

Załącznik 2A

Autoreferat

Dr n farm. Irena Misiewicz-Krzemińska

Salamanca, Kwiecień 2019

1. Imię i Nazwisko: Irena Misiewicz-Krzemińska (nazwisko panieńskie Misiewicz)

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

2006- stopień **doktora nauk farmaceutycznych**, specjalność **biochemia farmaceutyczna**. Uniwersytet Medyczny w Łodzi, wydział Farmaceutyczny.

Tytuł rozprawy- „*Właściwości chemoprewentywne związków z grupy izotiocyjanianów.*”

Promotor- Prof. dr hab. Teresa Kasprzycka-Guttman

2002- tytuł **magistra inżyniera biotechnologii**, specjalność **biotechnologia w produkcji i ochronie zdrowia zwierząt**. Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, SGGW.

Tytuł pracy magisterskiej- “*Cytotoksyczny wpływ doksorubicyny i WP903 na odporne i wrażliwe linie komórek nowotworowych*”

Promotor- dr Janusz Skierski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2009- obecnie, staż podoktorski, Universidad de Salamanca, Hiszpania

Podczas stażu zatrudniona na następujących stanowiskach:

07/2009-12/2009	Cancer Research Center of Salamanca, Post-Doc
01/2010-12/2013	Hospital Universitario de Salamanca, Klinika Hematologii, Naukowiec, doktor, w projekcie ISCIII PS09/01897
01/2014-12/2015	Cancer Research Center of Salamanca Naukowiec, doktor
01/2016-12/2016	Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL) Naukowiec, doktor, w projekcie International Myeloma Foundation, Black Swan Research Initiative
01/2017-obecnie	Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL) Naukowiec, doktor
Od 2006-obecnie	Narodowy Instytut Leków, Warszawa (od 07/2009 urlop bezpłatny) Adiunkt
1998-2006	Narodowy Instytut Leków, Warszawa Asystent

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

“Wpływ potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów na patogenezę i rokowanie pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym.”

b) wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego
Przedmiotem postępowania habilitacyjnego jest cykl 7 prac opublikowanych w latach 2010-2019, sześciu artykułów eksperymentalnych i jednej przeglądowej

A1. Norma C. Gutiérrez, Maria Eugenia Sarasquete, **Irena Misiewicz-Krzeminska**, Manuel Delgado, Javier De Las Rivas, Fany V. Ticona, Encarna Ferriñán, Patricia Martín-Jiménez, Carmen Chillón C, Alberto Risueño, Jesus Maria Hernández, Ramon García-Sanz, Marcos González, Jesus F. San Miguel. *Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. **Leukemia** 24(3):629-37, 2010*

IF₂₀₁₀=8.966, punkty MNiSW=32 , liczba cytowań do 21/03/2019= 136

A2. María E Sarasquete; Norma C Gutiérrez; **Irena Misiewicz Krzeminska**; Bruno Paiva; María C Chillón; Miguel Alcoceba; Ramón García Sanz; Jesús M Hernández; Marcos González; Jesús F San Miguel. *Upregulation of Dicer is more frequent in monoclonal gammopathies of undetermined significance than in multiple myeloma patients and is associated with longer survival in symptomatic myeloma patients. **Haematologica** 96 - 3, pp. 468 – 539, 2011*

IF₂₀₁₁=6.424, punkty MNiSW=40, liczba cytowań do 21/03/2019= 21

A3. **Irena Misiewicz-Krzeminska**, María E Sarasquete, Dalia Quwaider, Patryk Krzeminski, Fany V Ticona, Teresa Paíno, Manuel Delgado, Andreia Aires, Enrique M Ocio, Ramón García-Sanz, Jesús F. San Miguel, Norma C Gutiérrez. *Restoration of microRNA-214 expression reduces growth of myeloma cells through positive regulation of P53 and inhibition of DNA replication. **Haematologica** 98(4):640-8, 2013*

IF₂₀₁₃=5.868, punkty MNiSW=40, liczba cytowań do 21/03/2019= 46

A4. **Irena Misiewicz-Krzeminska**, María E Sarasquete, Carolina Vicente-Dueñas, Patryk Krzeminski, Katarzyna Wiktorska, Luis A Corchete, Dalia Quwaider, Elizabeta A Rojas, Rocio Corral, Ana A Martín, Fernando Escalante, Abelardo Báez, Juan L García, Isidro Sánchez-García, Ramón García-Sanz, Jesús F San Miguel, Norma C Gutiérrez. *Post-transcriptional Modifications Contribute to the Upregulation of Cyclin D2 in Multiple Myeloma. **Clinical Cancer Research** 22(1):207-17, 2016*

IF₂₀₁₆=9.619, punkty MNiSW=45, liczba cytowań do 21/03/2019= 4

A5. Elizabeta A. Rojas, Luis A. Corchete, Laura San-Segundo, Juan F. Martínez-Blanch, Francisco M. Codoñer, Teresa Paíno, Noemi Puig, Ramón García-Sanz, Maria Victoria Mateos, Enrique M. Ocio, **Irena Misiewicz-Krzeminska***, Norma C. Gutiérrez* (equal contribution). *Amiloride, An Old Diuretic Drug, Is a Potential Therapeutic Agent for Multiple Myeloma*. **Clinical Cancer Research** 23(21):6602-6615, 2017

IF₂₀₁₇=10.199 punkty MNiSW=45, liczba cytowań do 21/03/2019=2

A6. Irena Misiewicz-Krzeminska, Luis A Corchete, Elizabeta A Rojas, Joaquin Martínez-López, Ramon García-Sanz, Albert Oriol, Joan Bladé, Juan J Lahuerta, Jesus F San Miguel, Maria Victoria Mateos, Norma C Gutiérrez. *A novel nano-immunoassay method for quantification of proteins from CD138-purified myeloma cells: biological and clinical utility*. **Haematologica** 103(5):880-889, 2018

IF₂₀₁₇=9.090, punkty MNiSW=40, liczba cytowań do 21/03/2019= 1

A7. Irena Misiewicz-Krzeminska, Patryk Krzeminski, Luis A. Corchete, Dalia Quwaider, Elizabeta A Rojas, Ana Belen Herrero, Norma C. Gutierrez *Factors that regulate microRNA expression and function in multiple myeloma*. **Non-Coding RNA** 5(1), 9, 2019 artykuł przeglądowy

IF₂₀₁₇= -, MNSiW=- (nowe czasopismo)

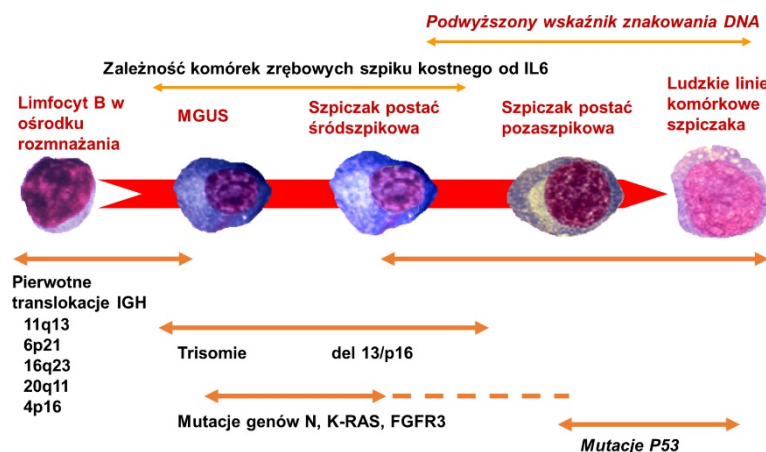
Opis mojego indywidualnego wkładu w powstanie każdej publikacji znajduje się w załączniku 5.

Oświadczenia współautorów opisujące ich wkład w powstanie każdej publikacji znajdują się w załączniku 4 (oświadczenia współautorów).

c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie i hipoteza

Szpiczak plazmocytowy nazywany też szpiczakiem mnogim (ang. *multiple myeloma*; MM) jest nowotworem charakteryzującym się akumulacją klonalnych plazmocytów (ang. *plasma cells*; PC) w szpiku kostnym. Akumulacja tych komórek przeważnie wiąże się wytwarzaniem dużych ilości immunoglobulin monoklonalnych i powstaniem zmian litycznych w obrębie kości. MM odpowiada za 1% wszystkich nowotworów i około 10% wszystkich złośliwych nowotworów hematologicznych¹. Na podstawie danych klinicznych i biologicznych zaproponowano wieloetapowy model progresji choroby, wychodząc od gammopatii monoklonalnej o niezidentyfikowanym znaczeniu (ang. *gammopathy of undetermined significance*; MGUS), przechodząc w postać objawową, niekiedy z jednostką pośrednią zwaną tłącym się szpiczakiem mnogim (ang. *smoldering MM*; SMM), a kończąc na chorobie pozaszpikowej (Ryc. 1)^{2,3}.



Ryc.1. Wielostopniowy model progresji choroby i zdarzeń genetycznych w szpiczaku plazmocytowym (na podstawie ⁴).

Szpiczak plazmocytowy jest chorobą niejednorodną cytogenetycznie. Wstępne badania metodami cytogenetyki konwencjonalnej i fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *fluorescent in situ hybridization*; FISH) oraz przy pomocy bardziej zaawansowanych technik opartych na mikromacierzach i sekwencjonowaniu nowej generacji (ang. *next generation sequencing*; NGS) ujawniły istnienie różnych typów zmian genetycznych, które można podzielić na translokacje, nieprawidłowości liczby kopii (ang. *copy number abnormalities* CNA) i mutacje punktowe.⁵⁻⁷ Większość translokacji chromosomowych wpływa na locus *IGH* w 14q32 i dotyczy około 50% pacjentów. Pięć obszarów chromosomalnych odpowiada za większość translokacji *IGH* w komórkach szpiczaka; 11q13, 4p16, 16q23, 6p21 i 20q11. Translokacje te prowadzą do nadekspresji odpowiednio cykliny D1, FGFR3/MMSET, c-MAF, cykliny D3 i MAF-B. Obecność translokacji t(4;14), t(14;16) lub t(14;20) została powiązana ze złym rokowaniem. CNA są obecne u prawie wszystkich pacjentów ze szpiczakiem; wśród nich najczęstsze są dodatkowe kopie całych chromosomów 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21 i ramienia 1q oraz utrata obszarów 1p, 13q i 17p. Delecja 17p, która obejmuje locus *TP53*, jest

obecna w 10% przypadków i utrzymuje się jako silny negatywny czynnik prognostyczny w różnych schematach leczenia. Profilowanie ekspresji genów ujawniło również, że ekspresja genów *CCND1*, *CCND2* lub *CCND3* jest podwyższona praktycznie we wszystkich przypadkach szpiczaka mnogiego. Ugruntowuje to hipotezę o potencjalnym zdarzeniu unifikującym zachodzącym podczas patogenezy szpiczaka mnogiego⁸.

Jednakże, inaczej niż wykazano w wielu innych nowotworach, większość zmian w zakresie ekspresji genów w MM nie jest poprzedzona zmianami w DNA w postaci mutacji, anomalii chromosomalnych lub nawet modyfikacji epigenetycznych (metylacja DNA). Pod tym względem rozregulowanie na poziomie potranskrypcyjnym jest coraz częściej uznawane za kluczowy mechanizm modyfikowania ekspresji genów przy braku nieprawidłowości w obrębie DNA.

W przedstawionej pracy przyjętą hipotezą badawczą jest to, że ekspresja genów w szpiczaku plazmocytowym jest regulowana przede wszystkim przez mechanizmy potranskrypcyjne, których modyfikacja może służyć jako podejście terapeutyczne, jednocześnie regulacja ta ma wpływ na to jak skutecznie można przewidywać przebieg choroby pacjentów badając ekspresję genów na poziomie mRNA i białka.

Potranskrypcyjne modyfikacje pre-mRNA, takie jak dołączenie czapeczki poli(A), splicing i poliadenylacja, zachodzą w jądrze komórkowym. W dalszej kolejności dojrzałe cząsteczki mRNA ulegają translokacji do cytoplazmy, gdzie zachodzi synteza białek i dochodzi do regulacji za pośrednictwem miRNA. Wśród wszystkich wymienionych mechanizmów, miRNA mogą kontrolować aktywność ponad 30% wszystkich genów kodujących białka, stąd są one intensywnie badane.

Wprowadzenie na temat miRNA i mechanizmów prowadzących do deregulacji ich ekspresji i funkcji w szpiczaku opisano w:

Misiewicz-Krzeminska I, Krzeminski P, Corchete LA, Quwaider D, Rojas EA, Herrero AB, Gutierrez NC. Factors that regulate microRNA expression and function in multiple myeloma. Non-Coding RNA, Non-Coding RNA 5(1), 9; 2019

MikroRNA (ang. *microRNAs*, miRNA) są małymi regulatorowymi RNA, o zakresie długości od 19 do 25 nt, które są kodowane przez genomowy DNA. Według bazy danych miRBase, u ludzi, jak również u innych ssaków, zidentyfikowano prawie 2000 różnych miRNA⁹. Chociaż opisano różne funkcje miRNA, najbardziej istotną jest obniżenie ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym poprzez ukierunkowanie na swoje RNA informacyjne (ang. *messenger RNA*, mRNA). W mechanizmie tym zachodzi degradacja mRNA po całkowitym sparowaniu miejsca wiązania tzw. regionu *seed* miRNA z docelowym mRNA. Przy czym miejsce wiązania zlokalizowane jest w regionie nieulegającym translacji 3' (ang. *3'untranslated region*, 3'UTR) docelowego mRNA. Innym mechanizmem obniżania poziomu ekspresji genu jest hamowanie jego translacji, gdy parowanie zasad z miejscami komplementarnymi jest jedynie częściowe. MiRNA biorą udział w kluczowych procesach biologicznych, w tym w rozwoju i różnicowaniu komórek, jak też mogą przyczyniać się do patogenezy nowotworów¹⁰⁻¹⁴.

Większość ludzkich genów miRNA znajduje się w DNA między genami kodującymi białka (międzygenowe miRNA), podczas gdy około jednej trzeciej z nich znaleziono w obrębie genów kodujących białka, zwanych genami gospodarzami (ang. *host genes*)¹⁵. Wewnątrzgenowe miRNA, zlokalizowane w intronach lub eksonach genów kodujących białka, są współtranskrybowane przez Pol II, a ich ekspresja jest na ogół regulowana przez te same mechanizmy, jakie działają na geny w których są zlokalizowane^{15,16}. Międzygenowe miRNA są transkrybowane z własnego promotora przez Pol II lub Pol III, a niewielka grupa miRNA może być transkrybowana bez udziału żadnego egzogenego promotora¹⁵⁻¹⁷. Mutacje w sekwencjach DNA kodujących miRNA są raczej rzadkimi zjawiskami^{18,19}. Ekspresja miRNA w szpiczaku plazmocytowym jest regulowana przez wiele czynników i mechanizmów molekularnych, od tych wpływających na liczbę kopii DNA, metylację miejsc CpG, czynniki transkrypcyjne, biogenezę miRNA aż do tych modyfikujących dostępność miejsc wiązania miRNA w sekwencji mRNA.²⁰⁻²⁹

Ekspresja miRNA ulega deregulacji w komórkach szpiczaka, a profil ekspresji miRNA w szpiczaku jest związany ze specyficznymi nieprawidłowościami cytogenetycznymi.

