologii Centrum Biostruktury WUM, uczestnik stażu podoktorskiego w programie TEAM Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej

2007-2009: staż podoktorski, Laboratorium Biologii Strukturalnej, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

2003-2007: studia doktoranckie, Laboratorium Biologii Strukturalnej, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

4. Omówienie osiągnięć

4.1. Tytuł osiągnięcia:

„Identyfikacja i badanie mechanizmów działania nowych terapii prooksydacyjnych w modelach przedklinicznych nowotworów”

4.2. Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

Prace oryginalne:

1. **Firczuk M**, Gabrysiak M, Barankiewicz J, Domagala A, Nowis DA, Kujawa M, Jankowska-Steifer E, Wachowska MD, Głodkowska-Mrowka E, Korsak B, Winiarska M, Golab J.

„GRP78-targeting subtilase cytotoxin sensitizes cancer cells to photodynamic therapy”.
Cell Death Dis. 2013;4:e741.

IF 2013: 5,177

2. Trzeciecka A, Klossowski S, Bajor M, Zagodzón R, Gaj P, Muchowicz A, Malinowska A, Czerwoniec A, Barankiewicz J, Domagala A, Chlebowska J, Prochorec-Sobieszek M, Winiarska M, Ostaszewski R, Gwizdalska I, Golab J, Nowis D and **Firczuk M (autor korespondujący)**.

“Dimeric peroxiredoxins are druggable targets in human Burkitt lymphoma”.
Oncotarget. 2016;7(2):1717-31.

IF 2016: 5,68

3. Gabrysiak M, Wachowska M, Barankiewicz J, Pilch Z, Ratajska A, Skrzypek E, Winiarska M, Domagala A, Rygiel TP, Jozkowicz A, Boon L, Golab J, **Firczuk M (autor korespondujący)**.

„Low dose of GRP78-targeting subtilase cytotoxin improves the efficacy of photodynamic therapy in vivo”.

Oncol Rep. 2016;35(6):3151-8.

IF 2016: 2,662

4. Domagala A, Stachura J, Gabrysiak M, Muchowicz A, Zagodzón R, Golab J, **Firczuk M (autor korespondujący)**. “Inhibition of autophagy sensitizes cancer cells to Photofrin-based photodynamic therapy”.

BMC Cancer. 2018;18(1):210.

IF 2018: 2,933

5. Graczyk-Jarzynka A, Goral A, Muchowicz A, Zagodzón R, Winiarska M, Bajor M, Trzeciecka A, Fidyk K, Krupka JA, Cyran J, Szczygiel K, Efremov DG, Gobessi S, Jagielski A, Siudakowska K, Bobrowicz M, Kłopotowska M, Barankiewicz J, Malenda A, Lech-Maranda E, Miazek-Zapala N, Skarzynski PH, Domagala A, Golab J, **Firczuk M (autor korespondujący)**.

„Inhibition of thioredoxin-dependent H₂O₂ removal sensitizes malignant B-cells to pharmacological ascorbate”.

Redox Biol. 2019; 21:101062.

IF 2019: 7,793

6. Fidyk K, Pastorczak A, Goral A, Szczygiel K, Fendler W, Muchowicz A, Bartłomiejczyk MA, Madzio J, Cyran J, Graczyk-Jarzynka A, Jansen E, Patkowska E, Lech-Maranda E, Pal D, Blair H, Burdzinska A, Pedzisz P, Głodkowska-Mrowka E, Demkow U, Gawle-Krawczyk K, Matysiak M, Winiarska M, Juszczynski P, Młynarski W, Heidenreich O, Golab J, **Firczuk M (autor korespondujący)**.

„Targeting the thioredoxin system as a novel strategy against B cell acute lymphoblastic leukemia”. *Molecular oncology*. 2019;13(5):1180-1195.

IF 2019: 5,962

Prace przeglądowe:

7. **Firczuk M**, Winiarska M, Szokalska A, Jodłowska M, Swiech M, Bojarczuk K, Salwa P, and Nowis D. Approaches to improve photodynamic therapy of cancer. *Frontiers in Bioscience*. 2011;16:208-24.

IF 2011: 3,520

8. **Firczuk M**, Bajor M, Graczyk-Jarzynka A, Fidyk K, Goral A, Zagózdzon R. Harnessing altered oxidative metabolism in cancer by augmented prooxidant therapy”. *Cancer Lett*. 2020;471:1-11.

IF 2011: 6,508

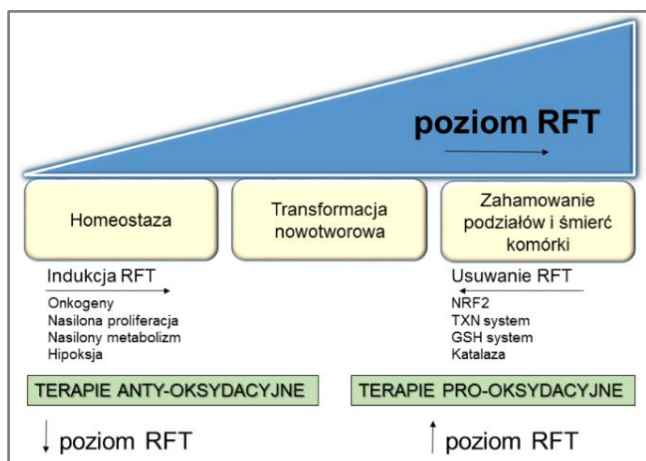
Sumaryczny IF cyklu publikacji: 40,235

4.3. Opis wyników badań:

Terapie prooksydacyjne i ich zastosowanie w leczeniu nowotworów

Metabolizm redoks w nowotworach

Reaktywne formy tlenu (RFT) wytwarzane są na skutek tlenowego metabolizmu komórek i w stężeniach fizjologicznych pełnią funkcje przekazywania sygnałów. Zaburzenie równowagi między wytwarzaniem RFT a ich usuwaniem prowadzi do stresu oksydacyjnego. Liczne badania wykazały, że w komórkach nowotworowych dochodzi do zwiększenia stężenia RFT [1]. Wynika to z przyspieszonego metabolizmu komórek nowotworowych, związanego z ich niekontrolowaną proliferacją oraz aktywnością onkogenów. Wpływ stresu oksydacyjnego na komórki nowotworowe zależy jednak od poziomu jego nasilenia. Umiarkowanie podwyższone stężenia RFT aktywują proliferację komórek i mogą przyczynić się do transformacji nowotworowej. Z drugiej strony, znacznie zwiększona ilość RFT powoduje uszkodzenia makrocząsteczek i indukuje śmierć komórki. W związku z powyższym, rozwijane i testowane w badaniach są dwie przeciwstawne strategie przeciwnowotworowe: antyoksydacyjna i prooksydacyjna (**Ryc. 1**).



Ryc.1 Wpływ RFT na komórki i proces nowotworzenia.

Wiele obserwacji klinicznych wskazuje, że o ile zastosowanie antyoksydantów może być korzystne w profilaktyce nowotworów, o tyle w leczeniu zaawansowanych nowotworów nie przynosi korzyści a nawet może osłabiać

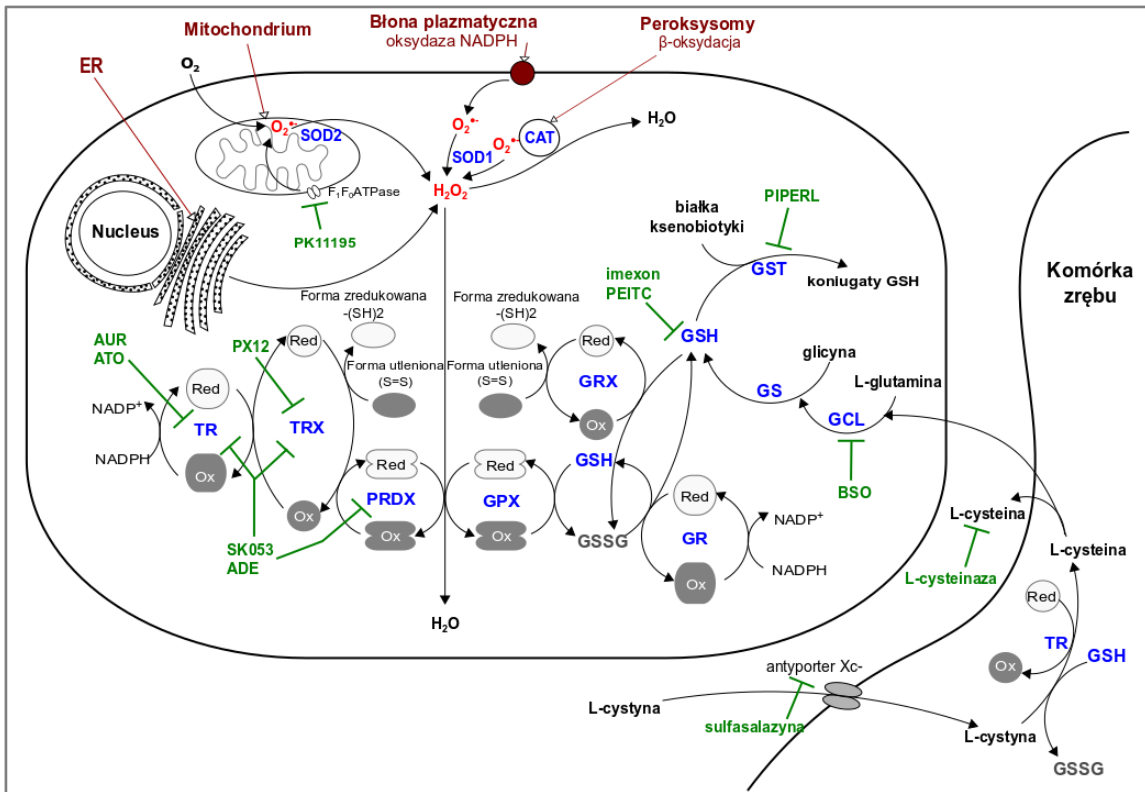
działanie innych terapii [2, 3]. Znacznie lepsze efekty w leczeniu nowotworów uzyskuje się poprzez zastosowanie terapii prooksydacyjnych.

Terapie prooksydacyjne w leczeniu nowotworów, układy antyoksydacyjne

Mechanizm działania terapii prooksydacyjnych polega na zwiększeniu ilości RFT w komórkach nowotworowych w wyniku zaburzenia homeostazy redoks, co powoduje oksydacyjne uszkodzenie makromolekuł i indukuje śmierć komórek nowotworowych. Efekt prooksydacyjny można osiągnąć poprzez zewnątrz- lub wewnątrzkomórkową zwiększoną produkcję RFT, bądź poprzez zahamowanie układów antyoksydacyjnych.

Do najważniejszych enzymatycznych układów antyoksydacyjnych w komórkach eukariotycznych należą: katalaza, dysmutazy ponadtlenkowe, układ glutationu (GSH) oraz układ tioredoksyny (TRX), którego dotyczył przedstawiony cykl badań. Układ TRX składa się z: tioredoksyny (TRX), reduktazy tioredoksyny (TR) oraz NADPH [4]. TRX katalizuje redukcję mostków dwusiarczkowych w substratach białkowych. W czasie reakcji redukcji, sąsiadujące ze sobą dwie cysteiny obecne w centrum aktywnym TRX utleniają się i tworzą mostek dwusiarczkowy. Aby mogło dojść do kolejnego cyklu katalitycznego, motek dwusiarczkowy w centrum aktywnym TRX musi zostać zredukowany przez TR zależną od NADPH. W komórkach ssaczych występują dwa układy TRX: cytoplazmatyczny (TRX1 i TR1) oraz mitochondrialny (TRX2 i TR2). Substratami TRX są między innymi czynniki transkrypcyjne (NFκB, AP1), reduktaza rybonukleotydomowa oraz peroksyredoksyny (PRDX) – enzymy, które katalizują redukcję nadtlenczków [4, 5]. U ssaków występuje 6 izoform peroksyredoksyn (PRDX1-6) o różnej lokalizacji wewnątrzkomórkowej: PRDX1, PRDX2, PRDX6 znajdują się głównie w cytoplazmie, PRDX3 i PRDX5 w mitochondriach, a PRDX4 jest białkiem występującym w siateczce śródplazmatycznej. PRDX1-4 należą do grupy peroksyredoksyn 2-cysteinowych i funkcjonują jako homodimery typu „head to tail”, co oznacza, że N-koniec jednej cząsteczki znajduje się obok C-końca drugiej cząsteczki. Centrum katalityczne dimeru stanowią dwie silnie konserwowane cysteiny, pochodzące z dwóch różnych monomerów (w PRDX1 są to Cys-52 i Cys-173). Reakcja redukcji nadtlenczków przebiega w dwóch etapach. W pierwszym etapie, grupa tiolowa Cys-52 reaguje z tlenem w nadtlenczku wodoru (H_2O_2) i utlenia się do kwasu sulfonowego. W drugim etapie, grupa tiolowa Cys-173 pochodzącej z drugiej podjednostki, reaguje z kwasem sulfonowym na Cys-52 i powstaje wiązanie dwusiarczkowe. Aby zakończyć cykl katalityczny, wiązanie dwusiarczkowe utworzone w miejscu aktywnym PRDX1 jest redukowane przez układ TRX [6]. PRDX, wraz z układem TRX, tworzą układ enzymatyczny, który chroni komórki przed stresem oksydacyjnym. Jednakże rola PRDX wykracza znacznie poza metabolizm H_2O_2 . Poprzez bezpośrednie interakcje z innymi białkami stabilizowane tworzeniem

mostków dwusiarczkowych, PRDX modulują szlaki przekazywania sygnałów w komórkach. Źródła RFT oraz główne układy antyoksydacyjne występujące w komórkach ssaczy przedstawione są na **Ryc. 2**.



Ryc.2 Źródła RFT, układy antyoksydacyjne i ich inhibitory. Główne źródła RFT (na czerwono): mitochondrium, peroksysomy, ER - retikulum endoplazmatyczne, oksydaza NADPH. Enzymy należące do układu tioredoksyny: TRX - tioredoksyna, TR - reduktaza tioredoksyny, PRDX - peroksyredoksyna. Elementy układu glutationowego: GSH - zredukowany glutation, GSSG - utleniony glutation, GPX - peroksydaza glutationowa, GRX - glutaredoksyny, GR - reduktaza glutationowa, GST - S-transferaza glutationowa. Enzymy zaangażowane w syntezę GSH: GCL - ligaza γ -glutamylcysteinowa, GS - syntetaza glutationowa. Inhibitory układów antyoksydacyjnych (w kolorze zielonym): ADE - adenantyna, ATO - trójtlenek arsenu, AUR - auranofina, BSO - butioninosulfoksymina, imekson, L-cysteinaza, PEITC - izotiocyjanian feniloetylu, PIPERL -piperlongumina, sulfasalazyna.

Skuteczność wielu metod stosowanych obecnie w leczeniu nowotworów, takich jak radioterapia, chemioterapia, czy terapia fotodynamiczna, związana jest z wytwarzaniem RFT. Ponadto, niektóre związki zdolne do zewnątrzkomórkowego generowania RFT w badaniach przedklinicznych wykazują działanie przeciwnowotworowe. Należą do nich niektóre polifenole, karotenoidy, indole, a także L-askorbinian. Z drugiej strony, efekt prooksydacyjny w komórkach nowotworowych można uzyskać poprzez zablokowanie układów antyoksydacyjnych, odpowiedzialnych za usuwanie RFT. W naszych badaniach skupiliśmy się na trzech różnych przeciwnowotworowych strategiach prooksydacyjnych:

terapii fotodynamicznej, L-askorbinianie oraz inhibitorach enzymów antyoksydacyjnych związanych z układem tioredoksyny.

