

Załącznik nr 3a

AUTOREFERAT

Informacje o dorobku i osiągnięciach naukowych

“Metabolizm hemu w biologii nowotworów.”

dr Barbara Węgiel
Zakład Chirurgii
Szkoła Medyczna Harvarda
Beth Israel Deaconess Medical Center
3 Blackfan Circle
Center for Life Science #613
Boston, MA 02215

Barbara Węgiel

1. Imię i nazwisko: Barbara Węgiel**2. Posiadane stopnie naukowe oraz dyplomy:**

2007	Doktor nauk klinicznych w zakresie urologii	Tytuł pracy: "Cellular pathways in angiogenesis and tumor invasion in prostate cancer." Promotorzy: Prof. Anders Bjartell, dr Jenny L. Persson	Zakład Urologii, Szpital Uniwersytecki w Malmoe, Uniwersytet w Lund, Szwecja
2006	Doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii	Tytuł pracy: "Rola biliwerdyny i tlenku węgla w inicjacji przekazu sygnału przez szlak PI3K-Akt w makrofagach i komórkach śródbłonna." Promotorzy: Prof. dr hab. Józef Dulak, Prof. Fritz H. Bach, MD (BIDMC, Szkoła Medyczna Harvarda)	Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński Kraków, Polska
2004	Magister biotechnologii (biologii molekularnej)	Tytuł pracy: "Genetic approach to the role of heme oxygenase-1 in human keratinocytes. Construction of AAV vectors." Prof. dr hab. Józef Dulak	Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński Kraków, Polska

Staż badawcze:

2007-2009	Staż po-doktorski	Rola szlaku degradacji hemu w makrofagach. Mentor: dr Leo E. Otterbein	Zakład Chirurgii, Szkoła Medyczna Harvarda, Beth Israel Deaconess Medical Center
-----------	-------------------	---	--

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

2011-nadal	Adiunkt (Assistant Professor)	Zakład Chirurgii, Szkoła Medyczna Harvarda, Beth Israel Deaconess Medical Center 3 Blackfan Circle MA, 02215, Boston USA
2009-2011	Asystent (Instruktor)	Zakład Chirurgii, Szkoła Medyczna Harvarda, Beth Israel Deaconess Medical Center 3 Blackfan Circle MA, 02215, Boston USA

2011-nadal	Zaproszony naukowiec	Zakład Medycyny Stosowanej, Oddział Eksperymentalnych Badań Nowotworów, Szpital Uniwersytecki w Malmö, Uniwersytet w Lund, Szwecja
2014-nadal	Zaproszony wykładowca w dziedzinie molekularnej onkologii	Szkoła Medyczna Aston, Birmingham, Wielka Brytania

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

4.a. Tytuł: “Metabolizm hemu w biologii nowotworów.”

4b. Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa.

4b.1. Otterbein LE, Hedblom A, Harris C, Csizmadia E, Gallo D, **Węgiel B**. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide modulate DNA repair through ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein. 2011 Aug, PNAS, 30;108(35):14491-6.

IF₂₀₁₁: 9.681 MNISW: 45 Liczba cytowań: 15 Autor korespondencyjny: Węgiel B

4b.2. Węgiel B, Gallo D, Csizmadia E, Harris C, Belcher J, Vercellotti GM, Penacho N, Seth P, Sukhatme V, Ahmed A, Pandolfi PP, Helczynski L, Bjartell A, Persson JP, Otterbein LE; Carbon monoxide expedites metabolic exhaustion to inhibit tumor growth. 2013 Dec 1; Cancer Research, 73(23):7009-21. (cover of December Issue)

IF₂₀₁₁: 9.284 MNISW: 45 Liczba cytowań: 19 Autor korespondencyjny: Węgiel B, Otterbein LE

4b.3. Węgiel B, Hedblom A, Li M, Gallo D, Csizmadia E, Harris C, Nemeth Z, Zuckerbraun B, Soares M, Persson JL, Otterbein LE. Heme oxygenase-1 derived carbon monoxide permits maturation of myeloid cells. 2014, Cell Death and Disease, 2014 Mar 20;5:e1139

IF₂₀₁₄: 5.014 MNISW: 35 Liczba cytowań: 8 Autor korespondencyjny: Węgiel B

4b.4. Nemeth Z, Li M, Seth P, Csizmadia E, Dome B, Johansson M, Persson J, Otterbein LE, **Węgiel B**. Heme oxygenase-1 in macrophages controls prostate cancer progression, 2015, Oncotarget, Oct 20;6(32):33675-88.