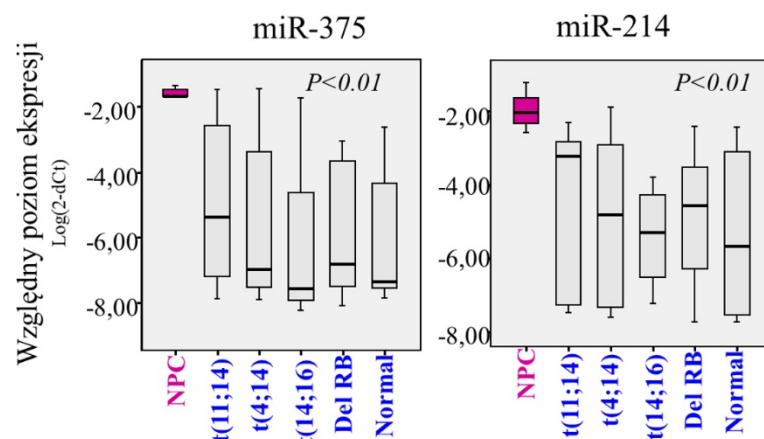
Profilowanie miRNA w poszczególnych podtypach szpiczaka i powiązanie z profilem ekspresji genów opisano w:

*Gutiérrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, Delgado M, De Las Rivas J, Ticona FV, Ferriñán E, Martín-Jiménez P, Chillón C, Risueño A, Hernández JM, García-Sanz R, González M, San Miguel JF. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. **Leukemia** 24(3):629-37, 2010*

Badanie profili ekspresji miRNA opisano wcześniej w kilku nowotworach hematologicznych, takich jak przewlekła białaczka limfocytowa^{30,31} i ostra białaczka szpikowa^{32,33}, gdzie powiązano swoiste wzorce ekspresji miRNA z różnymi podtypami genetycznymi. Ilość tego typu danych dotyczących komórek szpiczaka była ograniczona.^{22,24} W związku z tym postawiono hipotezę, że tego typu zależność będzie występować także u pacjentów z szpiczakiem. W celu sprawdzenia tej hipotezy, zbadano ekspresję 365 miRNA za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy, qPCR. Badanie wykonano na 5 próbkach kontrolnych zdrowego szpiku kostnego (ang. *bone marrow*; BM) uzyskanych od dawców szpiku do przeszczepu alogenicznego i 60 próbkach od pacjentów z nowo zdiagnozowanym szpiczakiem. Pacjenci zostali wybrani na podstawie cech cytogenetycznych, tak aby grupa odzwierciedlała najbardziej istotne nieprawidłowości cytogenetyczne w szpiczaku.

Dwuwymiarowa analiza skupień metodą klasyfikacji bez nadzoru (ang. *non-supervised analysis*) wykazała brak wyraźnie oddzielonych klastrów ekspresji miRNA, zgodnych z nieprawidłowościami chromosomowymi. W podejściu nadzorowanym (ang. *supervised analysis*) poszukiwano miRNA, których ekspresja była istotnie rozregulowana w różnych podtypach cytogenetycznych szpiczaka w porównaniu z

normalnymi komórkami plazmatycznymi. Zidentyfikowano 11, 8, 7, 37 i 18 miRNA podlegających różnicowej ekspresji w komórkach szpiczaka od pacjentów z odpowiednio: t(4;14), t(14;16), t(11;14), delecją RB jako unikalną nieprawidłowością i w cytogenetycznie normalnych próbkach szpiczaka. Jedynie *miR-214* i *miR-375* były uniwersalnie rozregulowane w porównawczej analizie obejmującej tych pięć różnych grup (oba miRNA wykazywały obniżoną ekspresję) (Ryc. 2). Ponadto większość rozregulowanych miRNA ulegała obniżonej ekspresji, co jest zgodne z globalnym spadkiem poziomów miRNA obserwowanym w innych nowotworach ludzkich.^{34,35}



Ryc. 2. Ekspresja *miR-375* i *miR-214* w normalnych komórkach plazmatycznych (NPC) i komórkach szpiczaka (MM). Normalizację przeprowadzono za pomocą *RNU44* i *RNU48*, ponieważ ulegały one jednolitej ekspresji we wszystkich badanych próbkach. Względny kwantyfikację ekspresji miRNA określono za pomocą metod $2\Delta Ct$ i $2\Delta\Delta Ct$, gdzie $\Delta Ct = Ct(miRNA) - Ct(miRNA \text{ kontrolne})$ i $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(MM) - \Delta Ct(\text{średnia dla NPC})$. Dane przedstawiono jako $\log_{10}$ względnej ilości każdego miRNA.

Coraz więcej danych wskazuje, że jednoczesne profilowanie mRNA za pomocą mikromacierzy i miRNA jest skuteczną strategią do wykrywania genów docelowych dla poszczególnych miRNA³⁶. W związku z tym dokonano wspólnej analizy danych ekspresji miRNA i mRNA w celu wykrycia, które z rozregulowanych genów mogą być specyficznymi genami docelowymi dla poszczególnych miRNA i tworzyć sygnaturę każdej z grup cytogenetycznych szpiczaka.

Po przeanalizowaniu ekspresji miRNA charakterystycznych dla szpiczaka z t(4;14) i t(14;16), większość prawdopodobnych genów docelowych dla tych miRNA przypisano do kategorii funkcjonalnych wzrostu i proliferacji komórek. Obserwacja ta sugeruje możliwy związek między obniżeniem ekspresji miRNA w tych grupach szpiczaka i postępem wzrostu komórek. Z kolei w przypadku szpiczaka z monosomią 13, większość potencjalnych genów docelowych które wykazywały odwrotną korelację z profilem miRNA u pacjentów z tej grupy była powiązana z kategorią śmierci komórki.

Interesujące, że gen *CCND2*, który wykazywał podwyższoną ekspresję zarówno w podtypach szpiczaka t(4;14), t(14;16), jak i w monosomii 13, ma miejsca docelowe dla kilku miRNA istotnie rozregulowanych w tych podtypach cytogenetycznych. Zaproponowano, że deregulacja genów kodujących cykliny D jest unifikującym zdarzeniem onkogennym w szpiczaku⁸. Około 45% przypadków szpiczaka wykazuje

ekspresję *CCND2*, w szczególności tych z t(14;16) i t(4;14). Jednak mechanizm odpowiedzialny za podwyższoną ekspresję *CCND2* w szpiczaku pozostaje zasadniczo nieznany. Dlatego można spekulować, że obniżona ekspresja *miR-196b*, *miR-135b*, *miR-320*, *miR-20a*, *miR-19b*, *miR-19a* i *miR-15a* stwierdzona w wielu podtypach szpiczaka może przyczynić się do nadekspresji ich prawdopodobnego genu docelowego, *CCND2*. Warto zauważyć, że *miR-15a* i *miRNA-19a* były jedynymi miRNA wytypowanymi przy użyciu rygorystycznej analizy i miały odpowiednio trzy oraz dwa miejsca wiązania w 3'UTR *CCND2*.

Wyniki te wskazują, że wzór ekspresji miRNA w szpiczaku jest związany z nieprawidłowościami cytogenetycznymi. Aby móc ocenić, dla których genów istotnych z punktu widzenia patogenezy szpiczaka zmiana ich ekspresji jest związana ze zmianami w poziomie poszczególnych miRNA, pomocna jest analiza korelacji profili ekspresji miRNA i mRNA, z uwzględnieniem analizy prawdopodobnych genów docelowych dla każdego z miRNA.

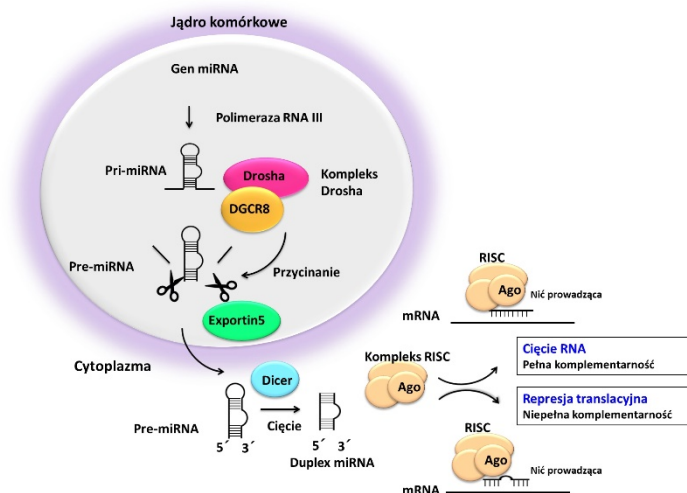
Upośledzona obróbka miRNA może wpływać na ekspresję miRNA w szpiczaku

Efekt deregulacji genów zaangażowanych w biogenezę miRNA na patogenezę szpiczaka został opisany w:

María E Sarasquete; Norma C Gutiérrez; Irena Misiewicz-Krzeminska; Bruno Paiva; María C Chillón; Miguel Alcoceba; Ramón García Sanz; Jesús M Hernández; Marcos González; Jesús F San Miguel. Upregulation of Dicer is more frequent in monoclonal gammopathies of undetermined significance than in multiple myeloma patients and is associated with longer survival in symptomatic myeloma patients. Haematologica 96 - 3, pp. 468 – 539, 2011

Ponieważ większość miRNA w badanych próbkach szpiczaka wykazywała obniżoną ekspresję w stosunku do NPC, nasza grupa zdecydowała się skupić na potencjalnych mechanizmach prowadzących do obniżenia poziomu ekspresji tych miRNA. Spośród wielu możliwości, zdecydowano skupić się na procesie biogenezy dojrzałego miRNA.

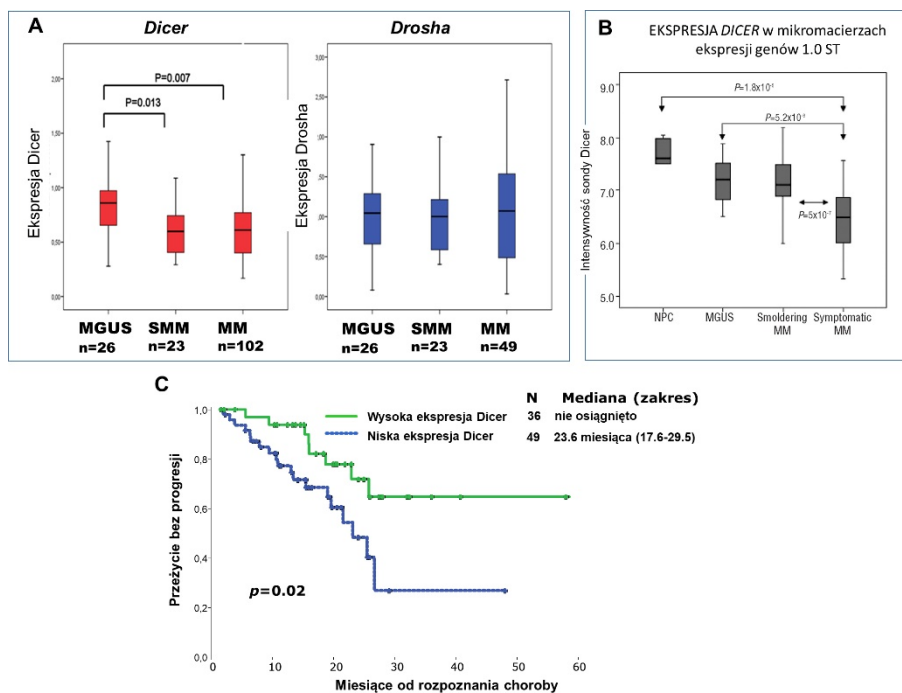
Obróbka miRNA rozpoczyna się w jądrze komórkowym, gdzie długie endogenne dwuniciowe odcinki RNA (pri-miRNA) są cięte przez enzym RNazę III, Drosha, na krótkie dwuniciowe prekursorzy RNA o strukturze szpilki do włosów (pre-miRNA). Pre-miRNA następnie przemieszczają się do cytoplazmy, gdzie są cięte przez enzym Dicer, w wyniku czego powstają dojrzałe miRNA, które powodują degradację mRNA lub represję translacyjną po aktywacji przez kompleks wyciszający indukowany przez RNA (ang. *RNA-induced silencing complex*; RISC). (Ryc. 3)



Ryc. 3. Szlak biogenezy miRNA ³⁷

Wykazano, że enzymy Dicer i Drosha, jako główne regulatory mechanizmu interferencji RNA, mają wpływ na powstawanie różnych typów nowotworów złośliwych ^{38,39}. Progresywny model transformacji szpiczaka zapewnia unikatową możliwość badania potencjalnej roli *Dicer* i *Drosha* w patogenezie gammopatii monoklonalnych. W związku z tym, postanowiono ocenić poziom ekspresji *Dicer* i *Drosha* u pacjentów z gammopatiami monoklonalnymi. Zbadano również korelację ekspresji *Dicer* z przebiegiem choroby w objawowym szpiczaku mnogim, leczonym zgodnie z hiszpańskim badaniem klinicznym Pethema GEM-2005 ⁴⁰

Wartości ekspresji *Dicer* były istotnie wyższe w MGUS niż w SMM i objawowym szpiczaku. Nie stwierdzono jednak różnic między SMM a szpiczakiem objawowym (Ryc. 4). Poziom ekspresji *Dicer* w NPC od zdrowych dawców był bardzo podobny do otrzymanego dla MGUS. Nie stwierdzono żadnych istotnych różnic w ekspresji *Drosha* między tymi jednostkami chorobowymi, choć warto zaznaczyć że analizowana grupa pacjentów ze szpiczakiem była niewielka (n = 49). Powyższe dane wskazują, że MGUS, jako stan przednowotworowy, wykazuje wyższy poziom ekspresji *Dicer* niż SMM, jak i objawowy szpiczak, a przy tym jest bardzo zbliżony do oznaczonego w NPC. Wyniki te są zgodne danymi otrzymanymi w nowotworach płuc, gdzie stwierdzono podwyższoną ekspresję *Dicer* w zmianach prekursorowych i obniżoną ekspresję w bardziej agresywnych stadiach ³⁸.



Ryc. 4. Ekspresja *Dicer* i *Drosha* w NPC, MGUS, SMM i MM, oceniana za pomocą qRT-PCR (A); Ekspresja *Dicer* w NPC, MGUS, SMM i MM oceniana za pomocą mikromacierzy Affymetrix (B); Przeżycie wolne od progresji (ang. *progression-free survival*; PFS) u pacjentów z objawowym szpiczakiem mnogim w odniesieniu do poziomu ekspresji genu *Dicer* (C)

W celu potwierdzenia wyników otrzymanych przy pomocy PCR, oceniono poziom ekspresji *Dicer* na podstawie danych z mikromacierzy Affymetrix, dla grupy 60 pacjentów z objawowym szpiczakiem i 5 NPC analizowanych przez nas wcześniej²¹ oraz dla 20 MGUS i 33 SMM⁴¹. Wyniki potwierdzają, że ekspresja *Dicer* była obniżona w objawowym szpiczaku w porównaniu z NPC i MGUS (Ryc. 4).

W przypadku niektórych nowotworów zasugerowano, że globalny wzrost poziomu ekspresji mikroRNA jest efektem podwyższenia poziomu ekspresji *Dicer*. Aby przeanalizować tę możliwość, porównano profile ekspresji miRNA dla pacjentów ze szpiczakiem mnogim o wysokim i niskim poziomie ekspresji *Dicer*. W przypadku 32 miRNA (8,7%), poziom ich ekspresji wykazywał wyższe wartości w grupie pacjentów z wysokimi poziomami ekspresji *Dicer*.