Terapia fotodynamiczna

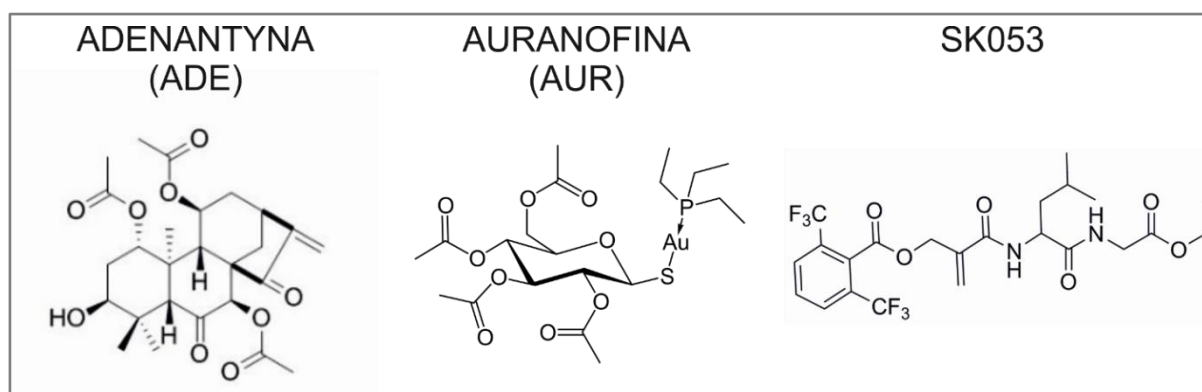
Terapia fotodynamiczna (PDT, ang. Photodynamic therapy) jest klinicznie zatwierdzoną terapią przeciwnowotworową. Unikalny mechanizm działania PDT polega na systemowym lub miejscowym podaniu związku fotouczulającego (fotouczulacza), który jest następnie aktywowany za pomocą światła o określonej energii. W wyniku aktywacji fotouczulacza wytwarzane są RFT, które indukują uszkodzenie makrocząsteczek i prowadzą do zniszczenia komórek nowotworowych. Aktywność przeciwnowotworowa PDT zależy jednak nie tylko od jej bezpośredniej cytotoksyczności, ale także od niszczenia unaczynienia guza oraz indukcji odpowiedzi zapalnej, która przyczynia się do rozwoju przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej i może prowadzić do całkowitego zniszczenia nowotworu [7]. Pierwszym związkiem fotouczulającym zarejestrowanym do leczenia nowotworów była fotofryna. Jest to fotouczulacz należący do grupy porfiryn. Obecnie stosowany jest w różnych krajach do leczenia między innymi raka pęcherza, wczesnych stadiów raka oskrzeli, płuc, a także stanów przedrakowych, takich jak przełyk Barretta [8].

L-askorbinian i jego działanie przeciwnowotworowe

L-askorbinian (L-ASC), powszechnie znany jako witamina C, jest nietoksycznym związkiem, który w stężeniach fizjologicznych ($\sim 50 \mu\text{M}$ w ludzkiej surowicy [9]) ma działanie antyoksydacyjne. Maksymalne stężenie L-ASC w surowicy po podaniu doustnym wynosi $200 \mu\text{M}$ i nie wywiera efektu przeciwnowotworowego [10]. Jednak w bardzo wysokich stężeniach (rzędu mM) osiągalnych jedynie po podaniu pozajelitowym (farmakologiczny L-ASC), L-ASC wykazuje działanie przeciwnowotworowe, które wynika z jego właściwości prooksydacyjnych [11, 12]. Badania kliniczne wykazały, że L-ASC można bezpiecznie podawać chorym na nowotwory w dużych dawkach. Co ważne, najnowsze doniesienia pokazują, że L-ASC podany dożylnie w wysokich dawkach nasila działanie chemio- i radioterapii u chorych na raka [13, 14]. Według wcześniejszych publikacji mechanizm działania przeciwnowotworowego L-ASC wynika z jego zdolności do generowania RFT. Wykazano, że L-ASC w obecności jonów metali przejściowych obecnych w płynie pozakomórkowym lub w medium hodowlanym, wytwarza H_2O_2 . Ponieważ H_2O_2 jest stosunkowo stabilny i łatwo dyfunduje przez błonę plazmatyczną, wnika on do komórek i w stężeniach powyżej $100 \mu\text{M}$ wywiera działanie cytotoksyczne. H_2O_2 wytwarzany pozakomórkowo jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za cytotoksyczność L-ASC [11, 13].

Blokowanie enzymów antyoksydacyjnych jako prooksydacyjna strategia przeciwnowotworowa

Coraz więcej badań wskazuje, że blokowanie enzymów antyoksydacyjnych jest selektywnie toksyczne dla komórek nowotworowych [15]. Inhibitory enzymów antyoksydacyjnych indukują w komórkach nowotworowych stres oksydacyjny i wykazują aktywność przeciwnowotworową w badaniach przedklinicznych [16, 17] oraz w badaniach klinicznych [18]. Większość znanych inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych układu TRX to związki zawierające w swojej strukturze centrum elektrofilowe, będące miejscem kowalencyjnego wiązania się do cystein bądź selenocystein w centrach aktywnych blokowanych enzymów. Wiąże się to z dość szerokim spektrum działania tych związków i ich stosunkowo małą selektywnością względem określonych enzymów antyoksydacyjnych. W swoich badaniach używałam następujących inhibitorów układu TRX: auranofiny (AUR), adenantyny (ADE), oraz SK053 (**Ryc. 3**).



Ryc. 3 Inhibitory układów antyoksydacyjnych używane w naszym cyklu badań.

AUR jest związkiem metaloorganicznym zawierającym złoto (Au). Hamuje ona aktywność zarówno cytoplazmatycznej TR1, jak i TR2 zlokalizowanej w mitochondriach [19]. AUR stosowana jest w klinice jako lek przeciwreumatyczny i wykazuje działanie przeciwnowotworowe w badaniach przedklinicznych [20]. ADE jest związkiem pochodzenia naturalnego, który wiąże i blokuje aktywność PRDX1 i PRDX2, powoduje różnicowanie się komórek ostrej białaczki promielocytowej i wykazuje działanie przeciwbiałaczkowe w badaniach przedklinicznych [17]. SK053 to peptydomimetyk o prooksydacyjnym działaniu przeciwnowotworowym, zaprojektowany i zsyntetyzowany przez nasz zespół we współpracy z Instytutem Chemii Organicznej PAN [16]. Początkowo zakładaliśmy, że głównym celem działania SK053 jest TRX. Dalsze badania prowadzone w ramach mojego projektu Iuventus Plus (IP1/2011/71) wykazały, że białkami wiążącymi SK053 są PRDX1-4.

Celem przedstawionego cyklu badań było:

- I. Zbadanie mechanizmów cytoprotekcyjnych i zwiększenie skuteczności terapii fotodynamicznej w badaniach przedklinicznych**
- II. Identyfikacja celów molekularnych dla nowych związków o działaniu przeciwnowotworowym**
- III. Zbadanie homeostazy redoks i roli enzymów antyoksydacyjnych jako potencjalnych celów w terapii nowotworów wywodzących się z limfocytów B.**

I. Zbadanie mechanizmów cytoprotekcyjnych i zwiększenie skuteczności terapii fotodynamicznej w badaniach przedklinicznych

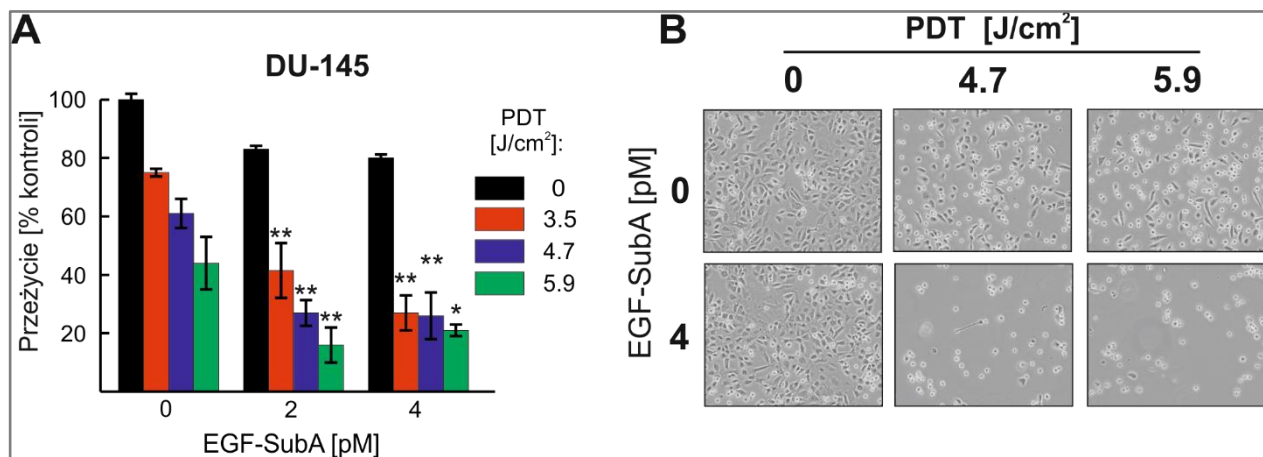
Działanie cytotoksyczne PDT związane jest z wytwarzaniem RFT. Wysokie dawki PDT powodują oksydacyjne uszkodzenia makromolekuł i prowadzą do śmierci komórek. Jednak z powodu ograniczonej penetracji światła przez tkanki, komórki nowotworowe zlokalizowane głębiej w masie guza uzyskują suboptymalne dawki światła, niewystarczające do zniszczenia komórek nowotworowych. Komórki, które otrzymały zbyt niską dawkę PDT uruchamiają mechanizmy cytoprotekcyjne, które sprzyjają przeżyciu nowotworu i przyczyniają się do oporności na PDT. Poznano wiele mechanizmów cytoprotekcyjnych osłabiających skuteczność PDT [7, 8]. W swoich badaniach skupiłam się na dwóch ważnych mechanizmach cytoprotekcyjnych indukowanych w wyniku PDT: (1) ekspresji białek opiekuńczych, w szczególności białka regulowanego glukozą o masie 78 kDa (GRP78, ang. Glucose Regulated Protein 78) oraz (2) autofagii.

Białko GRP78 i jego selektywna degradacja

GRP78, inaczej białko wiążące immunoglobulinę (Bip, z ang. Immunoglobulin binding protein), jest białkiem opiekuńczym siateczki śródplazmatycznej i kluczowym regulatorem szlaków sygnałowych indukowanych w komórkach w odpowiedzi na stres siateczki. Oprócz zaangażowania w fałdowanie białek w siateczce śródplazmatycznej, GRP78 ma właściwości cytoprotekcyjne i antyapoptotyczne. Zwiększenie ilości GRP78 w komórkach nowotworowych koreluje z zaawansowaniem choroby nowotworowej i gorszym przeżyciem chorych na różne rodzaje nowotworów. Ponadto, GRP78 może przyczyniać się do oporności na terapię, w tym na terapię prooksydacyjną. Z tego względu, zablokowanie aktywności białka GRP78 lub jego selektywna degradacja mogą być jedną ze strategii poprawiających skuteczność terapii przeciwnowotworowych [21]. Większość inhibitorów GRP78 ma szerokie spektrum aktywności i wpływa także na inne procesy zachodzące w komórce. Jednym z wyjątków jest bakteryjna cytotoksyna SubAB5 o aktywności swoistej proteazy, której jedynym znanym substratem jest białko GRP78 [22]. Ze względu na toksyczność holotoksyny (złożonej z katalitycznej podjednostki A i 5 podjednostek B odpowiedzialnych za wnikanie do komórek), wyprodukowane zostało białko fuzyjne złożone z podjednostki A (SubA) oraz ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, ang. Epithelial Growth Factor). Białko to jest selektywne względem komórek wykazujących ekspresję receptora dla EGF [23].

Cytotoksyna EGF-SubA uwrażliwia komórki nowotworowe na terapię fotodynamiczną

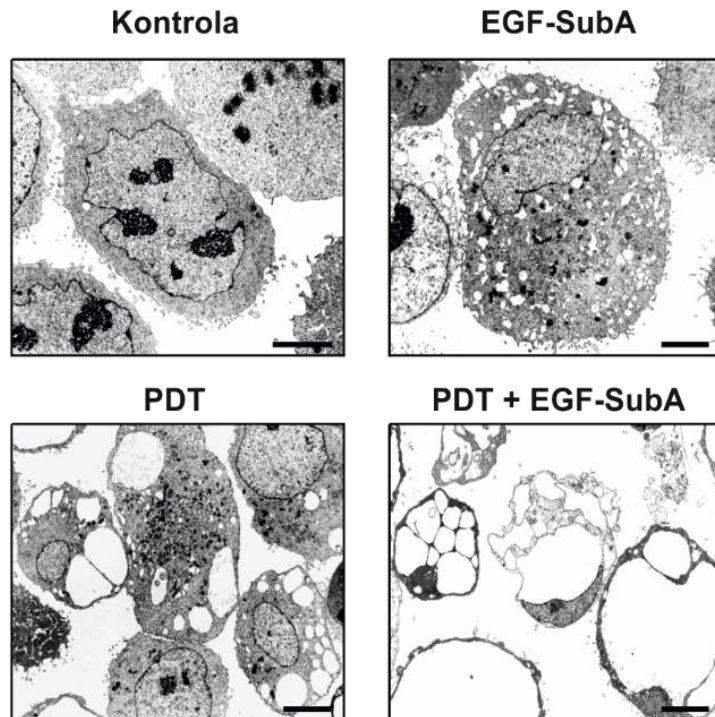
W badaniach *in vitro* z użyciem ustalonych linii komórkowych ludzkiego raka stercza i raka płuc wykazaliśmy, że PDT indukuje ekspresję genu *GRP78*, co prowadzi do zwiększenia ilości białka *GRP78* w komórkach. Zwiększenie ilości *GRP78*, poprzez wprowadzenie do komórek wektora kodującego gen *GRP78* pod kontrolą konstytutywnie aktywnego promotora CMV, znacznie zwiększyło oporność komórek na PDT. Z kolei już częściowe zmniejszenie ilości *GRP78*, poprzez wprowadzenie do komórek siRNA celującego w *GRP78*, uwrażliwiło komórki na PDT. W oparciu o powyższe wyniki postawiliśmy hipotezę, że selektywna degradacja *GRP78* za pomocą EGF-SubA poprawi skuteczność PDT. Wpływ cytotoksyny badaliśmy w modelach *in vitro*, na ustalonych liniach komórkowych guzów litych, które wykazują ekspresję receptora dla EGF. Zaobserwowaliśmy silny, synergistyczny efekt połączenia cytotoksyny EGF-SubA z PDT, zarówno w komórkach zdolnych do indukcji apoptozy (linia raka płuca, SW900), jak i w komórkach niezdolnych do indukcji apoptozy ze względu na brak pro-apoptotycznego białka BAX (linia raka stercza, DU145) (Ryc. 4).