IF₂₀₁₅: 6.359 MNISW: 40 Liczba cytowań: 0 Autor korespondencyjny: Węgiel B

4b.5. Węgiel B, Nemeth Z, Costa M, Bulmer A, Otterbein LE. Heme oxygenase-1: a metabolic Nike. Antioxidant redox Signaling, 2014 Apr 10;20(11):1709-22. Forum Issue

IF₂₀₁₃: 7.667 MNISW: 40 Liczba cytowań: 15 Autor korespondencyjny: Węgiel B

Sumaryczny IF prac stanowiących podstawę habilitacji: IF= 38,005

Sumaryczna punktacja MNISW (wg załącznika do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 27 października 2015 roku) =**205**

W sumie prace te były cytowane 57 razy (*Web of Science, dane na dzień 13.03.2016*)

Oświadczenia wszystkich współautorów prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego, określające ich udział w każdej publikacji, która stanowi podstawę postępowania habilitacyjnego, są zawarte w Załączniku nr 6.

4.c. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

W poniższej rozprawie habilitacyjnej zatytułowanej: “Metabolizm hemu w biologii nowotworów” przedstawiłam moje najważniejsze osiągnięcia i wyniki z jednego z wiodących tematów w moim laboratorium. Obecnie moje badania prowadzę w Beth Israel Deaconess Medical Center, szpitalu będącym jednostką Szkoły Medycznej Harvarda. Tematyką biologii nowotworów zajmuję się od czasu mojej pierwszej niezależnej pozycji jako asystent (Instructor) i obecnie jako adiunkt (Assistant Professor). Pracę nad degradacją hemu i regulacją ekspresji oksygenazy hemowej rozpocząłam już podczas moich studiów magisterskich gdzie w laboratorium kierowanym przez prof. dr. hab. Józefa Dulaka na Uniwersytecie Jagiellońskim (UJ) przygotowałam wektory AAV (adeno-associated virus) do nadekspresji oksygenazy hemowej (HO-1) oraz reduktazy biliwerdyny (BVR). To właśnie prof. Dulak umożliwił mi mój pierwszy wyjazd do Bostonu, gdzie wraz z prof. Bachem pracowałam nad rolą reduktazy biliwerdyny (BVR) i tlenku węgla (CO) w makrofagach i śródbłonku, a badania te były podstawą mojej pracy doktorskiej, która obroniłam w 2006 roku na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Od tego czasu moje kontakty z UJ, a szczególnie pracownią i pracownikami Zakładu Biotechnologii Medycznej kierowanym przez prof. dr. hab. Dulaka zacieśniły się i są wciąż aktywne. Wielokrotnie przedstawiałam moje wyniki badań w postaci dwóch wykładów na Wydziale oraz jednego wykładu w JCET w ciągu ostatnich 5 lat, a także uczestnictwa w konferencjach (Biomed, 2015; Heme Oxygenases 2007 - 5th International Congress, Kraków, 2007) i szkole zimowej Zakładu Biotechnologii Medycznej UJ (Rytm, 2016). Dodatkowo, prof. Dulak odwiedził gościnnie moje laboratorium i przedstawił seminarium w BIDMC/HMS w Bostonie. Tak aktywny kontakt z Wydziałem Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ w Krakowie oraz obecność członków wydziału w Krakowie, którzy są ekspertami w dziedzinie jaką badam, uzasadnia moja aplikację o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ w Krakowie.