Na ostatnim etapie przeanalizowano, czy poziom ekspresji *Dicer* ma wpływ na przebieg choroby 85 pacjentów ze szpiczakiem mnogim, leczonych zgodnie z badaniem klinicznym GEM05. Dla pacjentów ze szpiczakiem mnogim o wysokim i niskim poziomie ekspresji *Dicer* nie stwierdzono istotnych różnic w parametrach klinicznych lub biologicznych. Mediana czasu przeżycia wolnego od progresji była jednak znacznie dłuższa u pacjentów ze szpiczakiem o wysokim poziomie ekspresji *Dicer* w porównaniu z tymi z niską ekspresją *Dicer* (mediana nie osiągnięta vs. 23,6 miesiąca; $p = 0,02$) (Ryc. 4).

Wyniki te wskazują, że u pacjentów z gammopatiami monoklonalnymi poziom *Dicer* jest podwyższony w stanie przednowotworowym w porównaniu z tłącym, jak i objawowym szpiczakiem. Ponadto, zgodnie z tą obserwacją, u pacjentów z objawowym

szpiczakiem przeżycie wolne od progresji jest dłuższe dla pacjentów o wysokim poziomie ekspresji *Dicer*.

Niska ekspresja miR-214 w szpiczaku przyczynia się do niekontrolowanego wzrostu tych komórek

Walidacja funkcji miR-214 w komórkach szpiczaka została opisana w:

Misiewicz-Krzeminska I, Sarasquete ME, Quwaider D, Krzeminski P, Ticona FV, Paino T, Delgado M, Aires A, Ocio EM, García-Sanz R, San Miguel JF, Gutiérrez NC. *Restoration of microRNA-214 expression reduces growth of myeloma cells through positive regulation of P53 and inhibition of DNA replication. Haematologica* 98(4):640-8, 2013

Zdecydowałam skoncentrować się badaniu na *miR-375* i *miR-214*, dwóch miRNA o rozregulowanej ekspresji we wszystkich grupach szpiczaka. Wstępne wyniki dotyczące wpływu nadekspresji ektopowej obu z nich w komórkach szpiczaka wskazują, że *miR-214* wykazuje wyższą aktywność przeciw szpiczakowi, dlatego w dalszych badaniach przeprowadziłam ocenę funkcji dla tego miRNA.

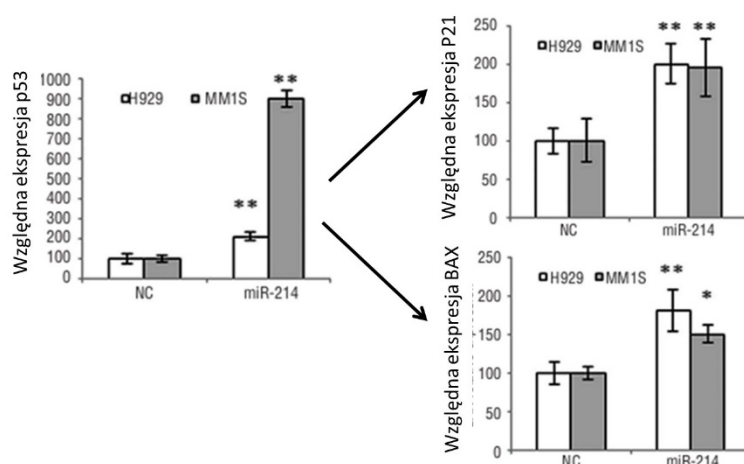
Deregulację poziomu *miR-214* obserwowano w różnych typach nowotworów. Nadekspresję *miR-214* odnotowano w przypadku czerniaków, nowotworów jajnika i żołądka⁴². W przeciwieństwie do tego, stwierdzono obniżoną ekspresję *miR-214* w nowotworach sutka, co prowadziło do zwiększonej proliferacji i inwazyjności komórek⁴³. Podobnie, niski poziom *miR-214* został powiązany z obecnością przerzutów i inwazyjnością guzów szyjki macicy⁴⁴, a ostatnio opisano również, obniżoną ekspresję *miR-214* w pierwotnych chłoniakach ośrodkowego układu nerwowego.⁴⁵

W ramach prowadzonych badań, w pierwszej kolejności zbadano poziom *miR-214* w serii dostępnych linii komórkowych. W ten sposób zweryfikowano, że linie komórkowe mogą służyć jako model eksperymentalny, odpowiadający pierwotnym komórkom szpiczaka pobranym od pacjentów. Kolejnym etapem badań była weryfikacja hipotezy dotyczącej udziału mechanizmów epigenetycznych w obniżeniu ekspresji *miR-214* w komórkach szpiczaka. Po zastosowaniu 5-aza-dC, czynnika demetylującego DNA, poziom ekspresji *miR-214* wzrósł ponad 2-krotnie w liniach komórkowych szpiczaka, co wskazało na udział procesu metylacji DNA w regulacji poziomu ekspresji *miR-214*.

Po nukleofekcji komórek szpiczaka pre-miRNA dochodziło do przywrócenia ekspresji *miR-214* w tych liniach komórkowych. W efekcie obserwowano zahamowanie proliferacji i indukcję procesu apoptozy. Należy zaznaczyć, że zahamowanie wzrostu rozpoczęło się 24 godziny później w komórkach ze zmutowanym genem *p53* lub nie wykazujących ekspresji *p53* (*p53-null*), niż w komórkach z *p53* typu dzikiego, *wt* (ang. *wild-type*). Aby zidentyfikować geny które mogą brać udział w szlakach biologicznych regulowanych przez *miR-214*, które jednocześnie są przewidziane jako geny docelowe dla *miR-214*, zastosowano strategię profilowania ekspresji genów. Ogółem 64 geny ulegały ponad dwukrotnej różnicowej ekspresji po ektopowej transfekcji *miR-214*. Spośród nich, 44 (69%) wykazywało obniżenie ekspresji. Analiza funkcjonalna ujawniła istotne wzbogacenie grup genów biorących udział w procesach replikacji DNA, cyklu

komórkowego i wiązania do DNA. *PSMD10* był jednym z prawdopodobnych genów docelowych dla *miR-214*, którego ekspresja po transfekcji *miR-214* była obniżona. *PSMD10*, zwany także podjednostką regulacyjną proteasomu 26S, działa jako onkoproteina (p28/gankyrina) i jest zaangażowany w negatywną regulację supresorów nowotworów RB1 i P53.⁴⁶ Badania przywrócenia funkcji (ang. *gain-of-function*) i z użyciem genów reporterowych lucyferazy wykazały, że ektopowa transfekcja *miR-214* obniżyła poziom ekspresji białka gankyriny przez bezpośrednie oddziaływanie na 3'UTR *PSMD10*. Ponadto, w wyniku obniżenia ekspresji gankyriny w komórkach *wt P53*, zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA *P53*. Doprowadziło to do podwyższonej ekspresji genów regulowanych bezpośrednio przez p53 na drodze regulacji transkrypcji (Ryc. 5). Jednym z mechanizmów onkogennych przypisywanych gankyrynie jest rekrutacja kompleksu MDM2/p53 do proteasomu i wzmacnianie metabolizmu białka p53 w sposób zależny od MDM2. W tym procesie białko gankyrina wiąże się z białkiem MDM2 i zwiększa zdolność MDM2 do ubiquitynacji p53. Wyniki naszych badań wykazały silniejsze hamowanie wzrostu komórek i silniejszy efekt proapoptotyczny po transfekcji *miR-214* w liniach komórkowych z *wt* i funkcjonalnym *P53*, niż w liniach komórkowych ze zmutowanym *P53*.

Mutacje *P53* są stosunkowo rzadkie u nowo zdiagnozowanych pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym, występując w przybliżeniu u około 5% pacjentów. Częstość występowania mutacji wydaje się wzrastać wraz z postępem choroby. Z drugiej strony, delecja (głównie mono-alleliczna) *P53* występuje w około 10% przypadków szpiczaka. Pomimo tej raczej małej częstości występowania, deregulacja p53 może odgrywać szerszą rolę w patogenezie szpiczaka niż wcześniej sądzono. Brak równowagi w szlakach z udziałem białka p53, może być również indukowany przy udziale mechanizmów potranskrypcyjnych.



Ryc. 5. Wpływ przywrócenia ekspresji *miR-214* na szlak *P53*. Poziom mRNA dla *P53*, *BAX* i *CDKN1A* (P21Cip1/Waf1) oceniono za pomocą qRT-PCR po transfekcji linii komórkowych H929 i MM1S prekursorem *miR-214* lub NC (non-targeting control). Wyniki przedstawiono jako średnią z trzech doświadczeń, po normalizacji względem *GAPDH*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Wśród genów podlegających deregulacji w komórkach szpiczaka po ektopowej transfekcji *miR-214*, stwierdzono istotne wzbogacenie grup genów należących do

kategorii replikacji DNA. Co ciekawe, trzy z nich, *ASF1B*, *MCM2* i *ORC1L*, zaangażowane w replikację DNA i wykazujące obniżoną ekspresję po transfekcji *miR-214*, są prawdopodobnymi genami docelowymi dla *miR-214*. Przywrócenie poziomu *miR-214* w komórkach szpiczaka zmniejszyło ekspresję mRNA i białka Asf1b. Wykazano ponadto, że spadek ten był wynikiem bezpośredniej interakcji *miR-214* z regionem 3'UTR w *ASF1B*. Asf1b jest białkiem opiekuńczym histonu H3-H4 i jego funkcją jest dostarczanie histonów do miejsc replikacji. Powyższe wyniki wskazują, że *miR-214* zakłóca proces replikacji komórek szpiczaka.

Podsumowując, wykazano że niska ekspresja *miR-214* w komórkach szpiczaka przyczynia się do utraty kontroli nad wzrostem tych komórek. Przywrócenie ekspresji *miR-214* w komórkach szpiczaka indukowało apoptozę i hamowało proliferację przez ingerencję w szlaki sygnałowe p53/MDM2 i replikacji DNA.

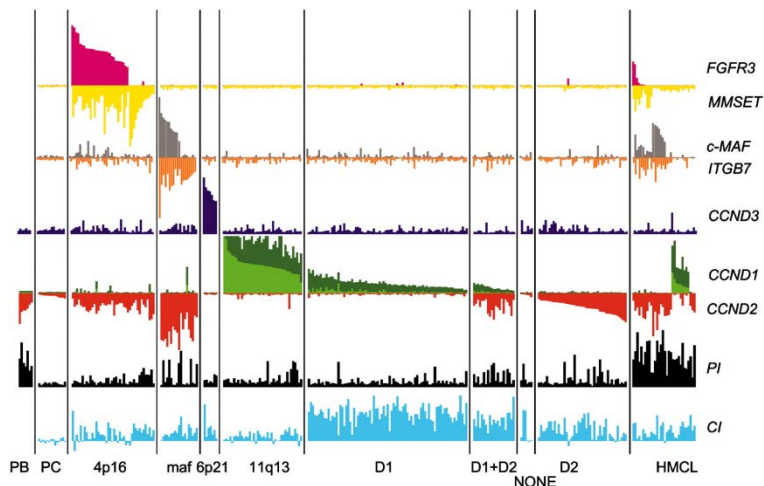
Poziom ekspresji *CCND2* w komórkach szpiczaka jest regulowany przez mechanizmy potranskrypcyjne

Mechanizmy regulujące ekspresję CCND2 w komórkach szpiczaka opisano w:

Misiewicz-Krzeminska I, Sarasquete ME, Vicente-Dueñas C, Krzeminski P, Wiktorska K, Corchete LA, Quwaider D, Rojas EA, Corral R, Martín AA, Escalante F, Báez A, García JL, Sánchez-García I, García-Sanz R, San Miguel JF, Gutiérrez NC. *Post-transcriptional Modifications Contribute to the Upregulation of Cyclin D2 in Multiple Myeloma. Clinical Cancer Research* 22(1):207-17, 2016

Cyklina D2 należy do grupy białek cyklin typu D, które ulegają cyklicznej ekspresji podczas faz cyklu komórkowego. W warunkach fizjologicznych cykliny D regulują przejście z fazy G1 do fazy S, przez oddziaływanie z kinazami zależnymi od cykliny 4 lub 6, co prowadzi do fosforylacji ich substratów.

Nasze wstępne dane ²¹ wykazały istotną korelację między podwyższeniem ekspresji *CCND2* a zmniejszoną ekspresją siedmiu miRNA w komórkach szpiczaka: *miR-15a*, *miR-19a*, *miR-19b*, *miR-20a*, *miR-135b*, *miR-196b* i *miR-320* ²¹. Jak już wspomniano wcześniej, ekspresja *CCND1*, *CCND2* lub *CCND3* jest podwyższona w praktycznie wszystkich przypadkach szpiczaka (Ryc. 6)⁸. *CCND1* jest bezpośrednio aktywowany przez t(11;14) oraz u pacjentów z polisomią 11, zaś *CCND3* ulega nadekspresji u pacjentów z t(6;14). Wysoka ekspresja *CCND2* występuje w szpiczaku z t(4;14), t(14;16) oraz w grupach hiper- i nie-hiperdiploidalnego szpiczaka mnogiego ⁴⁷. Mechanizmy, za pośrednictwem których dochodzi do podwyższonej ekspresji *CCND2* w tych przypadkach nie zostały w pełni wyjaśnione. Niewątpliwie *CCND2* nie jest bezpośrednio indukowany przez translokacje *IGH*, chociaż czynnik transkrypcyjny Maf zaangażowany w t(14;16) transaktywuje promotor *CCND2* ⁴⁸. Podobnie, opisano mechanizm transaktywacji *CCND2* w szpiczaku mnogim przez czynnik transkrypcyjny *ZKSCAN3* ⁴⁹.



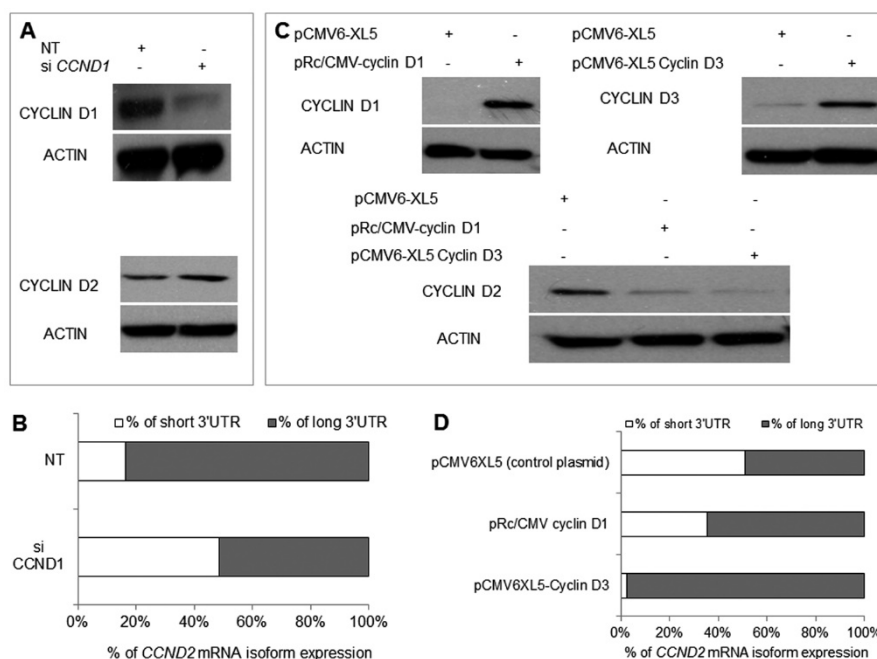
Ryc. 6. Identyfikacja grup TC (translokacje/ cyklina D) w MM za pomocą profilowania ekspresji RNA ⁸

W pierwszym etapie badań, zastosowano test reporterowy lucyferazy. Dzięki temu zidentyfikowano *CCND2* jako bezpośredni gen docelowy dla niektórych miRNA zidentyfikowanych wcześniej jako potencjalne regulatory *CCND2*, takich jak *miR-15a*, *19a*, *19b*, *20a*, *135b*, *196b*, *214*, *320* i *375* (Ryc. 7). Następnie dokonano walidacji tych danych poprzez transfekcję linii komórkowych szpiczaka tymi miRNA. Ektopowa transfekcja komórek szpiczaka za pomocą szeregu miRNA o obniżonej ekspresji w tych komórkach (*miR-15a*, *135b*, *196b*, *214* i *320*), doprowadziła do obniżenia poziomu białka cykliny D2 poprzez bezpośrednie oddziaływanie z 3'UTR *CCND2*. Efektu tego nie obserwowano jednak we wszystkich liniach komórkowych. Fakt ten wraz brakiem zdolności *miR-19a*, *19b* i *20a* do obniżenia ekspresji *CCND2* w tych liniach komórkowych, w których poziom tych miRNA był wysoki, sugerował możliwą utratę miejsc docelowych dla miRNA.