Ryc. 4 Cytotoksyna EGF-SubA potęguje cytotoksyczne działanie PDT. Ludzkie komórki raka stercza DU-145 inkubowano przez 24 h z fotofryną i/lub EGF-SubA a następnie naświetlano za pomocą promieniowania o długości fali 630 nm. A. Po 24 h od naświetlenia zmierzono efekt cytotoksyczny za pomocą barwienia fioletem krystalicznym, n=2-3 powtórzenia \pm SD, * p <0,05, ** p <0,001 względem komórek traktowanych tylko PDT. B. Zdjęcia spod mikroskopu z kontrastem fazowym, wykonane po 24 h od naświetlenia komórek.

W komórkach DU145 poddanych PDT w obecności EGF-SubA, pomimo indukcji pro-apoptotycznych szlaków sygnałowych aktywowanych stresem siateczki śródplazmatycznej, nie zaobserwowaliśmy markerów indukcji apoptozy takich jak translokacja fosfatydyloseryny na błonę plazmatyczną, czy fragmentacja DNA. Co ciekawe, w komórkach SW900, choć PDT indukowała apoptozę a toksyna EGF-SubA zwiększała działanie cytotoksyczne PDT, nie wynikało ono z nasilenia apoptozy. W żadnej z badanych linii komórkowych zastosowanie pan-inhibitora kaspaz, z-vad, nie odwracało cytotoksycznego

działania kombinacji PDT z EGF-SubA. Powyższe dane wskazują, że apoptoza nie jest głównym rodzajem śmierci komórkowej wywołanej przez terapię skojarzoną. W obu rodzajach linii komórkowych, a w szczególności w komórkach nie zdolnych do indukcji apoptozy, cytotoksyna EGF-SubA w połączeniu z PDT indukowały masywną wakuolizację komórek, która prowadziła do śmierci komórkowej o bardzo nietypowym przebiegu (**Ryc. 5**). Wyniki wyżej opisanych badań opublikowaliśmy w czasopiśmie *Cell Death and Disease* (Firczuk i wsp. [24]).



Ryc. 5 Cytotoksyna EGF-SubA nasila wakuolizację komórek DU-145 potraktowanych PDT. Komórki DU-145 poddano PDT i/lub EGF-SubA jak opisano w Ryc. 4. Komórki utrwalono i zobrazowano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego, skala 5 μm .

Obiecujące wyniki badań *in vitro* zachęciły nas do zbadania wpływu cytotoksyny na aktywność przeciwnowotworową PDT *in vivo*, w dwóch modelach mysich, w układach ksenogenicznym i syngenicznym. W modelu ksenogenicznym, w którym ludzkie komórki DU-145 podaliśmy myszom z niedoborem odporności (SCID), cytotoksyna EGF-SubA nie wpłynęła znacząco na skuteczność PDT. Wiadomo jednak, że oprócz bezpośredniego efektu cytotoksycznego, jednym z kluczowych elementów działania PDT jest indukcja przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Aby ocenić wpływ EGF-SubA na skuteczność PDT u zwierząt z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym, mysie komórki raka okrężnicy CT26 zmodyfikowaliśmy wektorem lentiwirusowym, umożliwiającym stabilną ekspresję ludzkiego receptora EGFR i podaliśmy je myszom BALB/c. W modelu tym, niskie dawki toksyny EGF-SubA wzmocniły przeciwnowotworowe działanie PDT w sposób zależny od obecności limfocytów T CD8⁺. W wyższych dawkach, cytotoksyna EGF-SubA wpływała negatywnie na liczbę i funkcję różnych

populacji leukocytów i nie wykazywała efektu nasilającego PDT. Wyniki wyżej opisanych badań opublikowaliśmy w czasopiśmie *Oncology Reports* (Gabrysiak i wsp. [25]).

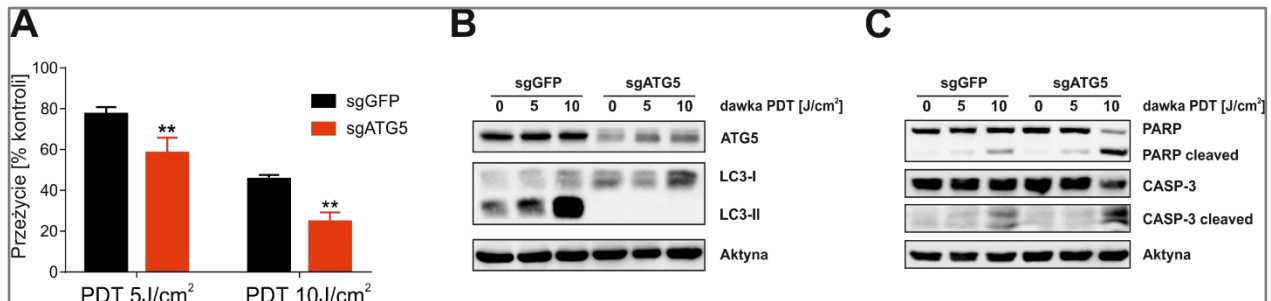
Zablokowanie autofagii uwrażliwia komórki nowotworowe na terapię fotodynamiczną

Innym mechanizmem cytoprotekcyjnym, który może być indukowany przez komórki w warunkach stresu oksydacyjnego, jest autofagia. Aktywację autofagii w wyniku PDT zaobserwowano we wcześniejszych badaniach z zastosowaniem różnych fotouczulaczy, jednak wpływ tego procesu na skuteczność PDT był niejednoznaczny i zależał od rodzaju komórek, dawki światła, dostępu do tlenu, a także rodzaju fotouczulacza i jego lokalizacji subkomórkowej [8]. Poprzednie doniesienia oceniające rolę autofagii w kontekście terapii fotodynamicznej dotyczyły głównie fotouczulaczy gromadzących się w mitochondriach lub w siateczce śródplazmatycznej [26]. W naszych badaniach skupiliśmy się na ocenie roli autofagii w skuteczności PDT z użyciem fotofryny, która lokalizuje się głównie w błonach komórkowych.

Autofagia jest zachowanym ewolucyjnie procesem katabolicznym, w którym uszkodzone organelle lub białka kierowane są do degradacji w lizosomach. Chociaż niewielką aktywność procesu autofagii obserwuje się w komórkach konstytutywnie, jest ona przede wszystkim silnie indukowana pod wpływem bodźców zakłócających homeostazę komórkową. W procesie autofagii, białka i organelle cytoplazmatyczne otaczane są podwójną błoną pochodzącą z siateczki śródplazmatycznej, która ulega wydłużeniu i zamknięciu w pęcherzyk zwany autofagosomem. Następnie autofagosom łączy się z lizosomem i zawartość pęcherzyka ulega strawieniu przez enzymy lizosomalne. Podczas autofagii białko LC3-I (ang. microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B) przekształcane jest w lipidowaną formę LC3-II, która wnika do błony autofagosomalnej. Cały szlak koordynowany jest przez dwa systemy koniugacji podobne do szlaku ubikwitynacji, które wykorzystują geny związane z autofagią (ATG –ang. autophagy-related genes). Kilka genów ATG ma kluczowe znaczenie dla konwersji LC3-I do LC3-II, w tym ATG5 [27, 28].

W naszych badaniach nad rolą procesu autofagii w PDT wykorzystaliśmy ludzkie linie komórkowe: raka szyjki macicy (HeLa) oraz raka piersi (MCF7). Aby ocenić proces autofagii, zoptymalizowaliśmy obrazowanie charakterystycznych skupisk białka LC3-II w błonie za pomocą immunofluorescencji. Ponadto, stworzyliśmy linię komórkową HeLa niezdolną do indukcji autofagii, poprzez wyłączenie ekspresji kluczowego dla tego procesu białka ATG5. Wykazaliśmy, że pod wpływem PDT z udziałem fotouczulacza fotofryny, dochodzi do silnej indukcji autofagii. W komórkach pozbawionych ATG5 i niezdolnych do indukcji autofagii, zaobserwowaliśmy nasilony efekt cytotoksyczny

PDT (Ryc. 6). Wyniki powyższych badań opublikowaliśmy z czasopiśmie *BMC Cancer* (Domagala i wsp. [29]).

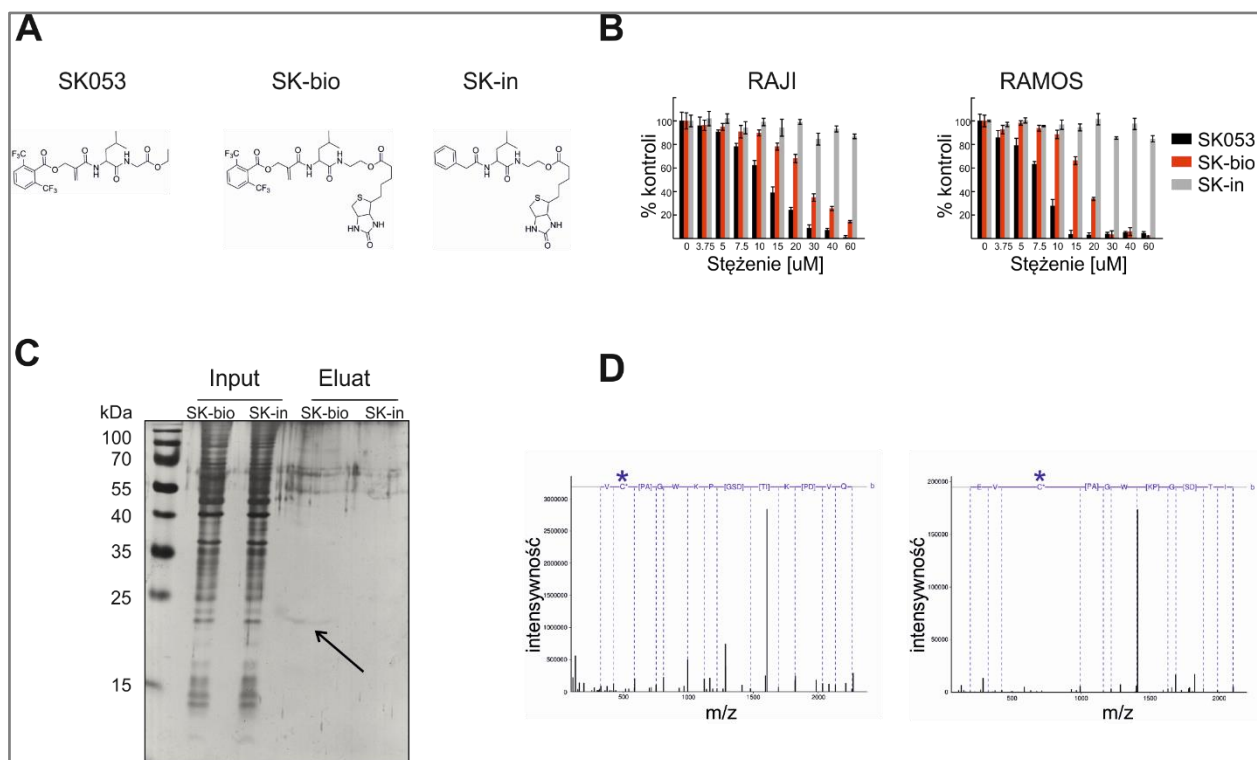


Ryc.6 Zablockowanie autofagii uwrażliwia komórki HeLa na PDT. Za pomocą metody CRISPR-Cas9 wygenerowano linię komórkową HeLa pozbawioną funkcjonalnego genu ATG5 i niezdolną do procesu autofagii (HeLa-sgATG5). Komórki HeLa-sgATG5 i komórki kontrolne HeLa-sgGFP poddano PDT *in vitro*. Po 24 h od naświetlenia oceniono przeżycie komórek za pomocą barwienia fioletem krystalicznym (A), a poziomy białek ATG5, LC3-I i LC3-II (B) oraz indukcję apoptozy (trawiony PARP, trawiona kaspaza 3) (C) oceniono metodą Western blotting.

Podsumowując, w toku badań ustaliliśmy, że skuteczność przeciwnowotworowa PDT z wykorzystaniem fotofryny może być znacznie osłabiona przez indukcję ekspresji białka opiekuńczego GRP78 oraz indukcję autofagii. Wykazaliśmy, że selektywna eliminacja białka opiekuńczego GRP78 przy użyciu cytotoksyny EGF-SubA nasila przeciwnowotworowe działanie PDT w modelach *in vitro*, indukując nietypową śmierć komórek, niezależną od klasycznych szlaków indukcji apoptozy. Może to mieć szczególne znaczenie w terapii nowotworów opornych na indukcję klasycznej apoptozy. W modelach mysich wykazaliśmy, że cytotoksyna EGF-SubA wzmacnia działanie PDT *in vivo* w sposób zależny od indukcji swoistej odpowiedzi immunologicznej. Innym mechanizmem odpowiedzialnym za osłabienie działania PDT jest indukcja autofagii, która przyczynia się do usuwania uszkodzonych oksydacyjnie białek oraz odgrywa rolę cytoprotekcyjną. Nasze wyniki sugerują, że zahamowanie autofagii mogłoby służyć jako strategia poprawiająca skuteczność PDT. W celu zweryfikowania tej hipotezy niezbędne są jednak dalsze badania, w szczególności badania *in vivo*.

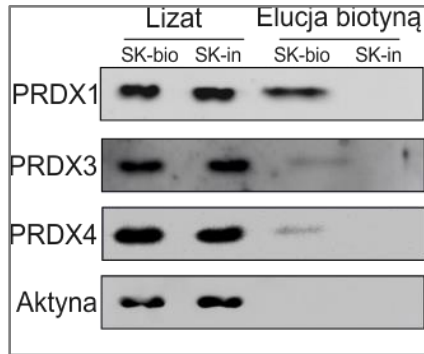
II. Identyfikacja celów molekularnych dla nowych związków o działaniu przeciwnowotworowym

Zbadanie mechanizmu i dokładnego spektrum działania inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych jest niezbędne do ich właściwego zastosowania jako związków przeciwnowotworowych. W czasie doktoratu, który wykonałam w Laboratorium Biologii Strukturalnej, zdobyłam wiedzę na temat funkcjonowania białek oraz nauczyłam się produkcji rekombinowanych białek, badania oddziaływań pomiędzy białkiem i ligandem, analizy strukturalnej i projektowania inhibitorów. Wiedzę tę wykorzystałam do poprowadzenia projektu mającego na celu zidentyfikowanie białek wiążących nowy, drobnocząsteczkowy związek o działaniu przeciwnowotworowym, SK053 [16]. W ramach projektu zaprojektowałam i oczyściłam kilka rekombinowanych białek (TRX1, PRDX1, oraz ich warianty z mutacjami punktowymi). Ponadto, we współpracy z dr Szymonem Kłossowskim i prof. Ryszardem Ostaszewskim z Instytutu Chemii Organicznej PAN, zsyntetyzowane zostały dwa nowe związki: biotynylowany SK053 (SK-bio) oraz jego nieaktywny, biotynylowany analog, pozbawiony centrum elektrofilowego (SK-in) (**Ryc. 7A**). Tylko aktywny związek SK-bio wykazywał działanie cytostatyczne/cytotoksyczne na komórki nowotworowe ludzkiego chłoniaka Burkitta – Raji (**Ryc. 7B**). Następnie, z użyciem związków SK-bio i SK-in, przeprowadziliśmy izolację i identyfikację białek wiążących się kowalencyjnie z SK053 w komórkach Raji. Eksperymenty wykonaliśmy z użyciem chromatografii powinowactwa biotyna-neutrawidyna, po wcześniejszej optymalizacji metody. Wśród biotynylowanych białek ilościowo wyróżniał się prążek o masie około 20 kDa (**Ryc. 7C**).