Wstęp/abstrakt:

Pomimo coraz większej liczby terapii przeciwnowotworowych, zarówno celowanych czy opartych na zwiększaniu odpowiedzi immunologicznej (terapię immunologiczne), nowotwory wykryte w zaawansowanym stadium albo te z przerzutami pozostają główną przyczyną śmierci. Dlatego, też istnieje duże zainteresowanie aby zidentyfikować nowe cele terapeutyczne oraz szlaki w komórkach, które byłyby podstawą opracowania nowych leków anty-nowotworowych. Ponadto, identyfikacja nowych biomarkerów nowotworowych umożliwiłaby łatwiejszy dobór i stratyfikację pacjentów w celu lepszej odpowiedzi na terapię, a także lepsze wykorzystanie celowanych terapii na podstawie istniejących mutacji. W poniższej rozprawie habilitacyjnej przedstawiłam podstawy obecnej wiedzy na temat rozwoju nowotworów a także terapii antynowotworowych, w kontekście moich badań. Ponadto, opisałam szczegółowo mój wkład do zrozumienia jednego z istotnych szlaków, a mianowicie szlaku degradacji hemu w nowotworzeniu i terapii antynowotworowej. Chemioterapia i naświetlanie stanowią jedną z podstawowych terapii dla pacjentów z zaawansowanymi nowotworami i tymi z przerzutami. Takie terapie hamują podziały komórek nowotworowych i dlatego zmniejszają wzrost nowotworu. Jednakże, nie tylko powodują one liczne efekty uboczne, ale co ważniejsze rzadko prowadzą do wyleczenia choroby nowotworowej. U większości pacjentów po chemioterapii lub

naświetlaniu, następuje nawrót nowotworu w postaci bardziej zaawansowanej i odpornej na leczenie. Wiele czynników wpływa na rozwój nowotworów i ich odpowiedź na leki. Jednym z głównych mechanizmów wpływających na wzrost komórek, ich przerzutowość, a także odpowiedź na leczenie, jest zmiana metabolizmu w komórkach nowotworowych i komórkach układu immunologicznego w mikrośrodowisku guza. Przez ostatnie dziesięć lat, moje badania, a także innych naukowców nad rolą metabolizmu hemu przyczyniły się do lepszego zrozumienia roli tego szlaku w rozwoju, wzroście oraz przerzutowości nowotworów. Degradacja hemu przez oksygenazę hemową (HO-1), enzymu indukowanego przez stres oksydacyjny jak i odpowiedź zapalną prowadzi do uwolnienia tlenu węgla, biliwerdyny i jonu żelaza. Zarówno enzymy jak i produkty rozkładu hemu mają istotne znaczenie w regulacji procesu nowotworzenia i kontroli odpowiedzi na terapie przeciwnowotworowe.

W poniższej rozprawie podaję cztery powody dla których szlak HO-1 może być bezpośrednio powiązany z procesem nowotworzenia:

- (i) HO-1 odpowiada za usunięcie toksycznego hemu i generację trzech produktów, które bezpośrednio wpływają na wzrost nowotworu i jego przerzutowość;
- (ii) HO-1 ma bezpośredni wpływ na wzrost nowotworu niezależnie od aktywności enzymatycznej;
- (iii) HO-1 ma wpływ na zmianę funkcji komórek układu immunologicznego w mikrośrodowisku guza;
- (iv) Jeden z produktów degradacji hemu, tj. tlenek węgla (CO) reguluje różnicowo oddychanie komórkowe i metabolizm glukozy w komórkach nowotworowych w porównaniu do normalnych komórek nabłonka.

Ze względu na złożoność odpowiedzi na HO-1 w różnych komórek w mikrośrodowisku nowotworu, moje badania szlaku degradacji hemu skupione były nie tylko na komórkach nowotworowych, a także na komórkach układu immunologicznego. Główną uwagę w tej rozprawie przywiązałam do opisu roli CO w nowotworach gruczołu krokowego i płuc, chociaż jestem świadoma, że inne produkty degradacji hemu i sam hem mogą i z pewnością również pełnią rolę w wielu innych nowotworach. Ponadto, poniżej opisałam rolę HO-1 i CO w regulacji odpowiedzi na uszkodzenie DNA w komórkach normalnych i nowotworowych. Podsumowując, opisane przeze mnie badania stanowią podstawę do dalszych badań, które skupione są głównie na potencjalnej aplikacji naszych odkryć dla pacjentów.