CCND2 obserwowano przy pomocy qRT-PCR u większości pacjentów i we wszystkich liniach komórkowych szpiczaka mnogiego, w których zachodziła ekspresja *CCND2*. Poziom występowania obu izoform mRNA *CCND2* oceniano również za pomocą dwubarwnej analizy FISH mRNA. Badanie zaprojektowano tak, aby możliwe było odróżnienie dwóch mRNA o różnej długości. Zauważono brak subpopulacji komórek o różnej ilości obu izoform. W związku z tym, wyciągnięto wniosek, że heterogenność klonalna obserwowana w szpiczaku na poziomie zmian genetycznych nie dotyczy występowania krótkich i długich izoform *CCND2* ⁵⁴.

Powstanie skróconych transkryptów, poprzez przedwczesne cięcie i poliadenylację RNA może być spowodowane delecjami genomowymi lub występowaniem mutacji punktowych w regionie 3'UTR⁵⁰. Niemniej jednak znaczna część ludzkich genów wykorzystuje alternatywne cięcie i poliadenylację (ang. *alternative cleavage and polyadenylation*; APA) do generowania transkryptów mRNA, które różnią się długością ich 3'UTR ⁵⁵. Hipotezę, że zmiany długości 3'UTR w *CCND2* są powodowane przez APA potwierdzają wyniki uzyskane w doświadczeniach RACE w liniach komórkowych szpiczaka mnogiego. Co więcej, podczas analizy sekwencjonowania masywnego setek próbek szpiczaka mnogiego z zastosowaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania równoległego nie wykryto delecji genomowych lub mutacji w *CCND2* ⁵⁶. Konsekwencje funkcjonalne skracania 3'UTR to stabilizacja mRNA z powodu utraty miejsc wiązania miRNA i innych elementów regulacyjnych znajdujących się w obrębie 3'UTR ^{50,55}. Badanie z użyciem genu reporterowego lucyferazy, przeprowadzone z użyciem plazmidów zawierających skrócone mRNA *CCND2* zdecydowanie potwierdziły utratę miejsc wiązania miRNA w krótszej izoformie mRNA *CCND2*. Obecność krótkiego 3'UTR, pozbawionego miejsc wiążących miRNA wiąże się z podwyższoną ekspresją różnych genów zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Wcześniejsze badania wykazały, że w liniach komórkowych pochodzących z różnych tkanek krótszy mRNA *CCND2* podwyższa ekspresję białka cykliny D2⁵⁰.

Cykliny typu D są białkami wysoce homologicznymi i istnieje wiele dowodów na to, że różne cykliny D mogą spełniać zamiennie część swych funkcji. Podczas rozwoju myszy, trzy cykliny typu D ulegają ekspresji zgodnie z często wzajemnie wykluczającym się wzorem, a ich funkcja może być swoista dla danej tkanki. Zgodnie z tą obserwacją, jednoczesna nadekspresja *CCND1* i *CCND2* w szpiczaku mnogim jest zjawiskiem rzadkim ⁸. Ponieważ długość 3'UTR można uznać za mechanizm regulacji ekspresji genów, zbadaliśmy, czy może ona być zaangażowana w potencjalną wzajemną regulację między cykliną D1 i D2. Chociaż mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska są jak dotąd nieznane, moje wyniki przedstawiające skrócenie mRNA *CCND2* po wyciszeniu *CCND1* sugerują, że cyklina D1 może obniżyć poziom ekspresji *CCND2* przez modyfikację reakcji poliadenylacji/cięcia. Ponadto, zwiększony udział długiej izoformy *CCND2* po nadekspresji cykliny D1 lub cykliny D3, wraz z równoczesnym obniżeniem poziomu białka cykliny D2 w komórkach MM dodatkowo potwierdza znaczenie tego mechanizmu w regulacji ekspresji cykliny D2. (Ryc. 8)



Ryc. 8. Poziom białka cykliny D2 jest kontrolowany przez cyklinę D1 i D3. Poziom białka cykliny D2 72 godziny po transfekcji siRNA *CCND1* w linii komórkowej U266 określone metodą Western blot (A). Proporcja między krótkim i długim 3'UTR *CCND2* po wyciszeniu *CCND1* (B). Doświadczenia Western blot przeprowadzono w dwóch powtórzeniach, a doświadczenia PCR powtórzono co najmniej trzy razy. Poziom białka cykliny D 48 godzin po transfekcji wskazanym plazmidem, określony metodą Western blot w linii komórkowej JJN3 (C). Proporcja między krótkim i długim 3'UTR *CCND2* po nadekspresji *CCND1* lub *CCND3* w linii komórkowej JJN3 (D).

Przyczyny wzajemnego wykluczania cyklin D podczas rozwoju i w dojrzałych, zróżnicowanych tkankach nie zostały jak dotąd ustalone. Badania prowadzone na modelach myszy wskazują na istnienie sprzężenia zwrotnego ujemnego, gdzie dominująca cyklina typu D tłumi ekspresję pozostałych cyklin D. Wykazano, że mechanizm molekularny prowadzący do represji cykliny D działa inaczej w różnych tkankach, w niektórych z nich poprzez modyfikację poziomu mRNA, a w innych prawdopodobnie przez mechanizmy potranskrypcyjne⁵⁷. Przedstawione przeze mnie wyniki wskazują po raz pierwszy na istnienie potencjalnego mechanizmu, który może indukować obniżenie poziomu ekspresji *CCND2* w komórkach szpiczaka mnogiego z nadekspresją *CCND1* i *CCND3*.

Ekspresja *CCND2* jest niewykrywalna w komórkach szpiczaka z t(11;14). Stąd też, postanowiono sprawdzić hipotezę, czy metylacja DNA może odgrywać rolę w zniesieniu ekspresji *CCND2*. Kilka wcześniejszych badań w nowotworach sutka, gruczołu krokowego, płuc i w raku wątrobowokomórkowym wykazało, że metylacja *CCND2* jest odpowiedzialna za brak mRNA i białka cykliny D2 w tych komórkach^{58–61}.

Wyniki naszych badań wskazują, że wyspa CpG położona proksymalnie względem *CCND2* miejsca rozpoczęcia transkrypcji TSS (ang. *transcription start site*) była wysoce zmetylowana jedynie w liniach komórek szpiczaka mnogiego z t(11;14).

Podsumowując, praca ta pokazuje, że modyfikacje potranskrypcyjne odgrywają rolę w regulacji ekspresji *CCND2* w komórkach szpiczaka plazmocytozy. Obniżenie poziomu ekspresji poszczególnych miRNA, których bezpośrednim celem molekularnym jest *CCND2* przyczynia się do nadekspresji *CCND2* w pewnych podgrupach szpiczaka mnogiego. Ponadto skrócenie 3'UTR *CCND2* przez mechanizm alternatywnej poliadenylacji wiąże się z utratą miejsc wiązania miRNA, co również przyczynia się do podwyższenia ekspresji *CCND2*. Mechanizm ten wydaje się odgrywać decydującą rolę w sieci regulacyjnej między *CCND1* i *CCND2* w szpiczaku.

Obróbka mRNA może być celem terapeutycznym w szpiczaku

Badania przedkliniczne inhibitora spliceosomu opisano w:

Rojas EA, Corchete LA, San-Segundo L, Martínez-Blanch JF, Codoñer FM, Páino T, Puig N, García-Sanz R, Mateos MV, Ocio EM, **Misiewicz-Krzeminska I***, Gutiérrez NC* (equal contribution). *Amiloride, An Old Diuretic Drug, Is a Potential Therapeutic Agent for Multiple Myeloma. Clinical Cancer Research* 2017 Nov 1;23(21):6602-6615.

Włączenie nowych leków o różnych mechanizmach działania radykalnie zmieniło perspektywę leczenia, i doprowadziło do wydłużenia ogólnego czasu przeżycia pacjentów ze szpiczakiem. Mimo to, szpiczak plazmocytozy pozostaje chorobą nieuleczalną⁶². W ostatnich latach podjęto wiele starań mających na celu opracowania nowych substancji skierowanych przeciwko szpiczakowi mnogiemu, do tego stopnia, że niedawno zatwierdzono do stosowania szeroką gamę nowych leków o różnych mechanizmach działania. Obejmują one między innymi nowe przeciwciała typu monoklonalnego (mAb), inhibitory proteasomu, leki immunomodulujące i inhibitory deacetylazy histonowej.⁶³ Jednakże zatwierdzenie każdego z nich wymaga kilku lat prowadzenia badań i dużych inwestycji. Interesującą alternatywą, dzięki której ten długi proces może zostać skrócony, jest podejście polegające na repozycjonowaniu leków, które obejmuje stosowanie starych leków zatwierdzonych do leczenia chorób nienowotworowych⁶⁴. Jedną z zalet tej strategii jest to, że właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne oraz profile toksyczności są dobrze znane. Lek moczopędny, amiloryd, jest jednym z takich środków. Amiloryd jest lekiem moczopędnym oszczędzającym potas, stosowanym klinicznie od ponad trzydziestu lat w leczeniu hipokaliemii, nadciśnienia, obrzęków i zastoinowej niewydolności serca⁶⁵. Niektóre badania wykazały jego istotne działania przeciwnowotworowe i przeciwprzerzutowe, które były początkowo powiązane z hamowaniem wymienników Na⁺/H⁺⁶⁶. Ostatnio stwierdzono, że amiloryd modyfikuje alternatywny splicing (ang. *alternative splicing*; AS) w wielu typach ludzkich komórek nowotworowych⁶⁷. Dlatego też zdecydowaliśmy się użyć tego leku jako potencjalnego modyfikatora szlaku spliceosomów w komórkach szpiczaka i ocenić jego działanie na te komórki.

Splicing RNA, dzięki któremu niekodujące sekwencje (introny) są eliminowane z pierwotnego transkryptu (pre-mRNA), jest jednym z najważniejszych mechanizmów potranskrypcyjnych. Proces ten jest prowadzony przez jeden z najbardziej złożonych mechanizmów komórkowych o nazwie spliceosom. Składa się on z 5 małych jądrowych rybonukleoprotein (U1, U2, U4, U5 i U6), które są kompleksami małych jądrowych RNA

związanych z około 20 białkami. Na spliceosom składa się rdzeń o aktywności katalitycznej i ponad 200 białek, które obejmują między innymi kinazy, fosfatazy i helikazy. Większość ludzkich genów (szacunkowo ponad 80%) może generować wiele transkryptów za pośrednictwem procesu znanego jako alternatywny splicing.^{68,69} Jedną z konsekwencji obróbki tego typu jest wytwarzanie białek o przeciwnych funkcjach, zjawisko dobrze zilustrowane przez fakt, że wiele genów kodujących białka zaangażowane w szlaki apoptotyczne jest w stanie wygenerować izoformy pro- i antyapoptotyczne dzięki alternatywnemu splicingowi.

Wykazaliśmy, że amiloryd działa silnie przeciw szpiczakowi poprzez dwa nowe mechanizmy działania, deregulację spliceosomu i aktywację szlaku sygnałowego p53.

Na pierwszym etapie badań, obserwowano silną aktywność amilorydu przeciw szpiczakowi *in vitro*, zarówno w komórkach *TP53* typu dzikiego (*wt*), jak i w komórkach ze zmutowanym *TP53*. Również w przypadku komórek nie wykazujących ekspresji p53, tzw. *p53-null*, żywotność spadła dzięki zastosowaniu wyższych dawek i dłuższych czasów ekspozycji na amiloryd. Apoptoza indukowana przez amiloryd była regulowana zarówno przez mechanizmy zależne jak i niezależne od kaspaz, co jest zgodne z wynikami innych badań, z użyciem komórek glejaka i guzów sutka^{70,71}. Badanie *ex vivo* komórek szpiczaka pobranych od pacjentów wykazało, że amiloryd wywoływał cytotoksyczność w plazmocytach, w tym w trzech przypadkach z delecją 17p. Żywotność innych populacji komórek szpiku kostnego nie uległa zmianie pod wpływem amilorydu. Ponadto amiloryd w połączeniu z deksametazonem i melfalanem działał wyraźnie synergicznie w warunkach *in vitro*. Efekt synergiczny obserwowano również, gdy amiloryd był łączony z lenalidomidem lub pomalidomidem z deksametazonem. Nie stwierdzono jednak synergii między amilorydem a bortezomibem, co mogłoby ograniczyć stosowanie amilorydu w schematach indukcji opartych na bortezomibie.

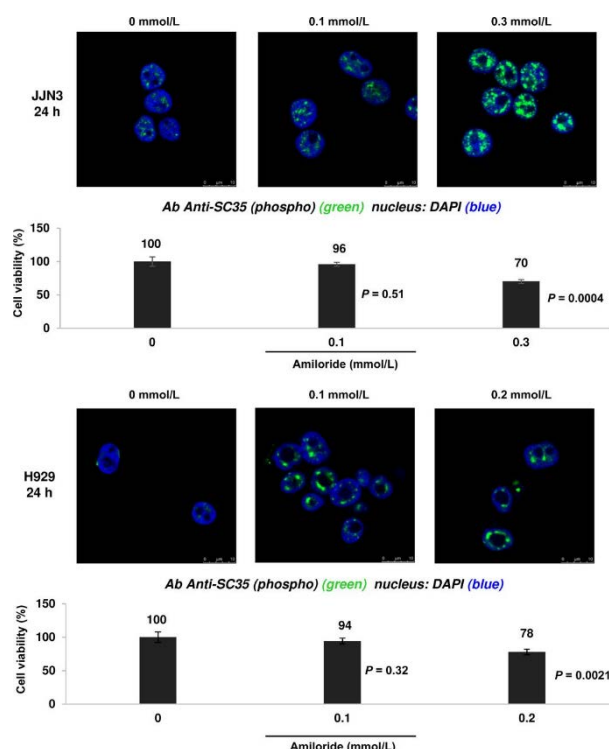
Ponadto, u myszy z ludzkimi podskórnymi plazmacytomami, leczonych podwójnymi lub potrójnymi kombinacjami, w tym amilorydem, obserwowano wydłużony czas przeżycia w porównaniu z leczeniem melfalanem i/lub deksametazonem.