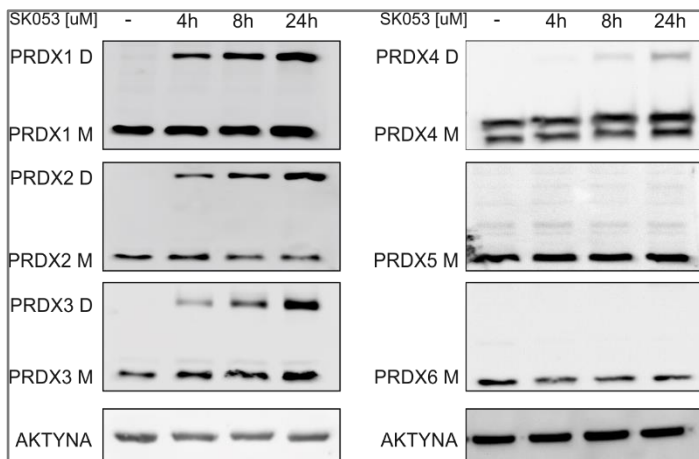
Ryc. 7 SK053 wiąże kowalencyjnie PRDX1 w komórkach Raji. A. Wzory chemiczne związków: SK053; biotynylowanego, aktywnego analogu SK053 (SK-bio); biotynylowanego, nieaktywnego analogu SK053, pozbawionego centrum elektrofilowego (SK-in). **B.** Test cytotoksycznego/cytostatycznego działania badanych związków (MTT). Komórki Raji inkubowano z badanymi związkami przez 48h. **C.** Komórki inkubowano z SK-bio oraz SK-in przez 2h w inkubatorze do hodowli komórek, lizowano, a następnie biotynylowane białka izolowano za pomocą chromatografii powinowactwa biotyna-neutravidyna poprzez elucję za pomocą 2mM roztworu biotyny. Eluaty rozdzielano w żelu poliakrylamidowym w warunkach redukujących i denaturujących (SDS-PAGE). **D.** Fragmentacyjne widma masowe peptydu zawierającego Cys-173, HGEVCPAGWKPDGSDTIKPDVQK. Miejsce modyfikacji zaznaczono gwiazdką. Lewy panel prezentuje widmo peptydu zmodyfikowanego jodoacetamidem (+57.021), o masie jonu macierzystego m/z 802.731 i ładunku 3+. Prawy panel prezentuje widmo peptydu, w którym do Cys-173 dołączony jest kowalencyjnie SK-bio (+466.225), o masie jonu macierzystego m/z 704.600 i ładunku 4+.

Fragment żelu zawierający badany prążek poddaliśmy identyfikacji za pomocą spektrometrii mas w Laboratorium Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN. Dominującym białkiem obecnym w wyciętym fragmencie żelu była peroksyredoksyna 1 (PRDX1). Zidentyfikowaliśmy także część peptydów pochodzących z PRDX3 oraz PRDX4. Dla PRDX1, udało się również znaleźć peptyd o masie zwiększonej o 466 Da, odpowiadającej aktywnemu fragmentowi inhibitora (**Ryc. 7D**). Modyfikacja zlokalizowana była na Cys-173. Białka wiążące SK-bio zidentyfikowane za pomocą spektrometrii mas wykryliśmy również w eluatach biotynowych metodą Western blotting, z użyciem specyficznych przeciwciał monoklonalnych (**Ryc. 8**).



Ryc. 8 Western blotting przedstawiający wiązanie SK-bio do PRDX1, PRDX3 i PRDX4 w komórkach Raji. Komórki inkubowano z SK-bio oraz biotynylowanym, nieaktywnym związkiem kontrolnym (SK-in), lizowano i biotynylowane białka izolowano przy pomocy chromatografii powinowactwa do neutrawidyny. Białka związane do neutrawidyny eluowano przy pomocy stężonego roztworu biotyny i rozdzielano za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących i redukujących. Następnie sprawdzono obecność PRDX1, PRDX3, i PRDX4 za pomocą metody Western blotting.

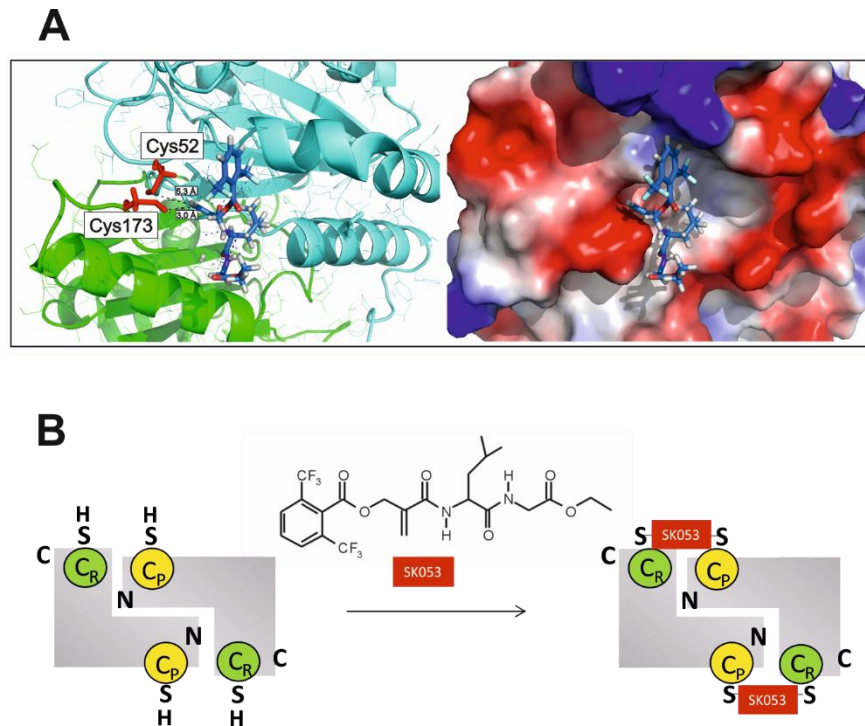
Jak wspomniano wcześniej, PRDX1-4 funkcjonują jako dimery, które w czasie drugiego etapu reakcji redukcji nadtlenków tworzą kowalencyjne wiązanie dwusiarczkowe pomiędzy dwiema podjednostkami w dimerze. Wiązanie to w komórkach jest redukowane przez TRX, natomiast w żelu redukującym, przez obecny w buforze 2-merkaptoetanol. Stąd po elektroforezie SDS-PAGE, w warunkach redukujących, dimeryczne PRDX migrują jako monomery. W kolejnych eksperymentach pokazaliśmy, że SK053 „mostkuje” dimer PRDX1 za pomocą kowalencyjnego wiązania (tio-alkilacji) do dwóch cystein w centrum aktywnym. Podobny mechanizm zachodzi również dla innych peroksyredoksyn, które działają jako dimery, czyli PRDX1-4, co pokazaliśmy za pomocą metody Western blotting (**Ryc. 9**).



Ryc. 9 SK053 indukuje tworzenie się kowalencyjnych dimerów PRDX1-4. Komórki Raji inkubowano z SK053 przez 4, 8 i 24 h, lizowano, a następnie rozdzielano za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących i redukujących. Poziom monomerów (PRDX M) i dimerów (PRDX D) oceniono za pomocą przeciwciał specyficjnie rozpoznających poszczególne izoformy PRDX.

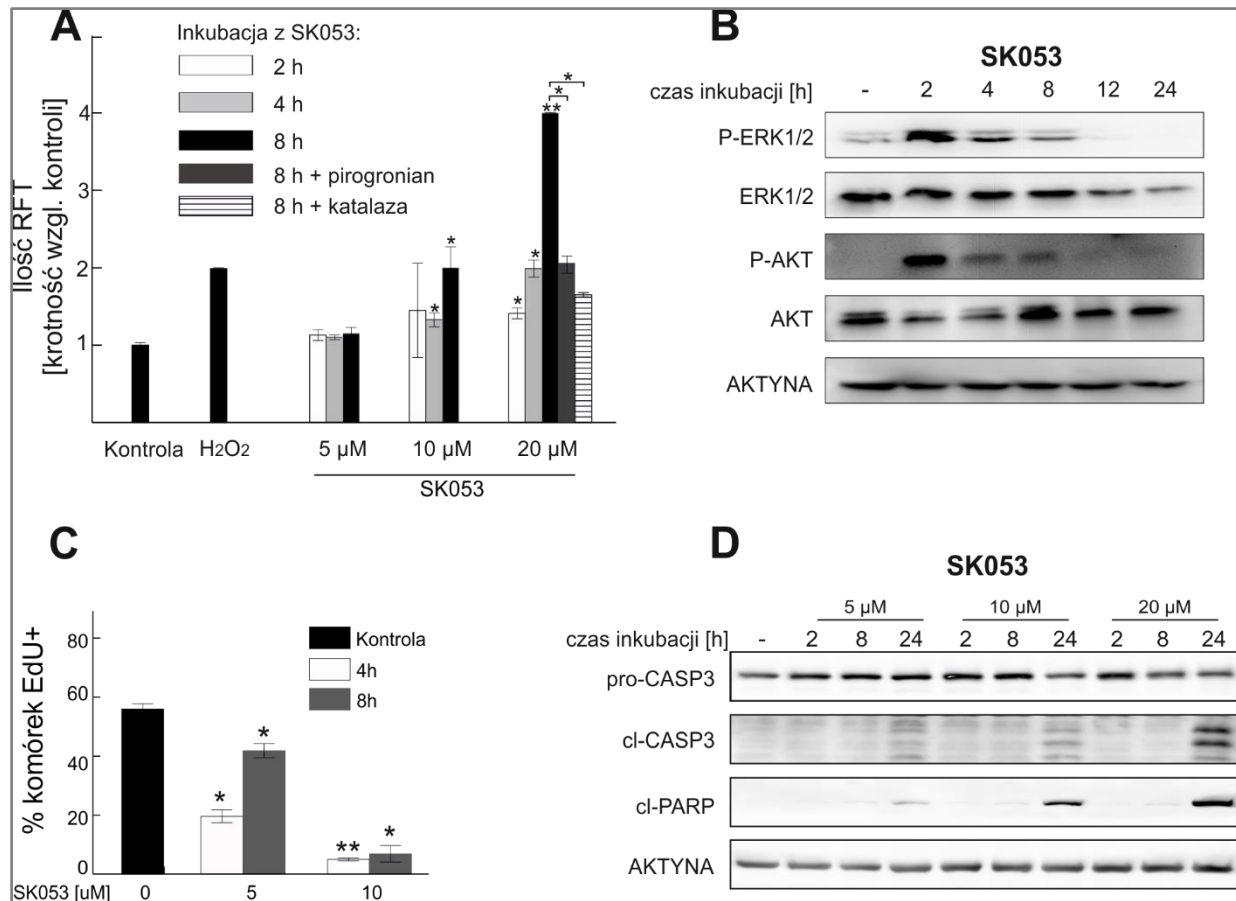
W dalszej części badań wykazaliśmy, że SK053 wiąże się do rekombinowanego białka PRDX1 oraz hamuje aktywność PRDX1 w teście *in vitro*. W celu wyjaśnienia mechanizmu tworzenia się kowalencyjnych dimerów PRDX1 pod wpływem SK053, wygenerowaliśmy warianty PRDX1, w których cysteiny zamieniono na alaniny i sprawdzaliśmy ich zdolność do tworzenia dimerów. Wyniki tych eksperymentów potwierdziły, że w wyniku podwójnej tioalkilacji cystein znajdujących się w centrum katalitycznym, Cys-52 i Cys-173, dochodzi do kowalencyjnego połączenia dwóch cząsteczek PRDX1 w

dimerze. Na podstawie powyższych badań zaproponowaliśmy model wiązania się SK053 do dimeru PRDX1 (**Ryc. 10**).



Ryc. 10. SK053 mostkuje cysteiny w centrum aktywnym PRDX1. **A.** Model wiązania się SK053 w centrum aktywnym PRDX1. **B.** Mechanizm podwójnej tioalkilacji i tworzenia kowalencyjnych dimerów PRDX1 pod wpływem SK053. C_p - cysteina peroksydazowa (ang. peroxidatic), C_r – cysteina rozdzielająca (ang. resolving).

W dalszych badaniach oceniliśmy, czy zablokowanie PRDX1-4 odpowiada za cytotoksyczne działanie SK053. Perokсыredoksyny są enzymami katalizującymi redukcję nadtlenu, dlatego zablokowanie ich aktywności powinno indukować w komórkach stres oksydacyjny. Wykazaliśmy, że w komórkach Raji traktowanych SK053 dochodzi do zwiększenia poziomu reaktywnych form tlenu (RFT). Zarówno pirogronian, nieenzymatyczny „zmiatacz” RFT, jak i katalaza, enzym specyficznie usuwający H₂O₂, zapobiegały gromadzeniu się RFT pod wpływem SK053 (**Ryc. 11A**). W komórkach inkubowanych z SK053 zaobserwowaliśmy również nasiloną fosforylację kinaz ERK1/2 oraz AKT (**Fig. 11B**). Efekt ten zaobserwowano we wcześniejszych badaniach dotyczących zmian aktywności szlaków sygnałowych pod wpływem blokowania fosfataz przez H₂O₂ [30].



Ryc. 11. SK053 zwiększa ilość RFT, indukuje fosforylację kinaz ERK1/2, AKT oraz indukuje apoptozę. A. Ilość RFT oceniono z użyciem odczynnika CM-H2-DCFDA (Life Technologies) i cytometrii przepływowej. **B.** Poziom fosforylacji ERK1/2 oraz AKT oceniono metodą Western blotting, z użyciem przeciwciał specyficznie rozpoznających formy fosforylowane. **C.** Poziom syntezy DNA oceniono za pomocą cytometrii przepływowej w teście Click-iT EdU, jako % komórek zawierających wyznakowaną fluorescencyjnie 5-etynyl-2'-deoxyurydynę. **D.** Indukcję apoptozy oceniono metodą Western blotting, używając przeciwciał rozpoznających markery komórek apoptotycznych, trawioną kaspazę 3 (cl-CASP3) oraz trawiony PARP (cl-PARP).

Ponadto, w komórkach traktowanych SK053 zaobserwowaliśmy obniżony poziom syntezy DNA (**Ryc.11C**), a w wyższych stężeniach indukcję apoptozy (**Ryc.11 D**). Wszystkie te efekty były znacząco obniżone w obecności pirogronianu lub katalazy. Powyższe wyniki sugerują, że w komórkach traktowanych SK053 gromadzi się H₂O₂, który jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za efekt cytotoksyczny SK053. Wyniki przedstawionych powyżej badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Oncotarget* (Trzeciecka u wsp. [31]).

Metodę identyfikacji białek docelowych opartą na chromatografii powinowactwa biotyneutrawidyna zastosowałam również do identyfikacji nowych białek docelowych wiążących adenantynę. W badaniach opublikowanych wcześniej wykazano, że adenantyna wiąże się z PRDX1 i PRDX2. Nasze badania potwierdziły to wiązanie, a także zidentyfikowały bezpośrednio wiązanie adenantyny do TRX1. Wyniki tych badań opublikowaliśmy w czasopiśmie *Biochemical Pharmacology* (Muchowicz i wsp. [32]).