W moich badaniach wykazaliśmy:

- (i) Rolę HO-1 i CO w regulacji naprawy DNA w odpowiedzi na traktowanie komórek chemioterapeutykami lub naświetlanie¹. (4b.1.)
- (ii) Rolę HO-1 i CO w regulacji wzrostu nowotworów i odpowiedzi na chemioterapie oraz naświetlanie przez wpływ na metabolizm glukozy^{2,3}. (4b.2; 4b.3)
- (iii) Rolę HO-1 i CO w dojrzewaniu i funkcji komórek szpiku kostnego⁴. (4b.4)
- (iv) Rolę HO-1 i CO w makrofagach związanych z nowotworem (TAMs) w raku gruczołu krokowego⁵. (4b.5)

Najważniejsze wnioski rozprawy habilitacyjnej:

- (i) HO-1 aktywuje szlak ATM-H2AX γ przez uwolnienie CO z hemu, zwiększając naprawę uszkodzeń w DNA w normalnych komórkach. W ten sposób CO może być rozpatrywany jako cząsteczka o potencjale leku aplikowanego w celu minimalizacji efektów ubocznych terapii przeciwnowotworowej^{1,2}.

Brak ekspresji HO-1 w tkankach u myszy z nieaktywnym genem *Hmox1* (*Hmox1*^{-/-}) powoduje akumulację uszkodzeń w DNA w tkankach. Indukcja HO-1 albo podanie gazowego CO (250 ppm, części na milion) indukuje rekombinację homologiczną DNA przez aktywację szlaku kinaz ATM/ATR (ataxia-telangiectasia mutated/ataxia telangiectasia and Rad3-related protein). Eskpozycja myszy na gazowy CO (250 ppm, 1 godzinę przed chemioterapią albo przed śmiertelną dawką naświetlenia promieniami X) zmniejsza

uszkodzenie narządów i zwiększa przeżywalność zwierząt. W tej publikacji opisałam rolę HO-1 i CO w naprawie uszkodzonego DNA, co może być podstawą cytoprotekcyjnej roli HO-1 i CO w wielu modelach zwierzęcych. Ponadto, wyniki tych badań mogą sugerować prewencyjną rolę CO i HO-1 w biologii nowotworów.

- (ii) Enzymatycznie aktywna HO-1 i CO blokują wzrost nowotworu i odpowiedź na chemioterapię przez zmianę metabolizmu glukozy w komórkach i produkcję ROS¹.

W mojej pracy opublikowanej w Cancer Research wykazałam, że CO w niskich nietoksycznych stężeniach (250 ppm) zwiększa odpowiedź komórek nowotworowych raka gruczołu krokowego na niskie dawki chemioterapii w przeciwieństwie do normalnych komórek nabłonka. Ponadto, nowotwory u myszy traktowane CO były znacznie mniejsze niż w tych nietraktowanych CO. CO zwiększył apoptozę komórek nowotworowych *in vivo* przez odwrócenie efektu Warburga w komórkach nowotworowych. W tych badaniach, odkryłam że mechanizm działania CO polega na wczesnej indukcji zużycia tlenu w procesie oddychania komórkowego (OCR, oxygen consumption rate), zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) i ostatecznie wyczerpania metabolicznego komórek.

- (iii) HO-1 i CO zwiększają różnicowanie makrofagów z komórek szpiku⁴.

W tych badaniach wykazałam, po raz pierwszy, że HO-1 i CO indukuje ekspresję CD14 i innych markerów makrofagów, tym samym prowadzi do zwiększenia puli makrofagów zdolnych do odpowiedzi na zapalenie czy uszkodzenie narządów. W modelu przeszczepu komórek szpiku kostnego, wykazałam, że CO/HO-1 poprawia przeżywalność myszy w przypadku podania niewystarczającej ilości komórek szpiku, co może być związane z regulowaną przez CO zwiększoną ilością cytokin i czynników wzrostu makrofagów takich jak, IL-1 α , GM-CSF, MCP-1. Różnicowanie makrofagów do bardziej efektywnych komórek fagocytujących w obecności CO może być istotne w wielu procesach tj: nowotworzeniu, gojeniu ran, usuwaniu bakterii, itp.

- (iv) HO-1 w makrofagach reguluje wzrost i przerzutowość komórek raka gruczołu krokowego⁵.