Działanie przeciwnowotworowe amilorydu opisano wcześniej w kilku nowotworach, stosując modele *in vitro* i *in vivo*^{67,71-73}. Istnieją dowody na obecność wielu mechanizmów działania amilorydu, w tym indukowaną przez TRAIL cytotoksyczność związaną ze szlakiem PI3K-Akt i opartą na alternatywnym splicingu deregulację genów apoptotycznych. Z tego względu zdecydowaliśmy się na zastosowanie nowej strategii profilowania ekspresji genów, opartej na RNA-Seq, która pozwoliła na bardziej rozbudowane zbadanie mechanizmu działania tego leku w komórkach szpiczaka. W rzeczywistości analiza RNA-Seq w dwóch liniach komórkowych, których profil odpowiedzi na lek był inny, najbardziej i najmniej wrażliwą, ujawniła, że amiloryd w sposób istotny zmienił poziom ekspresji izoform transkryptów i liczbę zdarzeń alternatywnego splicingu. Należy podkreślić istotny wpływ amilorydu na różnicową ekspresję izoform dla genów, których całkowita ekspresja genu nie uległa zmianie. Innymi słowy, tradycyjne profilowanie ekspresji genów przeoczyłoby istotne modyfikacje ponad 10000 izoform transkryptów, wywołaną przez traktowanie amilorydem. Wyniki te są zgodne z doniesieniami o korzyściach jakie niesie analiza na

poziomie izoform całego genomu w porównaniu z analizą jedynie ekspresji genów w badaniach nad nowotworami ⁷⁴.

Wśród grupy genów, wykazujących najbardziej istotne wzbogacenie podczas analizy izoform podlegających różnicowej ekspresji po traktowaniu amilorydem był spliceosom.

Amiloryd wywołuje ogólną deregulację czynników splicingowych, zarówno na poziomie ekspresji ich genów jak i modyfikacji izoform transkryptów. Zmiany te wpływają na czynniki biorące udział we wczesnych i późnych etapach składania spliceosomu, również z uwzględnieniem etapów katalitycznych splicingu. Dotyczą też białek powiązanych ze spliceosomem. Jednocześnie obserwowano modyfikację znacznej ilości innych izoform transkryptów. Stąd, zbadano wpływ amilorydu na mechanizm splicingu pre-mRNA. Małe jądrowe rybonukleoproteiny (snRNP) i czynniki splicingowe, takie jak rodzina białek SR, są zorganizowane w plamki jądrowe ⁷⁵. Zmiany w wybarwieniu białka SC35 w obrębie plamek jądrowych są wykorzystywane jako znacznik zakłócenia działania maszynerii do splicingu. Po zahamowaniu maszynerii do splicingu liczba plamek jądrowych maleje, ale te pozostałe zwiększają rozmiar i intensywność. Przy użyciu tego markera, zidentyfikowano podobny wzór modyfikacji plamki jądrowej po potraktowaniu amilorydem który jednocześnie był związany z hamowaniem żywotności komórek (Ryc. 9). Obserwacja ta wskazuje, że amiloryd wywołuje zakłócenie działania maszynerii do splicingu, a to z kolei może powodować cytotoksyczność.



Ryc. 9. Amiloryd wpływa na maszynerię do splicingu pre-mRNA w komórkach szpiczaka w warunkach *in vitro*, niezależnie od statusu *TP53*. Komórki H929 (*TP53 WT*) i JKN3 (*TP53 null*) traktowano wzrastającymi stężeniami amilorydu. Plamki jądrowe z wybarwieniem SC35 wykrywano metodą immunofluorescencji po 24 godzinach. Żywotność komórek analizowano za pomocą testów luminescencyjnych CellTiter-Glo i wyrażano jako średnią $\pm$ SD. Przedstawiono statystycznie istotne różnice między komórkami traktowanymi amilorydem i nietraktowanymi. Wartości *p* oceniono za pomocą dwustronnego testu t-Studenta.

Analiza RNA-Seq na poziomie izoform transkryptów zidentyfikowała również szlak p53 jako jedną z kategorii funkcjonalnych ulegających najbardziej istotnemu wzbogaceniu. Co ciekawe, szlak p53 podlegał silnej nadekspresji jedynie w linii komórkowej, w której dochodzi do ekspresji zmutowanego *TP53*, a nie w linii komórkowej bez ekspresji p53, p53-null. Ponadto, obserwowano podwyższenie poziomu ekspresji genów regulowanych bezpośrednio przez p53 w komórkach *TP53WT* i zmutowanych, traktowanych amilorydem. Wyniki te, wraz z faktem, że hamowanie aktywności białka p53 zapobiega śmierci komórek indukowanej amilorydem, nawet w dwóch zmutowanych liniach komórkowych *TP53*, pokazują, że apoptoza indukowana amilorydem w komórkach szpiczaka zależy od aktywacji p53 i jest niezależna od statusu mutacji *TP53*. Dodatkowo, zmniejszenie żywotności komórek w linii komórek p53-null traktowanych amilorydem potwierdza tezę, że inne mechanizmy niezależne od p53, takie jak zakłócenie maszynierii spliceosomalnej, są zaangażowane w aktywność amilorydu.

Podsumowując, wyniki badań opisanych w tej pracy wskazują, że aktywność amilorydu przeciw szpiczakowi jest zależna od modulacji spliceosomu i jest powiązana ze szlakiem p53. Szlak sygnałowy p53 był aktywowany po ekspozycji na amiloryd, niezależnie od stanu mutacji *TP53*. Z drugiej strony, amiloryd był zdolny również do indukowania apoptozy w komórkach szpiczaka, które nie wykazywały ekspresji p53.

Poziom białka pozwala lepiej przewidywać przebieg choroby pacjentów ze szpiczakiem niż odpowiadające mu mRNA

Metoda ilościowego oznaczania ekspresji wielu białek w komórkach szpiczaka i analiza poziomu mRNA i białka z pojedynczej próbki klinicznej została opisana w:

Misiewicz-Krzeminska I, Corchete LA, Rojas EA, Martínez-López J, García-Sanz R, Oriol A, Bladé J, Lahuerta JJ, Miguel JS, Mateos MV, Gutiérrez NC. A novel nano-immunoassay method for quantification of proteins from CD138-purified myeloma cells: biological and clinical utility. *Haematologica* 2018 May;103(5):880-889

W ostatnich dziesięcioleciach badania biomedyczne zostały zdominowane przez genomikę. Niewątpliwie, szpiczak mnogi został kompleksowo przeanalizowany przy użyciu wysokoprzepustowych technologii genomowych. W szczególności, profilowanie ekspresji genów zapewniło klasyfikację molekularną szpiczaka, która jest szeroko stosowana w badaniach biologicznych. Pomimo ogromnych ilości istotnych informacji uzyskanych z tego rodzaju analiz, zaskakuje bardzo niska liczba biomarkerów, które zostały zweryfikowane i przyjęte do użycia w praktyce klinicznej w efekcie tych badań. Jednym z możliwych wyjaśnień może być udział mechanizmów potranskrypcyjnych w kontrolowaniu poziomu ekspresji białek, jak opisane wcześniej miRNA, APA lub splicing alternatywny.

Postęp technologiczny, który zrewolucjonizował genomikę nowotworów, a w szczególności szpiczaka plazmocytozy, nie dokonał się w równym stopniu w obszarze proteomiki, głównie z tego względu, że proteom nie jest tak statyczny jak genom i może się znacznie różnić między osobnikami, a nawet między komórkami⁷⁶. Ponadto, białka

podlegają wielu modyfikacjom potranslacyjnym, co oznacza, że zgodnie z szacunkami, całkowita liczba białek w komórkach ludzkich wynosi około jednego miliona. Znajomość ekspresji białek ma kluczowe znaczenie dla identyfikacji celów terapeutycznych w szpiczaku, jako że cele te są w przeważającej mierze białkami. Inhibitory proteasomu (PI), takie jak bortezomib, wiążą się bezpośrednio z podjednostkami komory katalitycznej proteasomu 20S, maszynarii, która jest nadaktywna w MM; leki immunomodulujące (IMiD), takie jak lenalidomid, wiążą się bezpośrednio z białkiem cereblon, co powoduje ubikwitynację i degradację czynników transkrypcyjnych niezbędnych dla komórki plazmatycznej. Poza tym, praktycznie wszyscy pacjenci ze szpiczakiem otrzymują deksametazon lub prednizon, które wiążą się z jądrowym receptorem glukokortykoidowym (ang. *glucocorticoid receptor*; GR). Dlatego też, jako że białka są cząsteczkami, dzięki którym większość nowych leków osiąga swoją skuteczność, niezbędna jest wiedza o ekspresji tych białkowych celów terapeutycznych. Ponieważ badanie proteomu jest technicznie skomplikowane, oznaczenie ilościowe informacyjnego RNA (mRNA) stało się pośrednią miarą ekspresji białka. Wiele badań wykazało, że poziom mRNA i białka nie zawsze jest skorelowany, stąd ekspresja mRNA nie może być stosowana jako zamiennik ilości białka. Jednakże to białka ostatecznie określają fenotyp komórki.⁷⁷ Deregulacja kluczowych genów w patogenezie i prognozowaniu przebiegu szpiczaka została opisana na podstawie badań genomicznych, które opierają się głównie na określeniu ilościowym mRNA. Brak jest badań, które określają ilościowo poziom białek, a tym samym poziom korelacji między ekspresją białka a poziomem mRNA. Oznacza to, że dysponujemy bardzo fragmentarycznymi informacjami na temat wpływu tych białek na patogenezę i prognozowanie przebiegu szpiczaka.

Szpiczak plazmocytowy jest nowotworem naciekającym szpik kostny, dla którego dostępna jest stosunkowo niewielka ilość próbki po procedurze diagnostycznej. Obejmuje ona ocenę morfologiczną, charakterystykę immunofenotypową za pomocą cytometrii przepływowej i rozdział komórek plazmatycznych przy udziale przeciwciała anty-CD138 (CD138+) do rutynowej analizy fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Próbkę komórek szpiczaka po rozdziale (CD138+) są zazwyczaj przechowywane w buforach, takich jak TRIZOL lub RLT Plus, które służą do izolacji kwasów nukleinowych, do późniejszego ich wykorzystania w badaniach genomowych. Chociaż wyodrębnienie białek z tych buforów jest technicznie możliwe, ilość białka nie byłaby wystarczająca do przeprowadzenia wielu analiz metodą typu WB (ang. *Western blot*). W klasycznej analizie WB ilość oczyszczonych komórek plazmatycznych, nawet gdyby wszystkie z nich były dostępne do badań białkowych, umożliwiłaby ocenę co najwyżej sześciu białek, przy czym mediana ilości próbki byłaby wystarczająca do analizy dwóch białek.

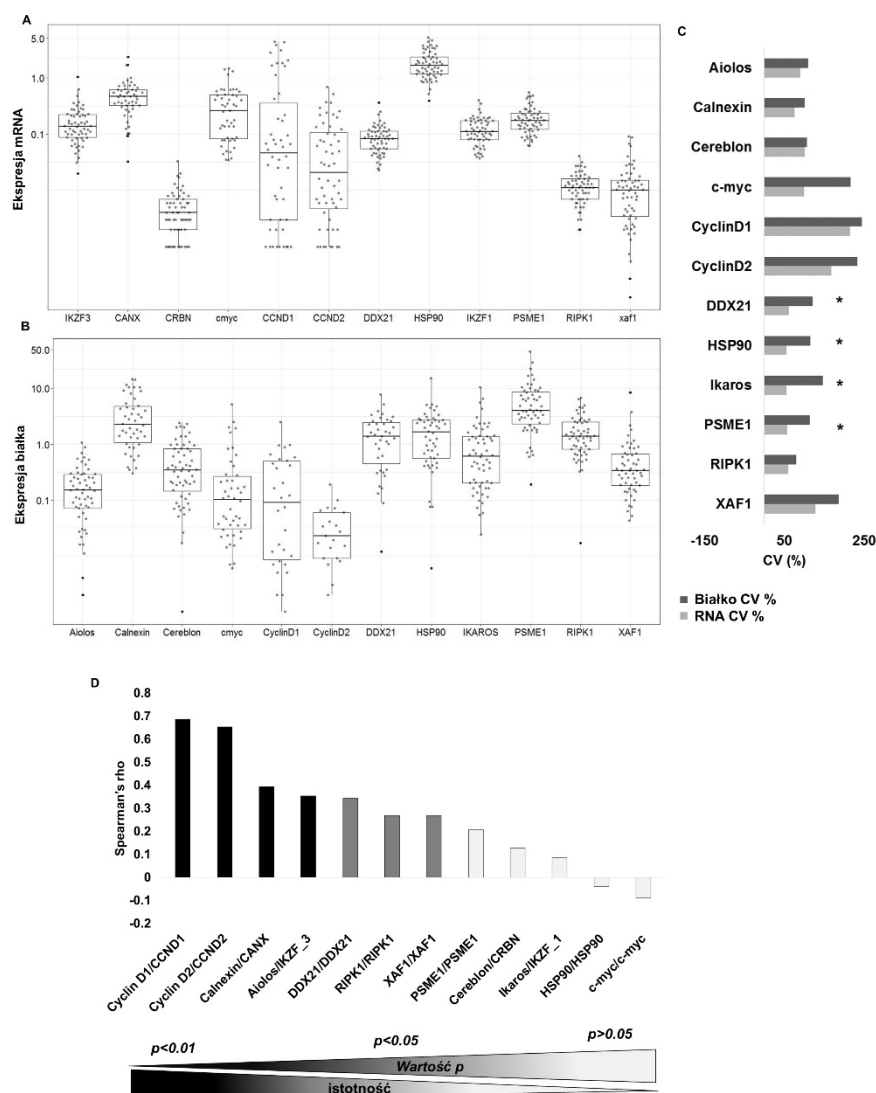
Postanowiłam zmierzyć się z tymi trudnościami technicznymi i przedstawiłam po raz pierwszy metodę ilościowego określania ekspresji wielu białek z komórek szpiczaka przechowywanych w buforze powszechnie stosowanym do konserwacji i izolacji kwasów nukleinowych. Przedstawiłam protokół ekstrakcji białek z komórek szpiczaka przechowywanych w buforze RLT Plus, w oparciu o dobrze znaną procedurę strącania acetonem. W procedurze dodano NaCl do próbki przed strącaniem, biorąc pod uwagę fakt, że większa zawartość soli nieorganicznych poprawia wydajność izolacji białka. Po

przetestowaniu kilku rodzajów soli i stężeń wybrano te wykazujące najlepsze wydajności. Dokonano poza tym oceny kilku metod rozpuszczania osadu białkowego, wybierając ostatecznie bufor 0,2 M NaOH i 4x WB, biorąc pod uwagę to, że niewielkie zmiany pH środowiska zmieniają rozpuszczalność białka.