Podsumowując, w tej części badań udało się zidentyfikować dimeryczne peroksyredoksyny, jako białka docelowe wiążące drobnocząsteczkowy inhibitor SK053 o działaniu przeciwnowotworowym. Zaobserwowaliśmy, że SK053, w wyniku podwójnej tioalkilacji, mostkuje katalityczne cysteiny w centrum aktywnym dimerycznych peroksyredoksyn, prowadząc do utworzenia kowalencyjnych dimerów opornych na redukcję. Perokсыredoksyny są enzymami usuwającymi nadtlęni i odgrywają ważną rolę w utrzymaniu homeostazy redoks. Jak dotąd rola tych enzymów w chłoniaku Burkitta nie została zbadana. Nasze badania wykazały, że zablokowanie perokсыredoksyn za pomocą SK053 hamuje proliferację komórek i indukuje apoptozę. Wyniki te wskazują, że perokсыredoksyny mogą stanowić nowe cele terapeutyczne w leczeniu chłoniaka Burkitta.

III. Zbadanie homeostazy redoks i roli enzymów antyoksydacyjnych jako potencjalnych celów w terapii nowotworów wywodzących się z limfocytów B.

Nowotwory wywodzące się z limfocytów B i ich rokowanie

Nowotwory wywodzące się z komórek krwi i układu chłonnego stanowią heterogenną grupę chorób o złożonej patogenezie. W ciągu ostatnich trzech dekad liczba nowych zachorowań na nowotwory układu krwiotwórczego i chłonnego wzrosła ponad 2-krotnie [33]. Znaczną część nowotworów układu krwiotwórczego i chłonnego stanowią rozrosty wywodzące się z limfocytów B, na różnym etapie limfopoezy. Większość rozrostów z niedojrzałych form limfocytów B, tzw. limfoblastów, stanowią ostre białaczki limfoblastyczne B-komórkowe (OBL). Najczęstsze rozrosty wywodzące się z dojrzałych limfocytów B to chłoniaki nieziarnicze oraz przewlekła białaczka limfocytowa (PBL).

OBL jest najczęstszym nowotworem wśród dzieci, choć występuje również u dorosłych w różnym wieku. Jest to choroba bardzo zróżnicowana, zarówno pod względem genetycznym, jak i pod względem skuteczności leczenia. Chociaż intensywna chemioterapia zapewnia wysoki odsetek wyleczeń u większości chorych, podtypy z określonymi zmianami genetycznymi, takimi jak rearanżacja genu *MLL*, fuzja *BCR-ABL1* czy hipodiploidia, są trudne do wyleczenia i wymagają dalszych badań i poszukiwania nowych terapii, w szczególności terapii celowanych [34]. Podtypy OBL charakteryzujące się wyżej opisanymi zmianami genetycznymi występują znacznie częściej u dorosłych z OBL, dlatego u ponad połowy chorych powyżej 18 roku życia dochodzi do nawrotu choroby, często opornego na leczenie.

Chłoniaki nieziarnicze to również heterogenna grupa nowotworów o zróżnicowanej prognozie. Do najbardziej agresywnych postaci chłoniaków nieziarniczych należą: chłoniak Burkitta, chłoniak z komórek płaszczka oraz chłoniak rozlany z dużych limfocytów B. Chorych na chłoniaki nieziarnicze oraz PBL leczy się głównie za pomocą chemioterapii w połączeniu z immunoterapią przeciwciałami anti-CD20. W ostatnich latach do leczenia PBL oraz wybranych typów chłoniaków wprowadzone zostały również nowe związki celowane takiej jak ibrutinib i idelalisib, będące inhibitorami kinaz zaangażowanych w transmisję sygnału z receptora limfocytów B (BCR). Pomimo coraz skuteczniejszych metod leczenia, u części chorych (10-30% w zależności od podtypu) dochodzi do wznowy, często opornej na leczenie [35, 36].

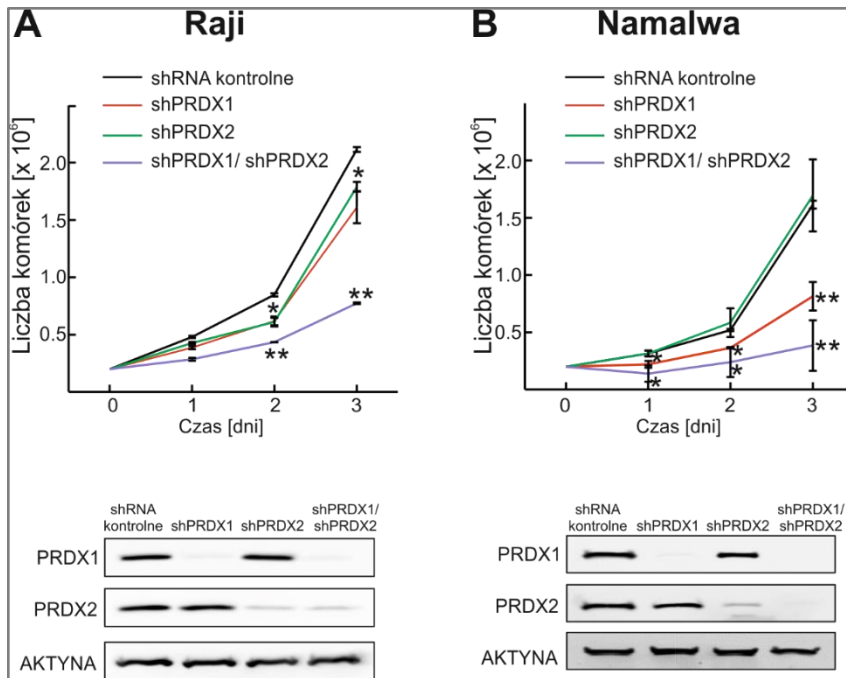
Terapie prooksydacyjne w leczeniu nowotworów wywodzących się z limfocytów B

Dotychczasowe badania wskazują, że terapie prooksydacyjne mogą mieć zastosowanie w leczeniu rozrostów hematologicznych, a w szczególności chorych na nowotwory wywodzące się z limfocytów B. Wykazano, że nowotwory pochodzące z limfocytów B są szczególnie wrażliwe na związki o działaniu prooksydacyjnym [5], jednak mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko nie są dokładnie poznane. Przypuszcza się, że jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za to zjawisko jest zmieniony metabolizm glukozy i metabolizm redoks, charakterystyczny dla limfocytów B [37]. Ciekawym i nowym podejściem w leczeniu nowotworów wywodzących się z limfocytów B może być więc celowanie w ich zmieniony metabolizm oksydacyjny. Identyfikacja specyficznych szlaków antyoksydacyjnych odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy redoks jest niezbędna dla wskazania nowych celów w terapii. W naszych badaniach skupiliśmy się na kilku aspektach związanych z terapią prooksydacyjną nowotworów wywodzących się z limfocytów B, takich jak:

- (1) Walidacja peroksyredoksyn jako celów w terapii chłoniaków B komórkowych
- (2) Identyfikacja nowych, synergistycznych połączeń inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych ze związkami generującymi RFT
- (3) Identyfikacja enzymów antyoksydacyjnych z rodziny tioredoksyny jako potencjalnych celów w terapii ostrej białaczki limfoblastycznej B komórkowej.

Walidacja peroksyredoksyn jako celów w terapii chłoniaków B komórkowych

Zidentyfikowanie dimerycznych PRDX jako białek docelowych wiążących inhibitor SK053 w komórkach chłoniaka Burkitta skłoniło nas do oceny ilości tych enzymów i ich wpływu na proliferację komórek nowotworów B komórkowych. W liniach komórkowych różnych chłoniaków, a także w pierwotnych komórkach pozyskanych od chorych na chłoniaka Burkitta i przewlekłą białaczkę limfocytową, wykazaliśmy zwiększoną ekspresję zarówno PRDX1 jak i PRDX2. Ponadto, w modelu linii komórkowych ludzkiego chłoniaka Burkitta pokazaliśmy, że równoczesne obniżenie poziomu PRDX1 i PRDX2 zmniejsza tempo wzrostu komórek nowotworowych (**Ryc. 12**), prowadzi do zwiększenia ilości komórek w fazie G1 i zmniejszenia w fazie S cyklu komórkowego oraz blokady syntezy DNA. Nasze badania wykazały, że w komórkach chłoniaka, zarówno PRDX1 jak i PRDX2, wspierają wzrost i proliferację komórek, a więc pełnią komplementarne funkcje. Skuteczne zahamowanie proliferacji komórek chłoniaka wymaga więc jednoczesnego zablokowania obu tych enzymów. Zahamowanie proliferacji komórek glejaka [38] bądź ludzkich komórek zarodkowych [30] obserwowano wcześniej już po wyłączeniu jednej z cytoplazmatycznych peroksyredoksyn. Wyniki przedstawionych powyżej badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Oncotarget* (Trzeciecka u wsp. [31]).



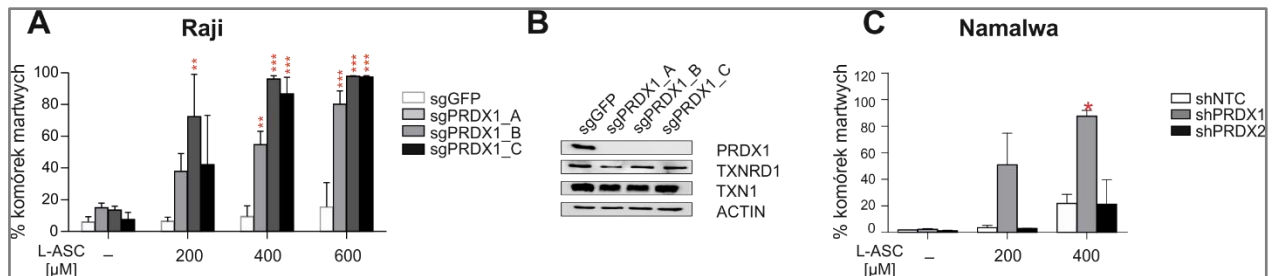
Ryc. 12 Zarówno PRDX1, jak i PRDX2, kontrolują proliferację i przeżycie komórek chłoniaka. Komórki Raji (A) i Namalwa (B) traktowano lentiwirusami kodującymi shRNA specyficzne dla PRDX1 i/lub PRDX2, bądź shRNA kontrolne oraz gen oporności na puromycynę. Po selekcji puromycyną liczbę żywych komórek oceniono w hemocytometrze przez trzy kolejne dni. Część komórek po selekcji puromycyną zlizowano i poziom PRDX1 i PRDX2 oceniono metodą Western blotting.

Identyfikacja nowych, synergistycznych połączeń inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych ze związkami generującymi RFT

Wyżej przedstawione badania przedkliniczne wykazały skuteczność inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych w różnych nowotworach wywodzących się z limfocytów B. Jednak w monoterapii skuteczność tych związków była stosunkowo niewielka i nie prowadziła do całkowitych wyleczeń w modelach *in vivo*. Podobnie, pierwsze próby oceny aktywności przeciwnowotworowej AUR (inhibitora układu TRX) w badaniach klinicznych w PBL wykazały niewielką skuteczność (NCT01419691, *Saba i wsp.*, ASH 2013, abstract 3819). Stąd w dalszej części badań skupiliśmy się na poszukaniu połączeń inhibitorów enzymów układu tioredoksyny z innymi związkami. Najsilniejsze, synergistyczne działanie cytotoksyczne zaobserwowaliśmy dla połączenia AUR i SK053 z L-askorbinianem, związkiem generującym RFT.

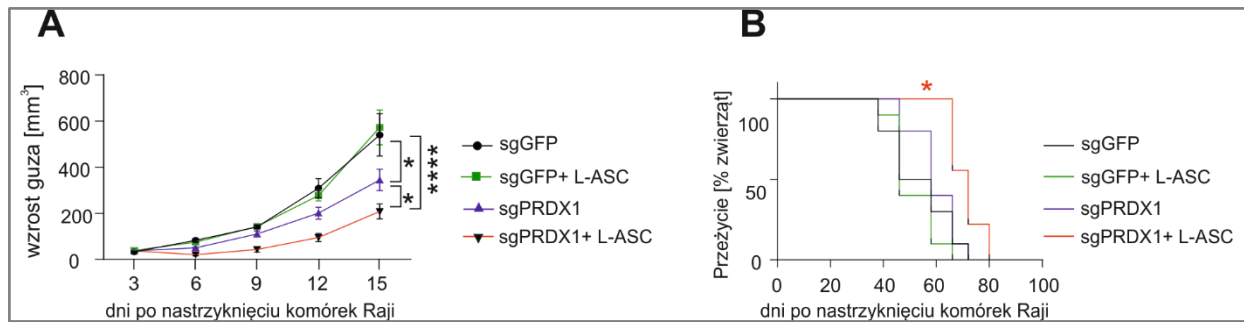
Działanie przeciwnowotworowe farmakologicznego L-ASC, zwłaszcza *in vivo*, zależy od rodzaju nowotworu i od aktywności enzymów związanych z metabolizowaniem RFT, zarówno w komórkach nowotworowych jak i w mikrośrodowisku nowotworu. Nowotworowe limfocyty B są wrażliwe na L-ASC *in vitro* ($LD_{50} \sim 0,5$ mM), jednak aktywność L-ASC *in vivo* jest ograniczona, pomimo dożylnego podawania dużych dawek [39]. Postawiliśmy hipotezę, że zablokowanie wewnątrzkomórkowego usuwania RFT przez enzymy antyoksydacyjne układu tioredoksyny może nasilić cytotoksyczne działanie L-ASC na komórki nowotworowe wywodzące się z limfocytów B. Jednym z kluczowych enzymów odpowiedzialnych za usuwanie H_2O_2 jest PRDX1. Jak przedstawiono wcześniej, ilość PRDX1 w komórkach białaczkowych i

chłoniakowych jest znacznie podwyższona, co może osłabiać cytotoksyczne działanie L-ASC, zwłaszcza w mikrośrodkowisku szpiku, które dostarcza dodatkowej ochrony przed stresem oksydacyjnym [40]. W pierwszej kolejności sprawdziliśmy czy zmniejszenie ekspresji PRDX1 uwrażliwia komórki chłoniaka na L-ASC. Wszystkie badane linie komórkowe chłoniaka Burkitta i OBL z obniżoną ekspresją PRDX1 były znacznie bardziej wrażliwe na L-ASC niż komórki parentalne, wykazujące wysoki poziom ekspresji PRDX1. Wyjątkowo silne cytotoksyczne działanie L-ASC zaobserwowaliśmy dla komórek Raji i Namalwa pozbawionych genu kodującego PRDX1. Takiego efektu nie zaobserwowaliśmy w komórkach z obniżoną ilością PRDX2 (**Ryc. 13**).