Celem tej części pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy HO-1 w makrofagach reguluje wzrost nowotworu. W tych badaniach wykazaliśmy, że specyficzna inaktywacja genu HO-1 w makrofagach powoduje zmniejszony wzrost nowotworu gruczołu krokowego. Jednakże, brak HO-1 w tych makrofagach zwiększył inwazyjny charakter komórek nowotworowych oraz indukcję genów związanych z transformacją nabłonka do komórek mezenchymalnych (epithelial to mesenchymal transition, EMT). Jednocześnie w nowotworach z brakiem HO-1 w makrofagach zaobserwowaliśmy zmniejszoną ekspresję E-kadheryny, odpowiedzialnej za interakcje między komórkami nabłonka, a którego inaktywacja jest markerem obniżonej przeżywalności pacjentów z nowotworami. Te badania wyjaśniły częściowo rolę HO-1 i CO w makrofagach w inicjacji i wzroście nowotworów.

4.d. Wprowadzenie i cele badawcze:

Centralna hipoteza: HO-1 i CO mają wpływ na wzrost nowotworu i przerzutowanie przez ich wpływ na komórki nowotworowe jak i komórki układu immunologicznego.

Hipoteza ta była testowana w następujących celach:

- i. Określenie i porównanie roli HO-1 i CO w komórkach nowotworowych i normalnych w odpowiedzi na chemioterapię^{1,2} i związanej z tym regulacji metabolizmu komórkowego³.
- ii. Badanie roli HO-1 i CO w komórkach szpiku kostnego i makrofagów w mikrośrodowisku guza^{4,5}.

Znaczenie i istota badań:

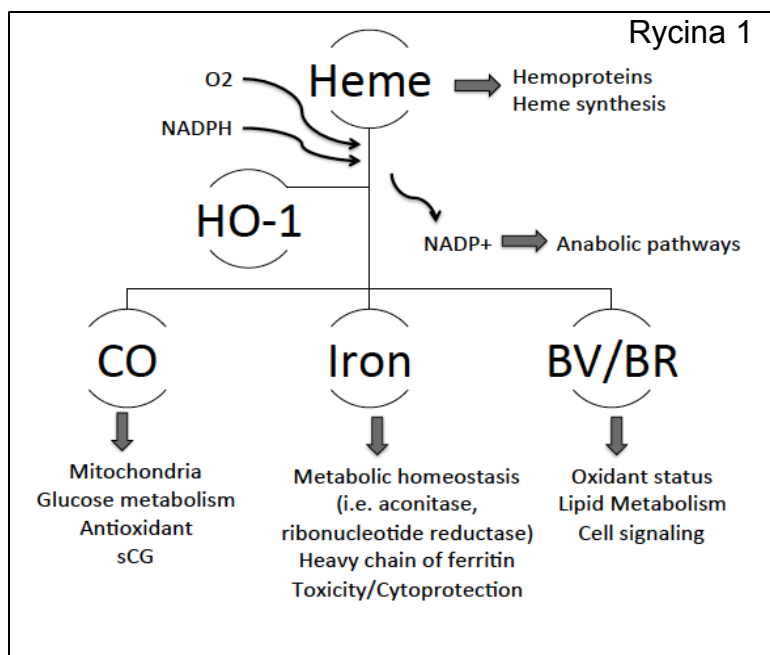
4.c.1. Szlak hemu w metabolizmie komórek

4.c.1.1. Oksygenaza hemowa-1 a kontrola metaboliczna

Szlak degradacji hemu jest jedynym procesem katalitycznym, który pozwala na usunięcie toksycznego hemu w komórkach i tkankach. Za przekształcanie hemu do biliwerdyny (BV) odpowiedzialne są dwa enzymy oksygenazy hemowej: HO-1 i HO-2⁶. BV jest następnie zredukowana do bilirubiny (BR) przez reduktazę biliwerdyny (BVR). Obok biliwerdyny, w wyniku aktywności HO-1 wytwarzany jest tlenek węgla (CO) i jon żelaza. Hem jest jednym z głównych czynników stymulujących ekspresję HO-1. Poza tym HO-1 jest indukowana przez stres oksydacyjny, cytokiny, metale ciężkie i endotoksyny bakteryjne. Druga izoforma oksygenazy hemowej, HO-2, jest obecna w wielu organach, z najwyższą ekspresją w mózgu i jądrach^{7,8}, ale jej rola jest znacznie mniej znana w porównaniu do opisanych funkcji dla HO-1. Wyzwolenie CO podczas degradacji hemu wymaga zużycia jednej cząsteczki NADPH. Ponadto konwersja BV do BR pochłania kolejne dwie cząsteczki NADPH. Trzy cząsteczki NADP⁺ powstałe w szlaku degradacji hemu, napędzają z kolei drogę przemiany pentozowo-fosforanowej i innych procesów anabolicznych. W ten sposób pozwalają na regenerację siły protonowej, generując ważne cząsteczki szlaku biosyntezy kwasów nukleinowych i białka (**Rycina 1**) (**Węgiel i wsp, ARS 2014**).