Wykorzystano do analizy opracowaną niedawno metodę opartą na połączeniu nanoelektroforezy kapilarnej z testem immunologicznym (ang. *capillary nano-electrophoresis with immunoassay*; CNIA). Technika ta znana jest również jako „Simple Western”, wymaga jedynie bardzo małych ilości próbki do przeprowadzenia pomiaru ekspresji białka.⁷⁸ W przeciwieństwie do klasycznej analizy WB, która dostarcza jedynie wyniki półilościowe (oparte na blotach), CNIA określa obszar pod krzywą sygnału w każdej kapilarze, umożliwiając obliczenie ekspresji danego białka względem białka kontrolnego. Jak pokazują uzyskane przeze mnie wyniki, ten postęp techniczny umożliwia analizę ekspresji 50-100 białek w pojedynczej próbce szpiczaka. W opisywanej pracy przedstawiono wyniki pilotażowego badania wykorzystującego omawianą platformę do oceny ekspresji białek u pacjentów ze szpiczakiem. Głównym celem było ilościowe i dokładne oznaczenie białek wyekstrahowanych z próbek szpiczaka, rozdzielonych przeciwciałem anti-CD138 i zamrożonych w buforze RLT Plus. Metoda ta jest powszechnie stosowana jako metoda konserwacji RNA i DNA.

Aby ustalić, czy metoda CNIA jest odpowiednia do oceny ekspresji wielu białek przy użyciu różnych przeciwciał, przetestowano wydajność testu dla każdego białka w systemie WESTM. Gdy wykazano, że test określa dokładnie ilości białek wyekstrahowanych z buforu RLT Plus w tym samym czasie co DNA i RNA, zbadano przydatność metody do analizy ekspresji kluczowych białek w biologii MM, takich jak cykliny D, cmyc, cereblon, ikaros i aiolos. Innym celem tego badania było porównanie ekspresji białka z poziomem odpowiadającego mu mRNA.

Badaniami objęto 63 próbki od pacjentów z nowo rozpoznanym szpiczakiem w okresie od października 2013 r. do listopada 2015 r.; 43 pacjentów zostało włączonych do dwóch badań klinicznych hiszpańskiej grupy szpiczaka mnogiego (ang. *Spanish Myeloma Group*): GEM2010 [bortezomib/melfalan/prednizon i lenalidomid/deksametazon podawane w sekwencyjny lub naprzemienny sposób; (n = 24)] i BenVelPres [bendamustyna/bortezomib/prednizon; (n = 19)]. Pozostałych 20 pacjentów nie było leczonych w ramach badania klinicznego.



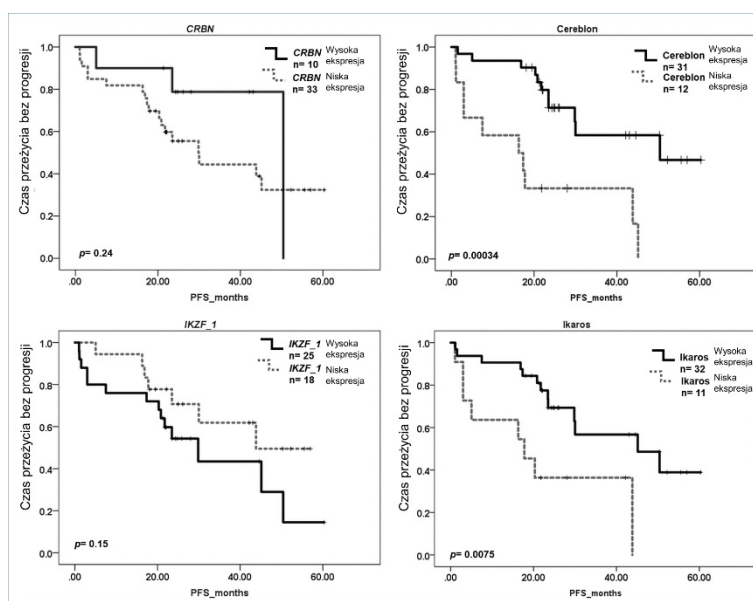
Ryc. 10. Dwa stopnie analizy każdego genu, mRNA i białko. Ekspresję mRNA każdego genu oceniano metodą qRT-PCR i normalizowano względem *GAPDH* i wyrażano jako $2^{-\Delta Ct}$ (A). Poziom każdego białka oceniano za pomocą CNIA i normalizowano względem poziomu białka *GAPDH* w każdym przypadku (B). Oś Y wykresów (A) i (B) jest wyrażona w skali logarytmicznej. Zmienność każdego pomiaru mRNA i białka w analizowanej populacji pacjentów z MM, mierzona jako procentowy współczynnik zmienności (CV%). Próg istotności statystycznej (* $p < 0,05$) (C). Współczynnik korelacji Spearmana dla każdej pary mRNA/białko uszeregowanej poprzez zwiększenie wartości p (D).

Wykazano umiarkowaną lub niską korelację między poziomami ekspresji mRNA i białka, co jest zgodne z ogólną obserwacją, że ~ 60% zmienności poziomu białka nie może zostać wyjaśnione przez pomiar samego mRNA. (Ryc. 10) Zaobserwowano również, że poziom ekspresji mRNA był mniej zmienny niż ekspresja białka wśród pacjentów ze szpiczakiem, dla wszystkich analizowanych par mRNA i białka.

Odtworzono dobrze znany wzorzec ekspresji *CCND1*/cykliny D1 i *CCND2*/cykliny D2 w komórkach szpiczaka z odpowiednio t(11;14) i t(4;14). Ponadto, stwierdzono korelację między poziomami c-myc i ikaros oraz aiolos, analizując zarówno ekspresję mRNA lub białka. Jest to zgodne z wcześniej wykazaną regulacją c-myc przez ikaros i aiolos w komórkach szpiczaka. Co ciekawe, korelacja między poziomami ikaros i aiolos była silniejsza w przypadku białka niż w odniesieniu do mRNA. Według mojej

wiedzy jest to pierwszy raz, gdy poziomy białka c-myc, ikaros i aiolos zostały oznaczone ilościowo, a związek między ich ekspresją został przeanalizowany w komórkach szpiczaka.

Spośród białek uwzględnionych w tym badaniu zaobserwowano istotny związek między poziomem ekspresji białka a czasem przeżycia wolnym od progresji w przypadku białek cereblon i ikaros, podczas gdy nie stwierdzono istnienia tego związku w odniesieniu do poziomów odpowiadających im mRNA. Nie wykazano istnienia korelacji między poziomem ekspresji białka cereblon a poziomem mRNA. Stwierdzono też, że wysokie poziomy białka cereblon były związane z dobrym rokowaniem w szpiczaku. (Ryc. 11) Wyniki te są zgodne z wynikami poprzednich badań i wspierają stosowanie testów oceny ekspresji białka do oceny poziomu cereblon.⁷⁹



Ryc. 11. Czas przeżycia bez progresji (PFS) w zależności od poziomu ekspresji mRNA i białka. Przeżycie wolne od progresji u pacjentów z niskim i wysokim poziomem ekspresji mRNA (A) i białka (B). Test logarytmiczny rang przeprowadzono dla każdego genu i białka, a krzywe Kaplana-Meiera przedstawiają PFS pacjentów ze szpiczakiem w zależności od poziomu mRNA i białka. Oprogramowanie Cutoff Finder (<http://molpath.charite.de/cutoff>) użyto do uzyskania optymalnego punktu odcięcia. Optymalny punkt odcięcia zdefiniowano jako generujący najbardziej istotny podział, który rozróżnia pomiędzy dobrym i złym przeżyciem, badając wszystkie możliwe wartości graniczne za pomocą testu logarytmicznego rang.

Kilka niezależnych grup badawczych zidentyfikowało ikaros i aiolos jako cele molekularne dla białka cereblon, po jego aktywacji z zastosowaniem leków immunomodulujących.^{80,81} Rola poziomu ekspresji ocenionej ikaros w przeżyciu pacjentów ze szpiczakiem jest kontrowersyjna i jak dotąd została zbadana na poziomie mRNA w przypadkach nowo zdiagnozowanych pacjentów. W naszym badaniu, wysoki poziom białka ikaros był związany z dłuższym czasem przeżycia wolnym od progresji, podczas gdy nie stwierdzono istotnego wpływu na rokowanie gdy czas przeżycia wolny od progresji oszacowano na poziomie mRNA. Wyniki te są zgodne z dłuższym czasem przeżycia wykazywanym przez pacjentów z nawrotowym/opornym na leczenie szpiczakiem leczonych lenalidomidem, którzy wykazywali ekspresję wysokich

poziomów białka IKZF1/3, co oceniono za pomocą barwienia immunohistochemicznego.⁸²

Podsumowując, ilość białka jest regulowana przez szereg złożonych mechanizmów, takich jak modyfikacje potranskrypcyjne i potranslacyjne oraz regulacja rozkładu białka. Poprzez pomiar poziomu mRNA analizowane są jedynie wczesne etapy w długim łańcuchu zdarzeń regulacyjnych. Mimo to, poziom mRNA jest nadal często wykorzystywany jako zastępczy wskaźnik ilości białka, głównie z powodu braku odpowiedniej technologii do szybkiego i skutecznego określania ilości białek.

W pracy przedstawiono wdrożenie nowej techniki opartej na nano-kapilarnym teście immunologicznym do ilościowego oznaczania ekspresji białka w warunkach klinicznych w próbkach szpiczaka. Stosunkowo niewielkie ilości materiału niezbędne do tych oznaczeń pozwalają przeanalizować po raz pierwszy poziom ponad 20 białek przy użyciu tej samej zamrożonej próbki, która będzie mogła być użyta w analizie DNA i RNA.

Wnioski z przedstawionego osiągnięcia naukowego:

Cząsteczki RNA poddawane są bardzo intensywnemu procesowi obróbki i podlegają szerokiemu zakresowi modyfikacji potranskrypcyjnych, co generuje różnorodność w ekspresji poszczególnych genów.

1. W porównaniu z normalnymi komórkami plazmatycznymi, w komórkach szpiczaka plazmocytozowego większość miRNA wykazuje obniżenie ekspresji. Profil ekspresji miRNA w szpiczaku jest związany z nieprawidłowościami genetycznymi, przy czym ekspresja *miR-375* i *miR-214* jest obniżona we wszystkich podgrupach cytogenetycznych szpiczaka.
2. Analiza korelacji profilów ekspresji miRNA i ich prawdopodobnych genów docelowych wykazuje że zmiany w ekspresji genów kodujących białka istotne w patogenezie szpiczaka, jak na przykład *CCND2*, są związane ze zmianami w poziomie określonych miRNA.
3. Poziom ekspresji *Dicer* jest podwyższony u pacjentów z przednowotworowym stanem gammopatii monoklonalnej o niezidentyfikowanym znaczeniu w porównaniu z tłącym i objawowym szpiczakiem. Co więcej, u pacjentów z objawowym szpiczakiem czas przeżycia wolny od progresji jest dłuższy w przypadku wysokiego poziomu ekspresji *Dicer*.
4. Niski poziom ekspresji *miR-214* w komórkach szpiczaka przyczynia się do niekontrolowanego wzrostu tych komórek. Przywrócenie ekspresji *miR-214* w komórkach szpiczaka indukuje apoptozę i hamuje proliferację poprzez ingerencję w szlaki sygnałowe p53/MDM2 i replikacji DNA.
5. Modyfikacje potranskrypcyjne odgrywają rolę w regulacji ekspresji *CCND2* w komórkach szpiczaka. Obniżenie poziomu ekspresji poszczególnych miRNA, których bezpośrednim genem docelowym jest *CCND2*, przyczynia się do nadekspresji *CCND2* w pewnych podgrupach szpiczaka mnogiego. Ponadto skrócenie 3'UTR *CCND2* przez mechanizm alternatywnej poliadenylacji wiąże

się z utratą miejsc wiązania miRNA, co również przyczynia się do podwyższenia ekspresji *CCND2*. Mechanizm ten wydaje się odgrywać decydującą rolę w sieci regulacyjnej między *CCND1* i *CCND2* w szpiczaku.

6. Amiloryd wykazuje silną aktywność przeciw szpiczakowi poprzez dwa nowe mechanizmy działania, deregulację spliceosomu i aktywację szlaku sygnałowego p53. Amiloryd wywołuje ogólną deregulację czynników splicingowych, zarówno na poziomie ekspresji ich genów jak i modyfikacji izoform transkryptów. Zmiany te wpływają na czynniki biorące udział we wczesnych i późnych etapach składania spliceosomu, również z uwzględnieniem etapów katalitycznych splicingu. Dotyczą też białek powiązanych ze spliceosomem.
7. Opracowanie protokołu ekstrakcji białka z próbek szpiczaka przechowywanych w buforach służących do izolacji kwasów nukleinowych pozwoliło na wdrożenie w warunkach klinicznych nowej techniki do ilościowego oznaczania ekspresji białka w próbkach szpiczaka. Technika ta opiera się na kapilarnym nano-oznaczeniu immunologicznym.
8. Korelacja między poziomami mRNA i białka dla genów kluczowych w biologii szpiczaka jest umiarkowana lub niska. Wskazuje to, że potranskrypcyjne modyfikacje mRNA wpływają na poziom ekspresji białka.
9. Poziom białka pozwala lepiej niż ekspresja mRNA przewidywać przebieg choroby pacjentów ze szpiczakiem leczonych lekami immunomodulującymi i inhibitorami proteasomu.

Spis piśmiennictwa:

1. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc* 2016;91(1):101–119.
2. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009;113(22):5412–5417.
3. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009;113(22):5418–5422.
4. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998;91(1):3–21.
5. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2009;27(27):4585–4590.
6. Fonseca R, Harrington D, Oken MM, et al. Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (delta13) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study. *Cancer Res* 2002;62(3):715–720.
7. Gutiérrez NC, Castellanos MV, Martín ML, et al. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* 2007;21(1):143–150.
8. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005;106(1):296–303.
9. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014;42(Database issue):D68–73.

10. Ambros V. MicroRNAs and developmental timing. *Curr Opin Genet Dev* 2011;21(4):511–517.
11. Ambros V, Chen X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development* 2007;134(9):1635–1641.
12. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431(7006):350–355.
13. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 2018;173(1):20–51.
14. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–297.
15. Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* 2005;11(3):241–247.
16. Schanen BC, Li X. Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. *Genomics* 2011;97(1):1–6.
17. Song Gao J, Zhang Y, Li M, et al. Atypical transcription of microRNA gene fragments. *Nucleic Acids Res* 2010;38(9):2775–2787.
18. Saunders MA, Liang H, Li W-H. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(9):3300–3305.
19. Chen K, Rajewsky N. Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nat Genet* 2006;38(12):1452–1456.
20. Lionetti M, Biasiolo M, Agnelli L, et al. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma. *Blood* 2009;114(25):e20–26.
21. Gutiérrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, et al. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia* 2010;24(3):629–637.
22. Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood* 2009;113(26):6669–6680.
23. Koch A, Joosten SC, Feng Z, et al. Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15(7):459–466.
24. Pichiorri F, Suh S-S, Ladetto M, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(35):12885–12890.
25. Chen L, Li C, Zhang R, et al. miR-17-92 cluster microRNAs confers tumorigenicity in multiple myeloma. *Cancer Lett* 2011;309(1):62–70.
26. Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* 2007;110(4):1330–1333.
27. Pichiorri F, Suh S-S, Rocci A, et al. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell* 2010;18(4):367–381.
28. Feng Z, Zhang C, Wu R, Hu W. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J Mol Cell Biol* 2011;3(1):44–50.
29. Liu J, Zhang C, Zhao Y, Feng Z. MicroRNA Control of p53. *J Cell Biochem* 2017;118(1):7–14.
30. Calin GA, Liu C-G, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(32):11755–11760.
31. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(39):13944–13949.
32. Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJM, Löwenberg B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111(10):5078–5085.
33. Li Z, Lu J, Sun M, et al. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(40):15535–15540.
34. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834–838.
35. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007;39(5):673–677.

36. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005;433(7027):769–773.
37. Misiewicz-Krzeminska I, Krzeminski P, Corchete LA, et al. Factors Regulating microRNA Expression and Function in Multiple Myeloma. *Noncoding RNA*;5(1):.
38. Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, et al. Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2007;67(5):2345–2350.
39. Merritt WM, Lin YG, Han LY, et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med* 2008;359(25):2641–2650.
40. Mateos M-V, Oriol A, Martínez-López J, et al. Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma: a randomised trial. *Lancet Oncol* 2010;11(10):934–941.
41. López-Corral L, Gutiérrez NC, Vidriales MB, et al. The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells. *Clin Cancer Res* 2011;17(7):1692–1700.
42. Penna E, Orso F, Cimino D, et al. microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. *EMBO J* 2011;30(10):1990–2007.
43. Derfoul A, Juan AH, Difilippantonio MJ, Palanisamy N, Ried T, Sartorelli V. Decreased microRNA-214 levels in breast cancer cells coincides with increased cell proliferation, invasion and accumulation of the Polycomb Ezh2 methyltransferase. *Carcinogenesis* 2011;32(11):1607–1614.
44. Qiang R, Wang F, Shi L-Y, et al. Plexin-B1 is a target of miR-214 in cervical cancer and promotes the growth and invasion of HeLa cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43(4):632–641.
45. Fischer L, Hummel M, Korfel A, Lenze D, Joehrens K, Thiel E. Differential micro-RNA expression in primary CNS and nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Neuro-oncology* 2011;13(10):1090–1098.
46. Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, et al. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53. *Cancer Cell* 2005;8(1):75–87.
47. Chesi M, Bergsagel PL. Many multiple myelomas: making more of the molecular mayhem. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011344–353.
48. Hurt EM, Wiestner A, Rosenwald A, et al. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* 2004;5(2):191–199.
49. Yang L, Wang H, Kornblau SM, et al. Evidence of a role for the novel zinc-finger transcription factor ZKSCAN3 in modulating Cyclin D2 expression in multiple myeloma. *Oncogene* 2011;30(11):1329–1340.
50. Mayr C, Bartel DP. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 2009;138(4):673–684.
51. Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* 2008;320(5883):1643–1647.
52. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003;3(2):185–197.
53. Slotta-Huspenina J, Koch I, Richter M, et al. Cyclin D1 positive multiple myeloma: predominance of the short, 3'UTR-deficient transcript is associated with high cyclin D1 mRNA levels in cases with t(11;14) translocation, but does not correlate with proliferation rate or genomic deletions. *Leuk Res* 2008;32(1):79–88.
54. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia* 2014;28(8):1705–1715.

55. Lianoglou S, Garg V, Yang JL, Leslie CS, Mayr C. Ubiquitously transcribed genes use alternative polyadenylation to achieve tissue-specific expression. *Genes Dev* 2013;27(21):2380–2396.
56. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012;12(5):335–348.
57. Ciemerych MA, Kenney AM, Sicinska E, et al. Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev* 2002;16(24):3277–3289.
58. Henrique R, Costa VL, Cerveira N, et al. Hypermethylation of Cyclin D2 is associated with loss of mRNA expression and tumor development in prostate cancer. *J Mol Med* 2006;84(11):911–918.
59. Evron E, Dooley WC, Umbricht CB, et al. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. *Lancet* 2001;357(9265):1335–1336.
60. Hawes SE, Stern JE, Feng Q, et al. DNA hypermethylation of tumors from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients is associated with gender and histologic type. *Lung Cancer* 2010;69(2):172–179.
61. Moribe T, Iizuka N, Miura T, et al. Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2009;125(2):388–397.
62. Kumar SK, Therneau TM, Gertz MA, et al. Clinical course of patients with relapsed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2004;79(7):867–874.
63. Rajan AM, Kumar S. New investigational drugs with single-agent activity in multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2016;6(7):e451.
64. Würth R, Thellung S, Bajetto A, Mazzanti M, Florio T, Barbieri F. Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. *Drug Discov Today* 2016;21(1):190–199.
65. Tang CM, Presser F, Morad M. Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science* 1988;240(4849):213–215.
66. Slepko ER, Rainey JK, Sykes BD, Fliegel L. Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem J* 2007;401(3):623–633.
67. Chang J-G, Yang D-M, Chang W-H, et al. Small molecule amiloride modulates oncogenic RNA alternative splicing to devitalize human cancer cells. *PLoS ONE* 2011;6(6):e18643.
68. Srebrow A, Kornblihtt AR. The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 13):2635–2641.
69. Ward AJ, Cooper TA. The pathobiology of splicing. *J Pathol* 2010;220(2):152–163.
70. Leon LJ, Pasupuleti N, Gorin F, Carraway KL. A cell-permeant amiloride derivative induces caspase-independent, AIF-mediated programmed necrotic death of breast cancer cells. *PLoS ONE* 2013;8(4):e63038.
71. Hegde M, Roscoe J, Cala P, Gorin F. Amiloride kills malignant glioma cells independent of its inhibition of the sodium-hydrogen exchanger. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310(1):67–74.
72. Sparks RL, Pool TB, Smith NK, Cameron IL. Effects of amiloride on tumor growth and intracellular element content of tumor cells in vivo. *Cancer Res* 1983;43(1):73–77.
73. Kim KM, Lee YJ. Amiloride augments TRAIL-induced apoptotic death by inhibiting phosphorylation of kinases and phosphatases associated with the P13K-Akt pathway. *Oncogene* 2005;24(3):355–366.
74. Zhang Z, Pal S, Bi Y, Tchou J, Davuluri RV. Isoform level expression profiles provide better cancer signatures than gene level expression profiles. *Genome Med* 2013;5(4):33.
75. Shepard PJ, Hertel KJ. The SR protein family. *Genome Biol* 2009;10(10):242.
76. Huber LA. Is proteomics heading in the wrong direction? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(1):74–80.
77. Lu P, Vogel C, Wang R, Yao X, Marcotte EM. Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nat Biotechnol* 2007;25(1):117–124.
78. Chen J-Q, Wakefield LM, Goldstein DJ. Capillary nano-immunoassays: advancing quantitative proteomics analysis, biomarker assessment, and molecular diagnostics. *J Transl Med* 2015;13182.

79. Gandhi AK, Mendy D, Waldman M, et al. Measuring cereblon as a biomarker of response or resistance to lenalidomide and pomalidomide requires use of standardized reagents and understanding of gene complexity. *Br J Haematol* 2014;164(2):233–244.
80. Krönke J, Udeshi ND, Narla A, et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* 2014;343(6168):301–305.
81. Lu G, Middleton RE, Sun H, et al. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science* 2014;343(6168):305–309.
82. Pourabdollah M, Bahmanyar M, Atenafu EG, Reece D, Hou J, Chang H. High IKZF1/3 protein expression is a favorable prognostic factor for survival of relapsed/refractory multiple myeloma patients treated with lenalidomide. *J Hematol Oncol* 2016;9(1):123.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

a) Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Badania naukowe rozpoczęłam w trakcie studiów magisterskich na Międzywydziałowym Studium Biotechnologii SGGW, jako magistrantka w Instytucie Leków, pod promotorstwem dr Janusza Skierskiego, w Pracowni Cytometrii Przepływowej. Badania zostały zakończone w czerwcu 2002r obroną pracy magisterskiej pt: *Ocena cytotoksyczności doksorubicyny i WP903 w komórkach nowotworowych opornych wielolekowo.*

Od sierpnia 2002 roku pracowałam w Pracowni Mikroskopii Konfokalnej Narodowego Instytutu Leków, gdzie zajmowałam się badaniem właściwości chemoprewencyjnych izotiocyjanianów. Wyniki pracy weszły w skład rozprawy doktorskiej prowadzonej przez Profesor Teresę Kasprzycką-Guttman, obronionej na wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w 09 czerwca 2006 roku. Tytuł pracy *“Chemoprewentywne właściwości związków z grupy izotiocyjanianów”*

Wyniki tych badań zostały opublikowane w serii 4 artykułów eksperymentalnych:

Irena Misiewicz; Katarzyna Skupinska; Teresa Kasprzycka Guttman. *Sulforaphane and 2-oxohexyl isothiocyanate induce cell growth arrest and apoptosis in L-1210 leukemia and ME-18 melanoma cells.* **Oncology Reports.** 10(6), 2045-2095, 2003

Irena Misiewicz; Katarzyna Skupińska; Elzbieta Kowalska; Jan Lubiński; Teresa Kasprzycka Guttman. *Sulforaphane-mediated induction of a phase 2 detoxifying enzyme NAD(P)H:quinone reductase and apoptosis in human lymphoblastoid cells.* **Acta biochimica Polonica.** 51 - 3, pp. 711 – 732, 2004

Irena Misiewicz; Agata Kozar; Katarzyna Skupinska; Elzbieta Kowalska; Jan Lubinski; Teresa Kasprzycka Guttman. *Inhibition of cell cycle and induction of apoptosis by sulforaphane in cell lines carrying various inherited BRCA1 mutations.* **Oncology reports.** 13 - 4, pp. 659 – 724, 2005

Irena Misiewicz; Agata Kozar; Katarzyna Skupinska; Elzbieta Kowalska; Jan Lubinski; Teresa Kasprzycka Guttman. *Inhibition of cell cycle and induction of apoptosis*

by 2-oxohexyl isothiocyanate and alyssin in cell lines carrying various inherited BRCA1 mutations. **Drug Development Research** 65(2):84-92, 2005

W tym czasie współpracowałam również z inną grupą badawczą nad projektem dotyczącym leków przeciwnowotworowych. Wyniki opublikowano w:

Beata M Gruber; Elzbieta L Anuszevska; Irena Bubko; Teresa Kasprzycka Guttman; **Irena Misiewicz**; Katarzyna Skupińska; Waldemar Priebe; Izabela Fokt. *Constitutive activation of transcription factor NFkappaB as a possible marker of sensitivity of neoplastic cells to anthracyclines*. **Acta poloniae pharmaceutica**. 62, 17 - 40, 2005

Brałam również udział we badaniach nad rakotwórczymi właściwościami wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, a wyniki zostały opublikowane w:

Katarzyna Skupińska; **Irena Misiewicz**; Teresa Kasprzycka Guttman. *Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms*. **Acta poloniae pharmaceutica**. 61 - 3, 233 – 273, 2004

Katarzyna Skupińska; Monika Zylm; **Irena Misiewicz**; Teresa Kasprzycka Guttman. *Interaction of anthracene and its oxidative derivatives with human serum albumin*. **Acta biochimica Polonica**. 53 - 1, pp. 101 – 113, 2006

b) Działalność naukowa i badawcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Od drugiej połowy 2006 roku pracowałam jako adiunkt w Zakładzie Biologii Komórki w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie, gdzie kontynuowałam badania nad właściwościami izotiocyanianów.

Wykazano różnice między właściwościami chemoprewencyjnymi a aktywnością indukującą śmierć na drodze apoptozy dla różnych izotiocyanianów. Istotne różnice w odpowiedzi na te związki zaobserwowano pomiędzy zdrowymi komórkami limfoblastycznymi i białaczkowymi. (*Misiewicz I, et al, Pharmacological Reports, 2007*) Podobnie, zaobserwowano oddziaływanie antagonistyczne po równoczesnej ekspozycji na 5-fluorouracyl i jeden z izotiocyanianów w normalnej, nierakowej linii komórkowej. W przypadku normalnych komórek antagonizm taki jest korzystnym oddziaływaniem. (*Milczarek M i wsp., Acta Poloniae Pharmaceutica, 2011*). Ponadto wykazano możliwość interakcji między alyssynem a lekami które modulują metabolizm komórkowy poprzez wpływ na fazy 2 i 3 metabolizmu. Wykryto istnienie interakcji, które mogą przyczyniać się do zmian w metabolizmie leków jako takich, a także do zmian w innych szlakach metabolicznych w komórkach. Wyniki te sugerują, że suplementy diety, do których może należeć alyssyn, należy stosować ostrożnie, gdy podawane są inne leki. (*Lubelska i wsp., Molecular and cell biochemistry, 2012*).

Irena Misiewicz; Katarzyna Skupinska; Teresa Kasprzycka Guttman. *Differential response of human healthy lymphoblastoid and CCRF-SB leukemia cells to sulforaphane and its two analogues: 2-oxohexyl isothiocyanate and alyssin*. Pharmacological reports: PR. 59 - 1, pp. 80 – 87, 2007

Małgorzata Milczarek; **Irena Misiewicz Krzemińska**; Katarzyna Lubelska; Katarzyna Wiktorska. *Combination treatment with 5-fluorouracil and isothio-cyanates shows an antagonistic effect in Chinese hamster fibroblast cells line-V79*. Acta poloniae pharmaceutica. 68 - 3, pp. 331 – 373, 2011

Katarzyna Lubelska; **Irena Misiewicz Krzemińska**; Małgorzata Milczarek; Jolanta Krzysztoń Russjan; Elżbieta Anuszevska; Karolina Modzelewska; Katarzyna Wiktorska. *Isothiocyanate-drug interactions in the human adenocarcinoma cell line Caco-2*. Molecular and cellular biochemistry. 367 - 1-2, pp. 19 – 48, 2012

Ponadto brałam udział w badaniu właściwości izotiocyanianów jako inhibitorów metabolizmu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Opisano, że izotiocyaniany blokują aktywność enzymów CYP1A1 i CYP1A2, bezpośrednio lub pośrednio, w komórkach raka piersi i raka sutka.

Katarzyna Skupinska; **Irena Misiewicz**; Teresa Kasprzycka Guttman. *A comparison of the concentration-effect relationships of PAHs on CYP1A induction in HepG2 and Mcf7 cells*. Archives of toxicology. 81 - 3, pp. 183 – 383, 2007

Katarzyna Skupinska; **Irena Misiewicz Krzemińska**; Rafał Stypulkowski; Katarzyna Lubelska; Teresa Kasprzycka Guttman. *Sulforaphane and its analogues inhibit CYP1A1 and CYP1A2 activity induced by benzo[a]pyrene*. Journal of biochemical and molecular toxicology. 23 - 1, pp. 18 – 46, 2009

Katarzyna Skupinska; **Irena Misiewicz Krzemińska**; Katarzyna Lubelska; Teresa Kasprzycka Guttman. *The effect of isothiocyanates on CYP1A1 and CYP1A2 activities induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in Mcf7 cells*. Toxicology in vitro. 23 - 5, pp. 763 – 834, 2009

Innymi badaniami, w których brałam udział była ocena przeciwnowotworowych właściwości selenitetriglicerydów (Selol). Selol jest mieszaniną selenitetriglicerydów syntetyzowanych z oleju słonecznikowego. Ponieważ zawiera pierwiastek selenu w swojej strukturze, podejrzewa się że wykazuje aktywność chemoprewentynną i przeciwnowotworową. Opisaaliśmy, że Selol pokonał oporność komórek, ponieważ komórki odporne na doksorubicynę były bardziej wrażliwe na Selol niż komórki nie odporne wielolekowo (*Suchocki P i wsp., Oncology Reports, 2007*). Ponadto oceniliśmy trzy strukturalnie pokrewne selenitetriglicerdy, które zawierają różne stężenia Se: 2%, 5% i 7% Selolu. Zaobserwowaliśmy, że efekt różnicowy może być związany ze wzrostem zawartości Se, co prowadzi do zmiany struktury związku. (*Suchocki P i wsp., Pharmaceutical Reports, 2011*). W obu artykułach byłam autorem korespondencyjnym.