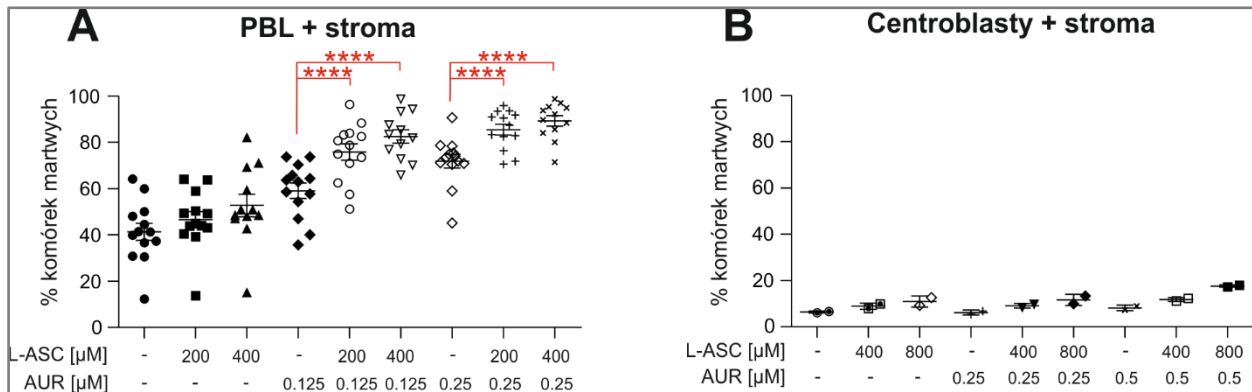
Ryc. 13 Usunięcie PRDX1 uwrażliwia komórki chłoniaka Burkitta na L-ASC w testach *in vitro*. **A.** Komórki Raji pozbawione ekspresji PRDX1 (delecja genomowa CRISPR-Cas9, 3 różne klony: Raji-sgPRDX1 A, B i C) lub komórki kontrolne (Raji-sgGFP) inkubowano przez 48 h z L-ASC. Ilość komórek martwych oceniono metodą cytometrii przepływowej po wybarwieniu jodkiem propidyny. **B.** Analiza Western blotting całkowitych lizatów białkowych komórek użytych w panelu A. **C.** Komórki Namalwa z obniżoną ekspresją PRDX1 i/lub PRDX2 (przygotowane jak opisano w Ryc.12B) inkubowano z L-ASC przez 48 h, a następnie wybarwiono jodkiem propidyny i oceniono ich żywotność za pomocą cytometrii przepływowej. Istotność statystyczna oceniono za pomocą testu Dunnetta; ** p <0,01, *** p <0,001.

Wpływ PRDX1 na skuteczność przeciwnowotworową L-ASC oceniliśmy również *in vivo* w modelu mysim. Zgodnie z wcześniej opublikowanymi danymi, L-ASC podany dootrzewnowo w dużych dawkach nie hamował wzrostu kontrolnych komórek Raji *in vivo* w modelu mysim SCID. W tym modelu zaobserwowaliśmy jednak znaczące zahamowanie wzrostu komórek Raji pozbawionych PRDX1. Ponadto, traktowanie myszy nastrzykniętych komórkami Raji-sgPRDX1 za pomocą L-ASC znacząco wydłużyło przeżycie zwierząt w porównaniu do myszy nastrzykniętych komórkami Raji-sgPRDX1, traktowanych samym rozpuszczalnikiem (**Ryc. 14**).



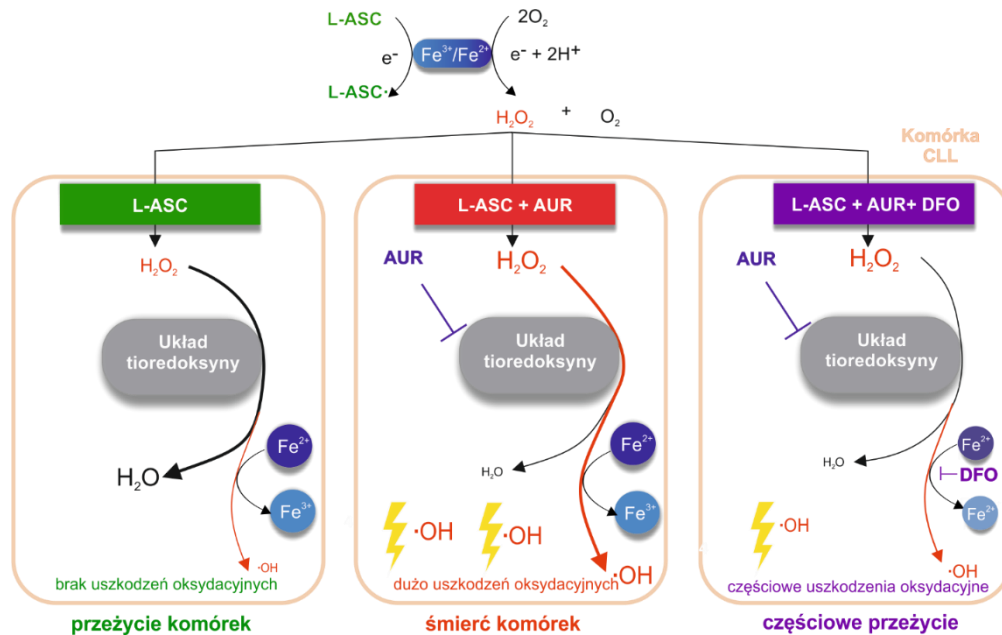
Ryc. 14 Usunięcie PRDX1 uwrażliwia komórki chłoniaka Burkitta na L-ASC *in vivo*. Mysiom SCID BALB/c zaszczepiono podskórnie komórki Raji-sgPRDX1 (mieszanina klonów B i C) i komórki kontrolne Raji-sgGFP. L-ASC podawano dootrzewnowo w dawce 4 g/kg, dwa razy dziennie, przez 10 dni. Wykresy przedstawiają tempo wzrostu guza (A) oraz przeżycie myszy (B), uśrednione z 2 eksperymentów, 10 myszy/grupę.

W dalszej części oceniliśmy aktywność przeciwnowotworową połączenia L-ASC z inhibitorami enzymów antyoksydacyjnych. Połączenie L-ASC z AUR lub SK053 wywoływało silne efekty cytotoksyczne na linii komórkowe chłoniaka (Raji) oraz PBL (Mec-1, CI) w testach *in vitro*. Co ciekawe, zablokowanie układu glutationowego za pomocą inhibitora BSO nie uwrażliwiało komórek nowotworowych na działanie L-ASC. Ze względu na podwyższoną ekspresję PRDX1 również w PBL, cytotoksyczne działanie połączenia AUR z L-ASC sprawdziliśmy też na komórkach pierwotnych pozyskanych od chorych na PBL. Silny efekt cytotoksyczny badanej kombinacji związków względem komórek PBL zaobserwowaliśmy zarówno w monokulturach, jak i w kokulturach z komórkami zrębu. Kombinacja L-ASC z AUR skutecznie działała na komórki PBL pochodzące od chorych z różnych grup ryzyka cytogenetycznego. Analiza Chou-Talalay wykazała, że interakcja jest synergistyczna lub silnie synergistyczna we wszystkich badanych liniach komórkowych i pierwotnych komórkach PBL. Co ważne, w badanych dawkach, które są osiągalne *in vivo*, nie zaobserwowaliśmy cytotoksycznego działania kombinacji na prawidłowe limfocyty B pochodzące z krwi obwodowej ani na ludzkie centroblasty hodowane *ex vivo* (Ryc. 15). Ponadto, AUR nasiliła działanie przeciwnowotworowe L-ASC *in vivo*.



Ryc. 15 Auranofina selektywnie zwiększa cytotoksyczność L-ASC względem nowotworowych limfocytów B. Pierwotne ludzkie komórki PBL ($n \geq 12$ chorych) w ko-hodowli z komórkami stromy M2-10B4 (A), oraz limfocyty B izolowane z ludzkich migdałków (2 dawców poddawanych tonsyllektomii) hodowane z komórkami HT1080-CD40L (hodowla centroblastów) (B) inkubowano przez 48 h z L-ASC, AUR lub ich kombinacją. Procent komórek martwych oceniono za pomocą cytometrii przepływowej, po barwieniu aneksyną V i jodkiem propidyny.

W dalszej części badań skupiliśmy się na wyjaśnieniu synergistycznego mechanizmu działania AUR w połączeniu z L-ASC. W tym celu zoptymalizowaliśmy szereg testów umożliwiających pomiar H_2O_2 na zewnątrz i wewnątrz komórek. Badania te doprowadziły do zaproponowania mechanizmu, w którym AUR zwiększa cytotoksyczność L-ASC w sposób zależny od Fe^{2+} (Ryc. 16).



Ryc. 16 Mechanizm cytotoksycznego działania AUR i L-ASC na nowotworowe limfocyty B. Opis w tekście.

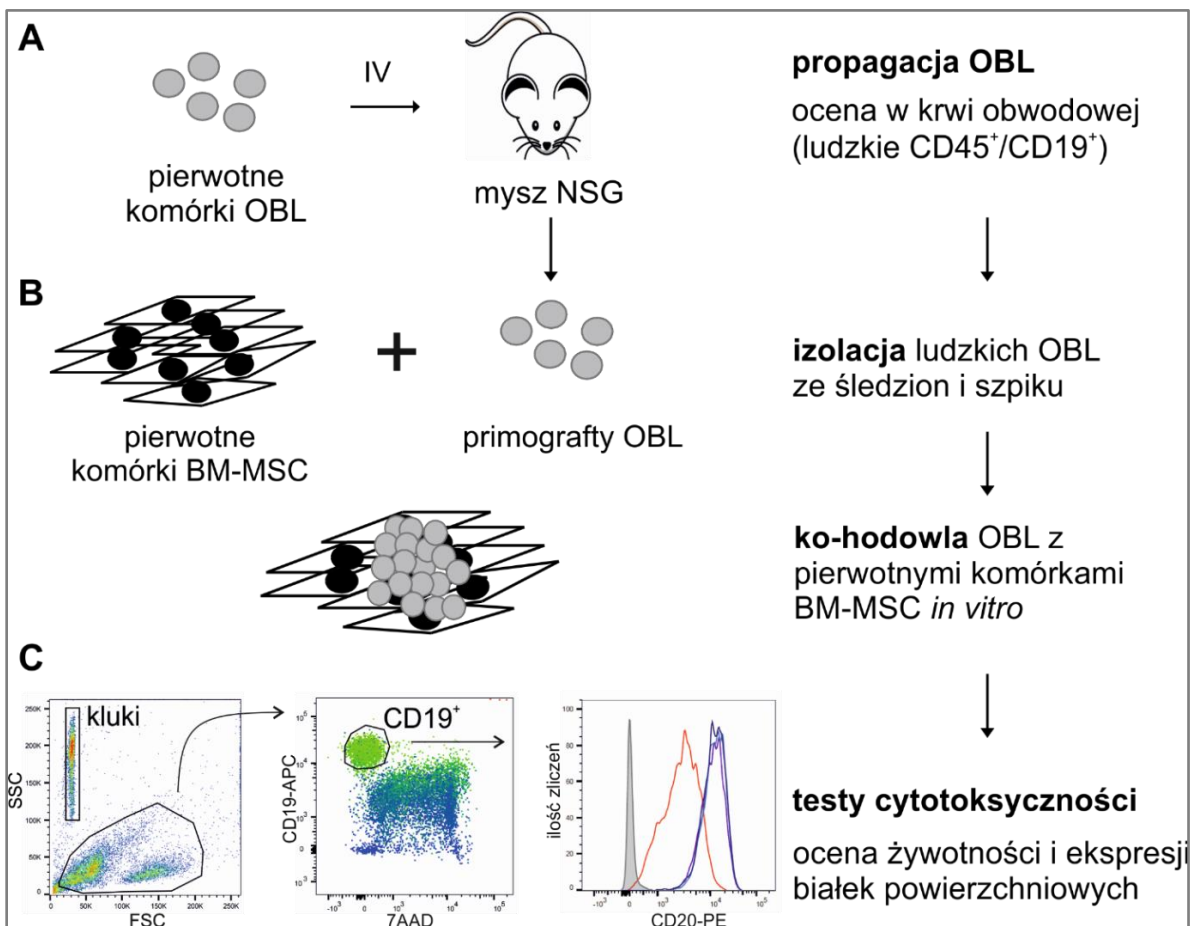
W płynie pozakomórkowym lub w medium hodowlanym, L-ASC, w obecności jonów metali przejściowych, wytwarza H_2O_2 , który wnika do komórek. W nowotworowych limfocytach B, w których aktywność układu TRX jest zwiększona, H_2O_2 jest szybko usuwana, co obniża działanie cytotoksyczne L-ASC (panel lewy). Kiedy jednak układ TRX jest zablokowany przez AUR, H_2O_2 gromadzi się w komórce, gdzie reaguje z jonami żelaza(II), Fe^{2+} , i prowadzi do wytwarzania rodników hydroksylowych (reakcja Fentona). W konsekwencji, w komórce dochodzi do licznych uszkodzeń oksydacyjnych makromolekuł i do śmierci komórki (panel środkowy). Efekt cytotoksyczny jest osłabiony w wyniku preinkubacji z deferoksaminą (DFO), która chelatuje wewnątrzkomórkowe Fe^{2+} , zaburza wytwarzanie rodników hydroksylowych i zmniejsza ilość uszkodzeń oksydacyjnych. Wskazuje to na istotną rolę jonów Fe^{2+} i reakcji Fentona dla cytotoksycznego działania badanej kombinacji (prawy panel). Otrzymane wyniki stały się podstawą do złożenia europejskiego zgłoszenia patentowego i uzyskania patentu nr EP3181118A1 pt. "Synergistyczne połączenie inhibitorów układu tioredoksyny i L-askorbinianu do leczenia nowotworów wywodzących się z limfocytów B". Wyniki eksperymentów opublikowane zostały w czasopiśmie *Redox biology* (Graczyk-Jarzynka i wsp. 2019 [41]). Dodatkowo, na zaproszenie od redaktorów pisma *Cancer letters*, opublikowaliśmy artykuł przeglądowy, w którym podsumowaliśmy i przedyskutowaliśmy działanie przeciwnowotworowe terapii prooksydacyjnych (Firczuk et al. 2020 [42]).

Podsumowując, nasze badania wykazały silne, synergistyczne działanie pomiędzy inhibitorami układu TRX oraz L-ASC. Udowodniliśmy, że enzymy układu TRX, a w szczególności PRDX1, odgrywają istotną rolę w usuwaniu H_2O_2 w nowotworach wywodzących się z limfocytów B. Ponadto AUR, inhibitor układu TRX stosowany jako lek przeciwreumatyczny, zmniejsza zdolność komórek nowotworowych do metabolizowania H_2O_2 i nasila aktywność przeciwnowotworową L-ASC *in vitro* i *in vivo*. Biorąc pod uwagę bardzo silny, selektywny i synergistyczny efekt badanej kombinacji związków w różnych modelach przedklinicznych, a także fakt, że oba związki, L-ASC i AUR są już od dziesięcioleci stosowane w klinice, połączenie AUR i L-ASC może okazać się skuteczne również w badaniach klinicznych u chorych na nowotwory. Kombinację AUR z L-ASC warto będzie przetestować szczególnie u chorych na nowotwory B-komórkowe odporne na terapię konwencjonalną.