HO-1 jest więc krytycznym regulatorem procesów katabolicznych i anabolicznych w komórkach. Dostępność biologiczna substratów (hemu, tlenu) dla aktywności HO-1 może być czynnikiem ograniczającym efektywność tego szlaku. Komórki rakowe są narażone na niedotlenienie, a zatem degradacja hemu może stać się jednym ze szlaków ograniczonych ze względu na konieczność tlenu do rozkładu hemu. Rzeczywiście, HO-1 ma mniejszą aktywność podczas niedotlenienia co jest spowodowane częściowo odcięciem C-końcowych 22 aminokwasów białka i translokacji HO-1 do jądra komórkowego. Mniejsza aktywność tego enzymu w warunkach niedoboru tlenu może być jednym ze zmian zachodzących w komórkach nowotworowych. Rzeczywiście jądrowa forma HO-1 jest związana ze złym rokowaniem i jest charakterystyczna dla bardziej złośliwych nowotworów, które są odporne na chemioterapię^{2,3,9-12} (**Węgiel i wsp, Cancer Research 2013; Węgiel i wsp, ARS 2014**).

Obszerna literatura na temat szlaku HO-1 podkreśla ochronną rolę HO-1 w modelach różnych chorób włączając ochronę przed stenozą po przeszczepie naczyniowym i odrzuceniu przeszczepionego narządu, uszkodzeniem niedokrwinnym narządów, wstrząsem endotoksycznym, posocznicą, nadciśnieniem płucnym i mechanicznym uszkodzeniem płuc i wieloma innymi¹³⁻¹⁵. Uznaje się, że szlak HO-1 działa jako system obrony przed stresem oksydacyjnym i tym samym ogranicza prawdopodobieństwo mutacji DNA i może zapobiegać rozwojowi nowotworów. Część z tych działań mogą być przypisane antyoksydacyjnej roli pigmentów żółciowych, bilirubiny i biliwerdyny. Ponadto, moje badania wykazały, że CO zwiększa naprawę uszkodzonego DNA poprzez rekombinację homologiczną w normalnych komórkach i tkankach w odpowiedzi na stres genotoksyczny¹ (**Otterbein i wsp, PNAS 2011**). Mechanizmy cytoprotekcyjne są



często wykorzystywane przez komórki nowotworowe, po to aby uniknąć sygnału apoptozy. Rzeczywiście, pewne typy raka wykorzystują układ HO-1 w celu ochrony przed stresem oksydacyjnym i w ten sposób ograniczają śmierć komórek¹⁷. Co warto podkreślić, moja praca wykazała istnienie dużych różnic w odpowiedzi pomiędzy komórkami nowotworami i normalnymi, w przypadku odpowiedzi na CO lub nadekspresję HO-1. Jeden z przykładów takich różnicowych odpowiedzi jest podyktowany przez różną aktywność metaboliczną komórek nowotworowych w porównaniu z normalnymi komórkami (**Węgiel i wsp, Cancer Research, 2013; Węgiel i wsp, ARS 2014**).