Piotr Suchocki; **Irena Misiewicz***; Katarzyna Skupinska; Karolina Wacławek; Zbigniew Fijalek; Teresa Kasprzycka Guttman. *The activity of Selol in multi-drug-*

resistant and sensitive human leukemia cells. Oncology reports. 18 - 4, pp. 893 – 902, 2007 (*autor korespondencyjny)

Piotr Suchocki; **Irena Misiewicz-Krzemińska***; Katarzyna Skupińska; Katarzyna Niedźwiecka; Katarzyna Lubelska; Zbigniew Fijałek; Teresa Kasprzycka Guttman. *Selenitetriglicerydes affect CYP1A1 and QR activity by involvement of reactive oxygen species and Nrf2 transcription factor*. Pharmacological reports : PR. 62 - 2, pp. 352 – 413, 2010 (*autor korespondencyjny)

W tym okresie współpracowałam również przy badaniach innych leków przeciwnowotworowych:

Beata M Gruber; Elzbieta L Anuszevska; Irena Bubko; Teresa Kasprzycka Guttman; **Irena Misiewicz**; Katarzyna Skupińska; Izabela Fokt; Waldemar Piebe. *NFkappaB activation and drug sensitivity in human neoplastic cells treated with anthracyclines*. Acta poloniae pharmaceutica. 65 - 2, pp. 267 – 338, 2008

Sylvia Flis; Agnieszka Gnyszka; **Irena Misiewicz Krzemińska**; Jacek Sławiński. *Decytidine enhances cytotoxicity induced by oxaliplatin and 5-fluorouracil in the colorectal cancer cell line Colo-205*. Cancer cell international. 9, pp.10, 2009

Irena Misiewicz-Krzemińska*; Katarzyna Skupińska; Alfreda Graczyk; Teresa Kasprzycka Guttman. *Influence of protoporphyrin IX amino acid substituents on affinity to human breast adenocarcinoma MCF-7 cells*. Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission. 84 - 1, pp. 17 – 40, 2009 (*autor korespondencyjny)

Od czasu gdy dołączyłam do zespołu Kliniki Hematologii Uniwersytetu w Salamance, Hiszpania (utworzonego między innymi przez Centrum Badań nad Rakiem-Centro de Investigacion del Cancer) w 2009 roku jako post-doc, moja praca badawcza skupiała się głównie na potranskrypcyjnych mechanizmach regulacji ekspresji genów w szpiczaku plazmocytowym. Współpracowałam przy wykonywaniu kilku projektów, głównie w zakresie szpiczaka plazmocytoowego, ale także w innych chorobach hematologicznych i zapoczątkowałam współpracę z grupą onkologiczną.

W tym zakresie, oprócz przedstawionych osiągnięć naukowych, przyczyniłam się do innych odkryć w zakresie deregulacji mikroRNA w szpiczaku i przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL). Nasze badania wykazały, że metylacja DNA przyczynia się do regulacji ekspresji *miR-155* w komórkach szpiczaka i wykazaliśmy związek między ekspresją *miR-155* a rokowaniem pacjentów z MM (Krzeminski P i wsp., *BBA-GRM*, 2015). Ponadto wykazaliśmy nową funkcję białka DEPTOR, która polega na utrzymaniu komórek plazmatycznych w stanie zróżnicowanym. Stwierdziliśmy, że miRNA regulują poziom białka DEPTOR. Co ciekawe, poziom ekspresji białka DEPTOR u pacjentów ze szpiczakiem był wysoce zmienny, a najwyższe poziomy były związane z dłuższym czasem przeżycia bez progresji. (Quwaider D, i wsp. *J Hematol Oncol.*, 2017). Ponadto, stosując techniki sekwencjonowania nowej generacji, wykryliśmy polimorfizm (rs2307842) u 24% pacjentów z CLL, który zakłóca miejsce wiążące dla *miR-223* w 3'UTR genu *HSP90B1*. Warto zauważyć, że nadekspresja *HSP90B1* była niezależnym

czynnikiem przewidującym krótszy czas do pierwszej terapii u pacjentów z CLL. W pracy tej potwierdziliśmy również, że *HSP90B1* jest bezpośrednim genem docelowym dla *miR-223*. Nasze wyniki dostarczają wiarygodnego wyjaśnienia, dlaczego pacjenci z CLL mający niski poziom *miR-223* mają gorsze rokowanie, wskazując na *HSP90B1* jako nowy patogenny mechanizm w CLL i obiecujący cel terapeutyczny. (Rodríguez-Vicente AE i wsp., *BMC Cancer.*, 2015).

Ana E. Rodríguez-Vicente; Dalia Quwaider; Rocío Benito; **Irena Misiewicz-Krzeminska**; María Hernández-Sánchez; Alfonso García de Coca; Rosa Fisac; José-María Alonso; Carolina Zato; Juan Francisco de Paz; Juan Luis Garcia; Ma Eugenia Sarasquete; José Ángel Hernández; Juan M Corchado; Marcos González; Norma C Gutiérrez; Jesús-María Hernández-Rivas. *MicroRNA-223 is a novel negative regulator of HSP90B1 in CLL*. *BMC Cancer*. 15 - 1, 2015

Patryk Krzeminski; María E Sarasquete; **Irena Misiewicz Krzeminska**; Rocío Corral; Luis A Corchete; Ana A Martín; Ramón García Sanz; Jesús F San Miguel; Norma C Gutiérrez. *Insights into epigenetic regulation of microRNA-155 expression in multiple myeloma*. *Biochimica et biophysica acta- Gene regulation mechanisms*. 1849, pp. 353 – 366, 2014

Dalia Quwaider; Luis A Corchete; **Irena Misiewicz Krzeminska**; María E Sarasquete; José J Pérez; Patryk Krzeminski; Noemí Puig; María Victoria Mateos; Ramón García Sanz; Ana B Herrero; Norma C Gutiérrez. *DEPTOR maintains plasma cell differentiation and favorably affects prognosis in multiple myeloma*. *Journal of hematology & oncology*. 10 - 1, pp. 92, 2017

W obszarze badań nad szpiczakiem plazmocytowym aktywnie uczestniczę w poszukiwaniu nowych leków. Wyniki zostały przedstawione na kilku naukowych kongresach i opublikowane w postaci dwóch artykułów.

Wcześniejsze badania wskazywały, że hamowanie białek wrzeciona kinetycznego jest skutecznym podejściem terapeutycznym w kilku nowotworach złośliwych. Filanesib (ARRY-520), inhibitor tych białek, wykazał aktywność pacjentów ze szpiczakiem mnogim u których zastosowane wcześniej wiele linii leczenia. Celem naszej pracy było zbadanie aktywności filanesibu w połączeniu z pomalidomidem i deksametazonem oraz mechanizmów leżących u podstaw potencjalnego efektu synergicznego. Zaobserwowaliśmy synergizm *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* działania filanesibu z pomalidomidem i deksametazonem. Ponadto, potrójna kombinacja zwiększała aktywację proapoptotycznego białka BAX, które wcześniej związane z wrażliwością na filanesib i która może potencjalnie być wykorzystana jako predykcyjny biomarker odpowiedzi na tę kombinację. Nasze wyniki badań przedklinicznych dostarczyły dowodów na potencjalną korzyść z połączenia filanesibu z pomalidomidem i deksametazonem co dało podstawę do rozpoczęcia badania klinicznego prowadzonego przez hiszpańską grupę szpiczakową (Grupo Espanol de Mieloma), która bada tę kombinację u pacjentów z nawrotowym szpiczakiem. (Hernandez-García S, i wsp. *Haematologica*. 2017)

EDO-S101 jest nowym środkiem terapeutycznym opracowanym w drodze połączenia rodnika inhibitora deacetylazy histonowej z bendamustyną, w celu

wzmocnienia jej aktywności alkilującej. EDO-S101 wykazywał silną aktywność *in vitro* w liniach komórek MM i *ex vivo* w komórkach izolowanych od pacjentów z MM. Aktywność ta była wyższa niż bendamustyny i niezależna od statusu p53 i wcześniejszej oporności na melfalan. Aktywność ta została potwierdzona *in vivo*, w modelu mysiej plazmocytozy CB17-SCID i myszach VK * MYC *de novo*, prowadząc do znaczącej poprawy przeżycia w obu modelach. Ponadto, EDO-S101 był jedynym lekiem wykazującym aktywność przy podaniu jako pojedynczy związek w mysim modelu Vk12653 opornym na wiele leków. Dodatkowo, EDO-S101 przedklinicznie synergizuje się z bortezomibem, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Odkrycia te dostarczają uzasadnienia do badań klinicznych EDO-S101 w MM, jako pojedynczego czynnika lub w połączeniu z innymi lekami przeciw MM, szczególnie inhibitorami proteasomu. (Lopez-Iglesias A, i wsp. *J Hematol Oncol.*, 2017).

Susana Hernández García; Laura San Segundo; Lorena González Méndez; Luis A Corchete; **Irena Misiewicz-Krzeminska**; Montserrat Martín Sánchez; Ana-Alicia López Iglesias; Esperanza Macarena Algarín; Pedro Mogollón; Andrea Díaz Tejedor; Teresa Paíno; Brian Tunquist; María-Victoria Mateos; Norma C Gutiérrez; Elena Díaz Rodríguez; Mercedes Garayoa; Enrique M Ocio. *The kinesin spindle protein inhibitor filanesib enhances the activity of pomalidomide and dexamethasone in multiple myeloma*. *Haematologica*. 102 - 12, pp. 2113 – 2124, 2017

Ana-Alicia López Iglesias; Ana B Herrero; Marta Chesi; Laura San Segundo; Lorena González Méndez; Susana Hernández García; **Irena Misiewicz Krzeminska**; Dalia Quwaider; Montserrat Martín Sánchez; Daniel Primo; Teresa Paíno; P Leif Bergsagel; Thomas Mehrling; Marcos González Díaz; Jesús F San Miguel; María-Victoria Mateos; Norma C Gutiérrez; Mercedes Garayoa; Enrique M Ocio. *Preclinical anti-myeloma activity of EDO-S101, a new bendamustine-derived molecule with added HDACi activity, through potent DNA damage induction and impairment of DNA repair*. *Journal of hematology & oncology*. 10 - 1, pp. 127, 2017

Obecnie aktywnie uczestniczę w ocenie stanu funkcjonalnego p53 u chorych na szpiczaka. Rutynowy sposób badania genu TP53 u pacjentów z MM jest wyjątkowo uproszczony, ponieważ sprowadza się jedynie do analizy zmian DNA bez badania jego wpływu na funkcję p53 i innych przyczyn, które mogą inaktywować ten gen. Stąd intencją obecnie realizowanych projektów jest zajęcie się bardziej kompletnym i szczegółowym badaniem funkcji p53 dla każdego pacjenta z MM. W związku z tym dokonaliśmy przeglądu różnych mechanizmów hamowania szlaku p53 w nowotworach, ze szczególnym uwzględnieniem MM. MM to drugi najczęstszy nowotwór hematologiczny, z małą częstością mutacji / delecji p53, w którym coraz więcej dowodów wskazuje na istotność pośredniej deregulacji szlaku p53. (Herrero AB i wsp., *Int J Mol Sci*. 2016).

Ana B Herrero; Elizabeta A Rojas; **Irena Misiewicz Krzeminska**; Patryk Krzeminski; Norma C Gutiérrez. *Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma*. *International journal of molecular sciences*. 17 - 12, 2016

W ciągu ostatnich 3 lat skupiłam się na oznaczaniu ilościowym ekspresji białka za pomocą nowej technologii, kapilarnego nano-immunooznaczenia (CNIA). W tym zakresie współpracowałam z Grupą terapii Komórkowej z University Hospital of Salamanca. Ocenialiśmy, czy mezenchymalne komórki macierzyste (*ang. mesenchymal stem cells*, MSC) od pacjentów z zespołem mielodysplastycznym (MDS) mogą modyfikować właściwości komórek hematopoetycznych CD34 + przez egzosomy / mikropęcherzyki (MV) silniej niż w komórki od zdrowych dawców (HD). Zaobserwowaliśmy, że komórki krwiotwórcze progenitorowe CD34 + (HPC) mogą inkorporować MV z MSC, modyfikując ekspresję mikroRNA i genów w komórkach CD34 +. Ponadto inkorporacja tych MV wpływa na żywotność klonogenność komórek CD34 +. W tych wynikach ważne jest to, że BM-MSC uwalniają MV z innym ładunkiem u pacjentów z MDS w porównaniu ze zdrowymi dawcami. (Muntión S, i wsp., PLOS One, 2016).

Współpracuję również z grupą onkologiczną pracującą nad wprowadzeniem biopsji płynnej w raku prostaty opornym na kastrację, aby przewidzieć, którzy pacjenci będą odpowiedni do konkretnego leczenia. Wariant 7 receptora androgenowego (AR) (AR-V7) był powiązany zarówno z wyższym ryzykiem progresji raka gruczołu krokowego (prostate cancer-PC), jak i zróżnicowanej odpowiedzi na leki hormonalne w porównaniu z chemioterapią. W pierwszej kolejności zbadaliśmy możliwość zastosowania nowego nano-immunologicznego testu kapilarnego w ocenie AR-V7 w osoczu pacjentów z rakiem prostaty i wykazaliśmy obecność AR-V7 u 29% pacjentów, przy czym AR-V7 występował częściej u pacjentów z agresywnymi postaciami nowotworów. (*Garcia JL, i wsp., Clin Transl Oncol. 2017*)

Sandra Muntión; Teresa L Ramos; María Diez Campelo; Beatriz Rosón; Luis Ignacio Sánchez Abarca; **Irena Misiewicz Krzeminska**; Silvia Preciado; María-Eugenia Sarasquete; Javier de Las Rivas; Marcos González; Fermín Sánchez Guijo; María-Consuelo Del Cañizo. *Microvesicles from Mesenchymal Stromal Cells Are Involved in HPC-Microenvironment Crosstalk in Myelodysplastic Patients*. PloS one. 11 - 2, pp. e0146722, 2016

Juan Luis García; Rebeca Lozano; **Irena Misiewicz Krzeminska**; Javier Fernández Mateos; Patryk Krzeminski; Sara Alfonso; Rosa Ana Marcos; Rebeca García; Francisco Gómez Veiga; Á Virseda; Jose Maria Herrero; Davia Olmos; Juan Jesus Cruz Hernández *A novel capillary nano-immunoassay for assessing androgen receptor splice variant 7 in plasma. Correlation with CD133 antigen expression in circulating tumor cells. A pilot study in prostate cancer patients*. Clinical & translational oncology. 19 - 11, pp. 1350 – 1357, 2017

6. Podsumowanie

Liczba prac: 35

Łączny IF= 111,498

Suma punktów MNiSW=790

Index Hirscha (źródło Web of Sciences 20/02/2019)= 13

liczba cytowań 616

Podsumowując, moja aktywność naukowa obejmuje 35 publikacji w indeksowanych czasopismach naukowych, w tym 32 artykuły eksperymentalne i 3 artykuły pogładowe. Łączny współczynnik Impact Factor wszystkich opublikowanych badań wynosi **111,498** przy czym średni Impact Factor na publikację wynosi 3,185. Łączna liczba punktów MNiSW dla tych czasopism wynosi **790**. Publikacje te były cytowane **616** razy. Indeks Hirscha (indeks h) moich publikacji wynosi **13** (stan na 20/02/2019 w Web of Science).

Jolanta Mikulicz-Krzecimirska