Identyfikacja enzymów układu tioredoksyny jako potencjalnych celów w terapii ostrej białaczki limfoblastycznej B komórkowej

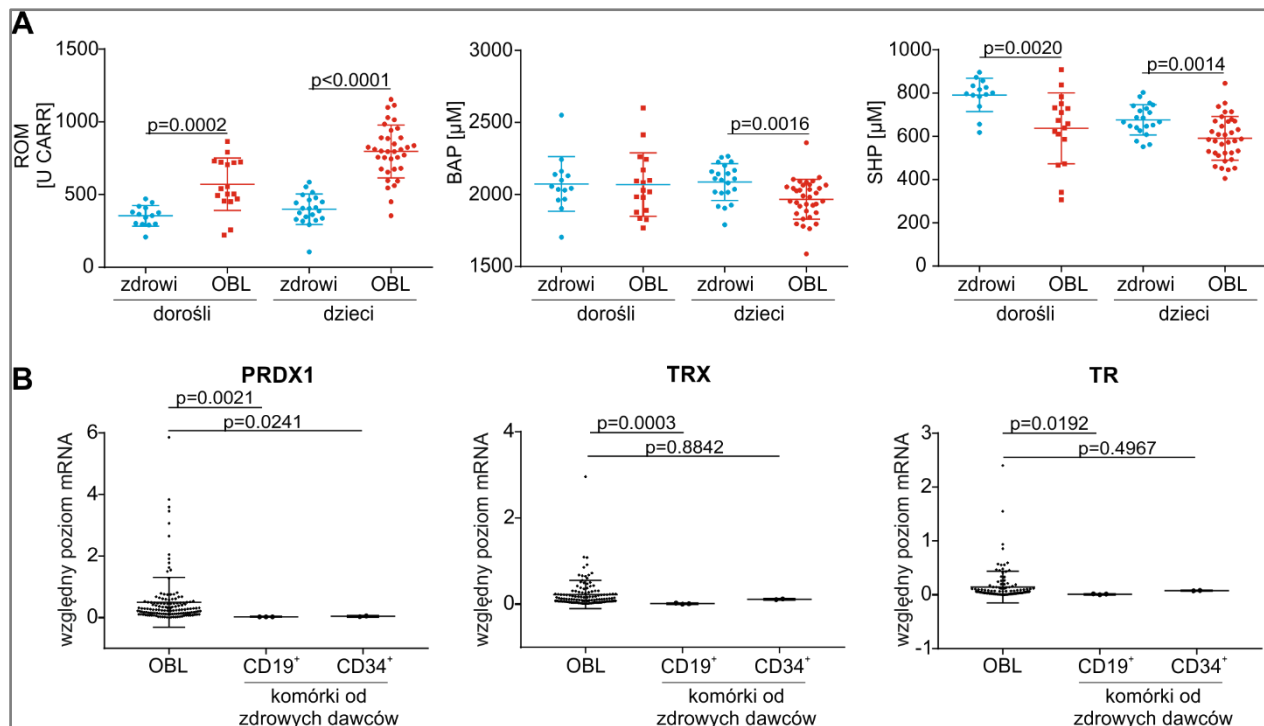
Metabolizm redoks i rolę enzymów antyoksydacyjnych zbadaliśmy również w ostrej białaczce limfoblastycznej B komórkowej (OBL). OBL jest chorobą genetycznie heterogenną i ustalone linie

komórkowe nie są dobrym modelem do badania jej patomechanizmu i testowania nowych leków. Dlatego ważne jest, aby badania na liniach uzupełnić badaniami na materiale pierwotnym, izolowanym od pacjentów. W ramach projektu nawiązałam współpracę z trzema ośrodkami klinicznymi, w których leczeni są chorzy na OBL, zarówno dzieci jak i dorośli. Ponadto, wraz z zespołem oraz we współpracy z Laboratorium prof. Heidenreicha z Uniwersytetu w Newcastle, opracowaliśmy przedkliniczne modele badawcze oparte o komórki pierwotne OBL, umożliwiające wiarygodne badanie patomechanizmu choroby i testowanie nowych leków (**Ryc. 17**).



Ryc.17 Modele *in vitro* i *in vivo* do badania OBL. **A.** Pierwotne komórki CD19⁺ izolowane od chorych z OBL wstrzykuje się dożylnie (IV) myszom z niedoborem odporności, NSG (z ang. Nod SCID Gamma). Rozwój białaczki monitorowany jest za pomocą cytometrii przepływowej, poprzez ocenę odsetka komórek ludzkich CD45⁺/CD19⁺ w mysiej krwi obwodowej. **B.** W zaawansowanym stadium rozwoju białaczki (powiększona śledziona, ilość ludzkich komórek CD45⁺/CD19⁺ przekracza ilość leukocytów mysich), namnożone komórki OBL (primografty) izolowane są ze śledzion i szpiku myszy. **C.** Primografty OBL hodowane od 3-10 dni *in vitro* z komórkami stromy (szpikowe, mezenchymalne komórki macierzyste BM-MSK) zachowują dobrą żywotność, co umożliwia ocenę ich wrażliwości na leki oraz ocenę ich fenotypu w cytometrii przepływowej.

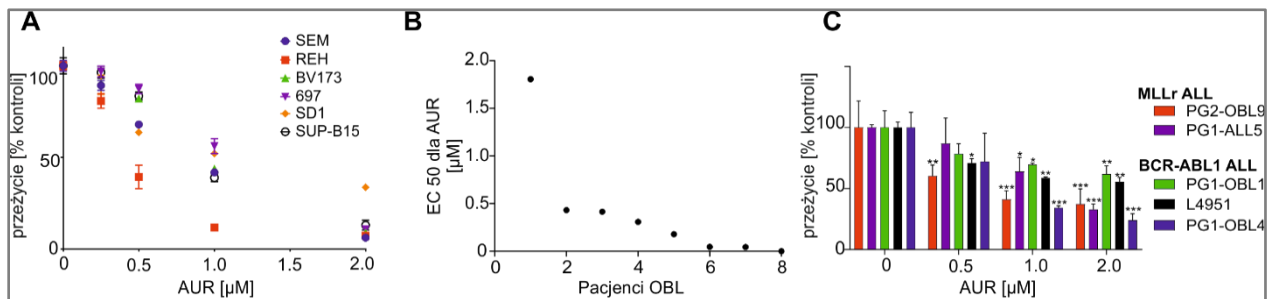
Wykazaliśmy, że w surowicy chorych na OBL dochodzi do gromadzenia się markerów uszkodzeń oksydacyjnych, obniżenia zdolności antyoksydacyjnej i zmniejszenia ilości wolnych grup tiolowych. Większość z wyżej wymienionych zmian zaobserwowaliśmy zarówno u dzieci, jak i u dorosłych (**Ryc. 18A**). Następnie w blastach izolowanych od chorych na OBL oceniliśmy ilość mRNA kodującego enzymy antyoksydacyjne układu TRX. Średni poziom mRNA dla PRDX1, TRX1 i TR1 w blastach OBL był wyższy w porównaniu do komórek prawidłowych (CD34⁺ i/lub CD19⁺) (**Ryc. 18B**). Zwiększoną ilość enzymów układu TRX zaobserwowaliśmy również w liniach komórkowych reprezentujących różne podtypy cytogenetyczne OBL, zarówno na poziomie mRNA, jak i na poziomie białka. Powyższe dane wskazują na zaburzenie homeostazy redoks u chorych na OBL, której towarzyszy zwiększona ekspresja enzymów antyoksydacyjnych układu TRX.



Ryc. 18 Chorzy na OBL mają nasilony stres oksydacyjny i podwyższoną ilość enzymów antyoksydacyjnych układu TRX. **A.** Biomarkery homeostazy redoks takie jak: reaktywne metabolity tlenu (ROM – reactive oxygen metabolites), zdolność antyoksydacyjna (BAP – biological antioxidant capacity) i poziom wolnych grup tiolowych (SHP – free thiol group), zostały ocenione w surowicy pobranej na etapie diagnozy od dzieci ($n = 35$) i dorosłych ($n = 17$) chorych na OBL oraz od osób zdrowych dopasowanych pod względem wieku. **B.** Ilość mRNA kodującego PRDX1, TRX1 i TR1 oceniono za pomocą qPCR w blastach OBL ($n \geq 100$) i komórkach prawidłowych CD34⁺ oraz CD19⁺ pochodzących od zdrowych dawców.

W oparciu o powyższe wyniki postawiliśmy hipotezę, że enzymy antyoksydacyjne mogą być jednym z elementów adaptacji komórek OBL do stresu oksydacyjnego, a więc mogą sprzyjać rozwojowi

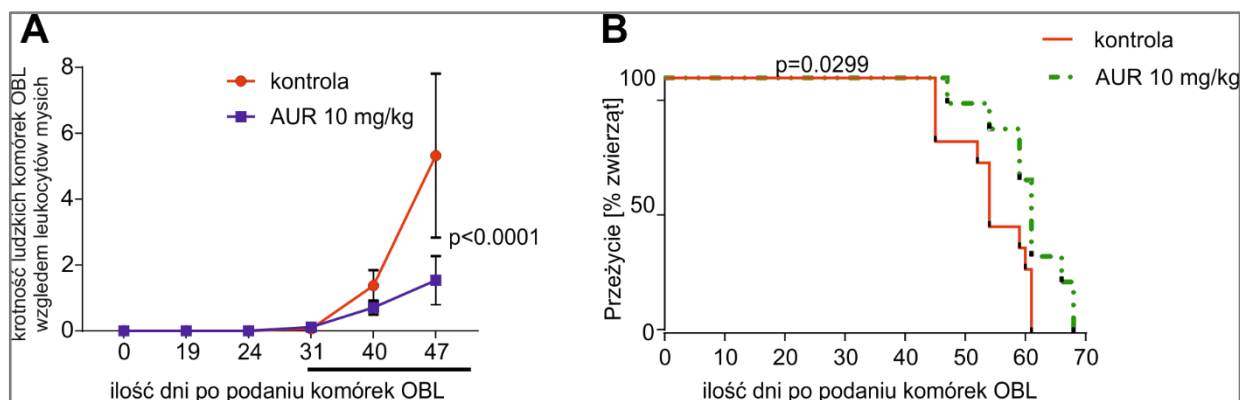
białaczki. W dalszej części badań oceniliśmy wpływ inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych, SK053, auranofiny (AUR) i adenantyny (ADE), na przeżycie komórek OBL. Wszystkie badane związki wywierały efekt cytotoksyczny na linie komórkowe OBL w testach *in vitro* w niskich stężeniach μM . Do dalszych badań, zwłaszcza do badań *in vivo*, wybraliśmy AUR, ze względu na jej największą selektywność działania. Ponadto, dodatkowymi zaletami AUR, która jest używana w klinice jako lek przeciwreumatyczny, są jej znany profil bezpieczeństwa i korzystna farmakokinetyka. AUR wykazywała silne działanie cytotoksyczne na pierwotne komórki OBL hodowane w monokulturze, a także w kokulturze z komórkami zrębowymi szpiku, które podtrzymują wzrost i przeżycie blastów OBL w warunkach *in vitro* i mogą indukować lekooporność [43]. W kohodowli blastów OBL z komórkami zrębowymi wrażliwość na AUR zmniejszyła się, jednak nie została całkowicie zahamowana **Ryc. 19**.



Ryc. 19 AUR działa cytotoksycznie na linie komórkowe OBL reprezentujące różne podtypy genetyczne białaczki (A), komórki pierwotne OBL hodowane w zawieszynie (B) oraz w kohodowli z komórkami stromy BM-MSK (C). Ilość komórek żywych oceniono za pomocą testu MTT (A, B) lub w hemocytometrze po wybarwieniu błękitem trypanu (C).

Efekt przeciwbiałczkowy AUR zaobserwowaliśmy również w modelu *in vivo*. Zastosowaliśmy model ksenotransplantacji blastów izolowanych od chorego na podtyp białaczki z rearanzacją genu *MLL* (MLLr) do myszy szczepu z niedoborem odporności NSG (ang. NOD SCID Gamma). U myszy tych, ze względu na brak limfocytów T i B oraz liczne defekty odpowiedzi immunologicznej nieswoistej, możliwy jest wzrost ludzkich komórek nowotworowych. W tym modelu AUR opóźniła progresję białaczki i przedłużyła przeżycie myszy (**Ryc. 20**). W dalszej części badań wykazaliśmy, że w komórkach białczkowych AUR i ADE zwiększają ilość RFT, indukują stres oksydacyjny, stres siateczki śródplazmatycznej, które prowadzą do oksydacyjnych uszkodzeń DNA i apoptozy komórek.

Wyniki wyżej opisanych eksperymentów opublikowane zostały w czasopiśmie *Molecular oncology* (Fidyt i wsp. 2019 [44]).



Ryc. 20 Auranofina opóźnia progresję OBL *in vivo* i przedłuża przeżycie myszy. Komórki pierwotne wyizolowane od chorego na OBL z rearanżacją genu *MLL* wstrzyknięto myszom NSG. Począwszy od dnia 31 po wstrzyknięciu komórek, części zwierząt przez 3 tygodnie podawano dootrzewnowo AUR (10 mg/kg), w schemacie 5 dni leczenia/ 2 dni przerwy. **A.** Progresję białaczki oceniano cotygodniowo poprzez barwienie krwi obwodowej przeciwciałami anti-CD45 (mysie), anti-CD45 (ludzkie), anti-CD19 (ludzkie). Na wykresie przedstawiono odsetek ludzkich komórek białaczkowych w grupie zwierząt otrzymujących AUR (n = 10) bądź DMSO (kontrola, n=12). **B.** Wykres Kaplana-Meyera przedstawiający przeżycie myszy. Przedstawiona wartość p jest obliczana za pomocą testu log-rank (Mantel-Cox).

Podsumowując, nasze badania przedkliniczne wykazały, że enzymy antyoksydacyjne układu tioredoksyny przyczyniają się do wzrostu i rozwoju OBL, a ich zablokowanie za pomocą AUR hamuje wzrost białaczki *in vitro* oraz *in vivo*. Co istotne, efekt przeciwbiałaczkowy AUR zaobserwowaliśmy również dla podtypów białaczki MLLr oraz Ph+, które charakteryzują się bardzo złym rokowaniem dla chorych. Powyższe wyniki sugerują, że układ tioredoksyny może być nowym celem w terapii OBL. Ponieważ *in vivo* w modelu mysim AUR tylko częściowo zahamowała rozwój białaczki, prowadzimy dalsze badania przedkliniczne, w których badamy efekty połączenia AUR z innymi lekami.

Literatura:

1. Glasauer, A. and N.S. Chandel, *Targeting antioxidants for cancer therapy*. *Biochem Pharmacol*, 2014. **92**(1): p. 90-101.
2. Sayin, V.I., et al., *Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(221): p. 221ra15.
3. Watson, J., *Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers*. *Open Biol*, 2013. **3**(1): p. 120144.
4. Holmgren, A., *Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems*. *Antioxid Redox Signal*, 2000. **2**(4): p. 811-20.
5. Graczyk-Jarzynka, A., et al., *New insights into redox homeostasis as a therapeutic target in B-cell malignancies*. *Curr Opin Hematol*, 2017. **24**(4): p. 393-401.
6. Wood, Z.A., et al., *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(1): p. 32-40.
7. Agostinis, P., et al., *Photodynamic therapy of cancer: An update*. *CA Cancer J Clin*, 2011.

8. Firczuk, M., et al., *Approaches to improve photodynamic therapy of cancer*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 208-24.
9. German Nutrition, S., *New Reference Values for Vitamin C Intake*. Ann Nutr Metab, 2015. **67**(1): p. 13-20.
10. Levine, M., S.J. Padayatty, and M.G. Espey, *Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries*. Adv Nutr, 2011. **2**(2): p. 78-88.
11. Chen, Q., et al., *Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 8749-54.
12. Chen, Q., et al., *Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(32): p. 11105-9.
13. Schoenfeld, J.D., et al., *O₂(-) and H₂O₂-Mediated Disruption of Fe Metabolism Causes the Differential Susceptibility of NSCLC and GBM Cancer Cells to Pharmacological Ascorbate*. Cancer Cell, 2017. **31**(4): p. 487-500 e8.
14. Yun, J., et al., *Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH*. Science, 2015.
15. Gorrini, C., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy*. Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(12): p. 931-47.
16. Klossowski, S., et al., *Studies toward novel peptidomimetic inhibitors of thioredoxin-thioredoxin reductase system*. J Med Chem, 2012. **55**(1): p. 55-67.
17. Liu, C.X., et al., *Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells*. Nat Chem Biol, 2012. **8**(5): p. 486-93.
18. Barr, P.M., et al., *Phase 2 study of imexon, a prooxidant molecule, in relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma*. Blood, 2014. **124**(8): p. 1259-65.
19. Stafford, W.C., et al., *Irreversible inhibition of cytosolic thioredoxin reductase 1 as a mechanistic basis for anticancer therapy*. Sci Transl Med, 2018. **10**(428).
20. Onodera, T., I. Momose, and M. Kawada, *Potential Anticancer Activity of Auranofin*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2019. **67**(3): p. 186-191.
21. Zhang, L.H. and X. Zhang, *Roles of GRP78 in physiology and cancer*. J Cell Biochem, 2010. **110**(6): p. 1299-305.
22. Paton, A.W., et al., *AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP*. Nature, 2006. **443**(7111): p. 548-52.
23. Backer, J.M., et al., *Chaperone-targeting cytotoxin and endoplasmic reticulum stress-inducing drug synergize to kill cancer cells*. Neoplasia, 2009. **11**(11): p. 1165-73.
24. Firczuk, M., et al., *GRP78-targeting subtilase cytotoxin sensitizes cancer cells to photodynamic therapy*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e741.
25. Gabrysiak, M., et al., *Low dose of GRP78-targeting subtilase cytotoxin improves the efficacy of photodynamic therapy in vivo*. Oncol Rep, 2016. **35**(6): p. 3151-8.
26. Rubio, N., et al., *Spatiotemporal autophagic degradation of oxidatively damaged organelles after photodynamic stress is amplified by mitochondrial reactive oxygen species*. Autophagy, 2012. **8**(9): p. 1312-24.
27. Hanada, T., et al., *The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy*. J Biol Chem, 2007. **282**(52): p. 37298-302.
28. Nakatogawa, H., et al., *Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(7): p. 458-67.
29. Domagala, A., et al., *Inhibition of autophagy sensitizes cancer cells to Photofrin-based photodynamic therapy*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 210.

30. Cao, J., et al., *Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity*. EMBO J, 2009. **28**(10): p. 1505-17.
31. Trzeciacka, A., et al., *Dimeric peroxiredoxins are druggable targets in human Burkitt lymphoma*. Oncotarget, 2015.
32. Muchowicz, A., et al., *Adenanthin targets proteins involved in the regulation of disulphide bonds*. Biochem Pharmacol, 2014. **89**(2): p. 210-6.
33. Drapała, A., et al., *HEMATOLOGIA ONKOLOGICZNA – ASPEKTY KLINICZNE, EKONOMICZNE I SYSTEMOWE” 2015*.
34. Hunger, S.P. and C.G. Mullighan, *Acute Lymphoblastic Leukemia in Children*. N Engl J Med, 2015. **373**(16): p. 1541-52.
35. Basso, K. and R. Dalla-Favera, *Germinal centres and B cell lymphomagenesis*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 172-84.
36. Fabbri, G. and R. Dalla-Favera, *The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(3): p. 145-62.
37. Xiao, G., et al., *B-Cell-Specific Diversion of Glucose Carbon Utilization Reveals a Unique Vulnerability in B Cell Malignancies*. Cell, 2018. **173**(2): p. 470-484 e18.
38. Smith-Pearson, P.S., et al., *Decreasing peroxiredoxin II expression decreases glutathione, alters cell cycle distribution, and sensitizes glioma cells to ionizing radiation and H(2)O(2)*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(8): p. 1178-89.
39. Shatzer, A.N., et al., *Ascorbic acid kills Epstein-Barr virus positive Burkitt lymphoma cells and Epstein-Barr virus transformed B-cells in vitro, but not in vivo*. Leuk Lymphoma, 2013. **54**(5): p. 1069-78.
40. Zhang, W., et al., *Stromal control of cystine metabolism promotes cancer cell survival in chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(3): p. 276-86.
41. Graczyk-Jarzynka, A., et al., *Inhibition of thioredoxin-dependent H2O2 removal sensitizes malignant B-cells to pharmacological ascorbate*. Redox Biol, 2019. **21**: p. 101062.
42. Firczuk, M., et al., *Harnessing altered oxidative metabolism in cancer by augmented prooxidant therapy*. Cancer Lett, 2020. **471**: p. 1-11.
43. Boutter, J., et al., *Image-based RNA interference screening reveals an individual dependence of acute lymphoblastic leukemia on stromal cysteine support*. Oncotarget, 2014. **5**(22): p. 11501-12.
44. Fidył, K., et al., *Targeting the thioredoxin system as a novel strategy against B-cell acute lymphoblastic leukemia*. Mol Oncol, 2019. **13**(5): p. 1180-1195.

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

Pracą naukową zainteresowałam się jeszcze w czasie studiów na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii oraz na Wydziale Farmacji Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku. Obie moje prace magisterskie obejmowały badania eksperymentalne w zakresie biochemii i dotyczyły białek zaangażowanych w syntezę kwasów nukleinowych. Dalsza moja aktywność naukowa prowadzona w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie pod kierunkiem prof. Matthiasa Bochtlera dotyczyła biologii strukturalnej, w szczególności krystalografii białek. Podczas

czterech lat pracy nad doktoratem zdobyłam obszerną wiedzę na temat funkcjonowania białek, relacji pomiędzy ich strukturą i funkcją, oddziaływań białek z innymi makromolekułami oraz z inhibitorami drobnocząsteczkowymi. Zajmowałam się głównie enzymami bakteryjnymi należącymi do grupy proteaz i endonukleaz.

Krótko po obronie doktoratu zmieniałam tematykę badawczą i zaczęłam zajmować się onkologią eksperymentalną. Zostałam przyjęta na stanowisko post-doc do projektu TEAM realizowanego w Zakładzie Immunologii na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, gdzie zajmowałam się terapią fotodynamiczną nowotworów. Zostałam również włączona w inne projekty badawcze prowadzone w Zakładzie Immunologii. Szczególnie zainteresowałam się zbadaniem mechanizmu działania nowego inhibitora enzymów antyoksydacyjnych, związku SK053. Na te badania otrzymałam swoje własne finansowanie z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) w ramach programu IUVENTUS w 2010 roku. Od tego czasu rozpoczęłam samodzielną pracę naukową, kierując na początku małą grupą badawczą, składającą się głównie ze studentów Koła Naukowego przy Zakładzie Immunologii, a następnie, od roku 2016, większą grupą badawczą. Obecnie kieruję zespołem, w skład którego wchodzi 2 osoby na stanowisku post-doc, 2 doktorantów oraz 3 studentów. Jako kierownik projektu, uzyskałam finansowanie na badania w konkursach organizowanych przez MNiSW (grant własny 2010-2013, Iuventus Plus 2010-2011, Iuventus Plus 2012-2015) oraz Narodowe Centrum Nauki (SONATA Bis 2016-2020, OPUS 2017-2020). Ponadto byłam/jestem opiekunem naukowym grantów kierowanych przez moich podopiecznych (Diamentowy Grant MNiSW, 2012-2014, kierownik Magdalena Gabrysiak, Diamentowy Grant MNiSW, 2014-2017, kierownik Antoni Domagała, grant NCN PRELUDIUM, 2019-2021, kierownik mgr. Klaudyna Fidył, grant NCN ETIUDA, 2019-2021, kierownik mgr Klaudyna Fidył). Biorę również czynny udział w projektach realizowanych przez członków mojego zespołu (grant NCN OPUS 2019-2022, kierownik dr Angelika Muchowicz).

W latach 2017-2019 brałam również udział w realizacji projektu STREAM finansowanego przez Komisję Europejską w programie Horyzont 2020. Głównym celem projektu STREAM było stworzenie długoterminowego, strategicznego partnerstwa pomiędzy Warszawskim Uniwersytetem Medycznym a najlepszymi europejskimi ośrodkami badawczymi, zajmującymi się immuno-onkologią. W ramach projektu STREAM byłam odpowiedzialna za wkład merytoryczny do strony internetowej projektu, organizowałam i współredagowałam teksty popularnonaukowe publikowane w zakładce Baza Wiedzy na stronie projektu STREAM, współorganizowałam warsztaty z cytometrii przepływową, a także byłam zastępcą kierownika jednego z pakietów roboczych.

Projekty badawcze realizuję we współpracy z innymi ośrodkami, zarówno polskimi, jak i zagranicznymi. Grupy badawcze, z którymi współpraca zaowocowała już wspólnymi publikacjami to między innymi:

-grupa prof. Olafa Heidenreich z Laboratorium Princess Máxima Center w Utrechcie, Holandia (wcześniej laboratorium w Newcastle, Wielka Brytania) –*Fidyt 2019, Molecular Oncology*

-grupa prof. Dimitara Efremova, kierownika Laboratorium Hematologii Molekularnej z Międzynarodowego Centrum Inżynierii Genetycznej i Biotechnologii w Trieście, Włochy –*Graczyk-Jarzynka 2019, Redox biology*

-grupa prof. Wojciecha Młynarskiego i dr Agaty Pastorczak z Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi - *Fidyt 2019, Molecular Oncology*

-zespoły prof. Urszuli Demkow i prof. Michała Matysiaka ze Szpitala Pediatrycznego WUM - *Fidyt 2019, Molecular Oncology*

-zespoły prof. Ewy Lech-Marańdy i prof. Przemysława Juszczynskiego z Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, - *Fidyt 2019, Molecular Oncology, Graczyk-Jarzynka 2019, Redox biology*

- grupa prof. Ostaszewskiego z Instytutu Chemii Organicznej PAN -*Trzeciecka 2016, Oncotarget*

- grupa prof. Dadleza z Laboratorium Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN - *Trzeciecka 2016, Oncotarget, Bobrowicz 2017, Blood*

-grupa prof. Rafała Płoskiego z Zakładu Genetyki WUM –*Lechowicz 2017, Scientific Reports*.

W ciągu ostatnich kilku lat moje zainteresowania podążają w kierunku immunologii nowotworów, immunoterapii oraz badania wpływu stresu oksydacyjnego na przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną. W trakcie realizacji projektu STREAM przebywałam na stażu w Międzynarodowym Centrum Inżynierii Genetycznej i Biotechnologii w Trieście. Tam nawiązałam współpracę z prof. Federiką Benvenuti, kierownikiem Laboratorium Immunologii Komórkowej, która bada między innymi rolę komórek prezentujących antygen w rozwoju przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. We współpracy z prof. Benvenuti mój zespół opracował testy funkcjonalne, które znajdują zastosowanie w naszych badaniach nad rolą limfocytów regulatorowych oraz metabolizmem redoks w białaczkach. Ponadto, nawiązałam współpracę naukową z zespołem dr Ettiennę Mousay i dr Jerome Pagetti z Zakładu Onkologii w Instytucie Zdrowia w Luxemburgu, który dysponuje zaawansowanymi modelami mysimi do badania roli limfocytów regulatorowych w nowotworach.

Kontynuuję również badania nad mechanizmem działania inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych. W ostatnim czasie odkryliśmy, że auranofina reguluje ekspresję genów związanych z apoptozą poprzez wpływ na modyfikacje epigenetyczne. Aby dokładniej zbadać procesy epigenetyczne

regulowane przez auranofinę, nawiązałam współpracę z grupą prof. Thomasa Milne, kierownika Laboratorium epigenetyki i regulacji genów na Wydziale Medycyny Uniwersytetu Radcliffe w Oksfordzie. Doktorantka z mojego zespołu badawczego, mgr. Klaudyna Fidył, odbyła 3-miesięczny staż w zespole prof. Milne w ramach programu ETIUDA, finansowanego przez NCN.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

W ramach działalności dydaktycznej:

- w latach 2010-2016 prowadziłam seminaria z immunologii ze studentami Wydziału Farmaceutycznego,
- jestem współautorką rozdziałów w podręczniku Immunologia wydanego nakładem PWN,
- prowadzę 7-osobowy zespół badawczy realizujący 4 granty badawcze finansowane przez Narodowe Centrum Nauki
- jestem opiekunem studentów Koła Studenckiego przy Zakładzie Immunologii, wdrażam ich w pracę naukową, wspieram w pozyskiwaniu własnego finansowania (dwa granty Diamentowe - lek med. Magdalena Gabrysiak, lek med. Antoni Domagała; Preludium – mgr. Klaudyna Fidył),
- byłam opiekunem i promotorem pomocniczym w 2 pracach magisterskich, obecnie jestem promotorem prac magisterskich dwóch studentek Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, Julii Cyran oraz Alicji Wojciechowskiej,
- obecnie jestem opiekunem dwóch doktorantów i pełnię rolę promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim mgr Klaudyny Fidył.

W ramach działalności popularyzatorskiej:

- udzieliłam wywiadu w Radiu TOK FM w audycji „Weekendowy poranek” prowadzonej przez redaktor Karolinę Głowacką, w której komentowałam odkrycia Noblistów z dziedziny medycyny, przyznanej JP Allisonowi i T Hojo za odkrycie punktów kontrolnych układu odpornościowego

<https://audycje.tokfm.pl/podcast/Nobel-z-medycyny-pozwoli-na-skuteczniejsze-terapie-nowotworowe/67698>

- w latach 2016-2018 prowadziłam nadzór merytoryczny i współredagowałam teksty publikowane na stronie internetowej projektu STREAM (<https://stream.wum.edu.pl/>); byłam koordynatorem i współautorem wszystkich tekstów popularnonaukowych opublikowanych na stronie projektu STREAM w zakładce Baza Wiedzy (<https://stream.wum.edu.pl/pl/baza-wiedzy>)

- w roku 2016 zorganizowałam i wzięłam udział w prowadzeniu spotkania z dziećmi z Przedszkola Niepublicznego „Wesołe Krasnale” w Warszawie, na temat: „Zawód lekarza, obrona przed drobnoustrojami, zdrowy styl życia” w ramach cyklu: „Zawody naszych rodziców”
- w roku 2016 udzieliłam wywiadu dla czasopisma WUM - Medycyna Dydaktyka Wychowanie, w którym opowiedziałam o przebiegu swojej pracy naukowej.

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

Wykazuję dużą aktywność w recenzowaniu prac naukowych w międzynarodowych czasopismach. Jak dotąd zrecenzowałam ponad 20 prac w czasopismach takich jak: *Cancer Research*, *Chemical Science*, *Redox Biology*, *Theranostics*, *Cells*, *Cancer Letters*, *European Journal of Cancer*, *Cancers*, *Cancer Immunology Immunotherapy*, *Oncotarget*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Acta Haematologica*, *Central European Journal of Biology*, *Molecular Medicine Reports*, *Oncology Letters*, *Oncology Reports*, *International Journal of Oncology*, *Biology Open*. Ponadto, regularnie recenzuję abstrakty na coroczną konferencję studencką WIMC - Warsaw International Medical Congress.

**Adiunkt
Zakład Immunologii**

Dr n. biol. Małgorzata Firczuk

.....
Podpis