CO, który jest uwolniony w wyniku aktywności HO-1 lub aplikowany egzogennie, spowodował zwiększenie śmierci komórek nowotworowych w odpowiedzi na chemioterapię, podczas gdy ta sama dawka CO zmniejszyła uszkodzenia w normalnych tkankach. W istocie, brak HO-1 w tkankach spowodował akumulację ognisk uszkodzenia DNA. Takie pęknięcia w DNA, mogą tworzyć z powodu wysokiego stresu oksydacyjnego u myszy *Hmox1*^{-/-}, ale również wskazują na rolę HO-1 w indukcji naprawy DNA za pośrednictwem maszynerii związanej z rekombinacją homologiczną (**Otterbein i wsp, PNAS 2011**). Jednym z najbardziej prawdopodobnym wyjaśnień gromadzenia się uszkodzeń DNA u myszy z uszkodzonym genem HO-1 jest spadek aktywności kinazy ATM. Fosforylacja ATM jest indukowana przez zwiększenie stresu oksydacyjnego, który predysponuje komórki do mutacji w DNA za pośrednictwem wysokiego poziomu reaktywnych form tlenu (ROS)¹⁸. Nasze odkrycie może prowadzić do potencjalnego zastosowania niskich dawek CO jako adiuwantu wraz z chemioterapią lub napromieniowaniem do leczenia pacjentów z nowotworami. Z jednej strony zastosowanie CO przyczyniłoby się do możliwości użycia mniejszej dawki leków toksycznych do zwalczania komórek nowotworowych, a także chroniłoby przed skutkami ubocznymi takiej ogólnoustrojowej terapii. CO zabezpiecza prawidłowe tkanki przed uszkodzeniem DNA, a zatem chroni przed skutkami ubocznymi terapii przeciwnowotworowych i może stanowić terapię prewencyjną przed nagromadzeniem mutacji i transformacją nowotworową.

HO-1 i produkty degradacji hemu kwalifikowane są jako cząsteczki homeostazy organizmu¹⁹⁻²². Mechanizmy tego złożonego systemu regulacji homeostazy przez szlak hemu wciąż są intensywnie badane. Moje badania dotyczyły pytania: jak HO-1 jest połączona z innymi szlakami metabolicznymi i sygnałowymi, a także jak szlak degradacji hemu przyczynia się do bezpośredniego wpływu na proces nowotworzenia i odpowiedź na istniejące terapie? Moje odkrycia przyczyniły się do częściowego zrozumienia HO-1 i degradacji hemu szlaku w biologii nowotworów.

4.c.1.2. CO i kontrola metabolizmu

Przy niskich stężeniach CO jest nietoksycznym gazem podobnie jak inne pośredniki gazowe, takie jak NO lub H₂S^{23,24}. Najczęściej jednak rozpoznaje się niekorzystne efekty biologiczne CO, które mogą wystąpić przy bardzo wysokich stężeniach (> 10000 ppm) i które mają miejsce w związku z tworzeniem kompleksu CO z hemoglobina i zablokowaniem jej zdolności przenoszenia tlenu. Dlatego CO został uznany jako trujący gaz. Ostatnie badania z zastosowaniem poziomów CO zbliżonych do fizjologicznego stężenia generowanego endogennie przez HO-1, wykazały silne działanie regulacyjne tego przekaźnika gazowego. Jedną z najważniejszych funkcji fizjologicznych endogennego CO jest działanie jako dyfuzyjny przekaźnik sygnału w komórkach i regulowaniu szlaków przekazu sygnału odpowiadającej aktualnemu zapotrzebowaniu komórki. Pomimo, że CO jest niereaktywny i niemetalizowany, to jednak przez wiązanie białek z grupą prostetyczną hemu (hemoproteiny) wpływa na metabolizm komórki. CO wiąże Fe²⁺ w hemoproteinach mając dlatego większą selektywność niż NO.

CO oddziałuje na przykład z hemem oksydazy cytochromu c, jednego z kompleksów w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów i w ten sposób wpływa na stan energetyczny komórek^{25,26}. Istnieje wiele innych hemoprotein w komórce, które mogą być celem CO, w tym rozpuszczalna cykloaza guanylowa (sGC) oraz indukowana syntaza azotu (iNOS; nitric oxide synthase). CO aktywuje również kanały potasowe i wiele szlaków kinaz, w tym szlaki PI3K-Akt lub MAPK^{26,27}. Pomimo tego, że CO może regulować aktywność hemoprotein w komórkach, dokładny mechanizm ich aktywacji przez CO jest w dużym stopniu nieznanymi i

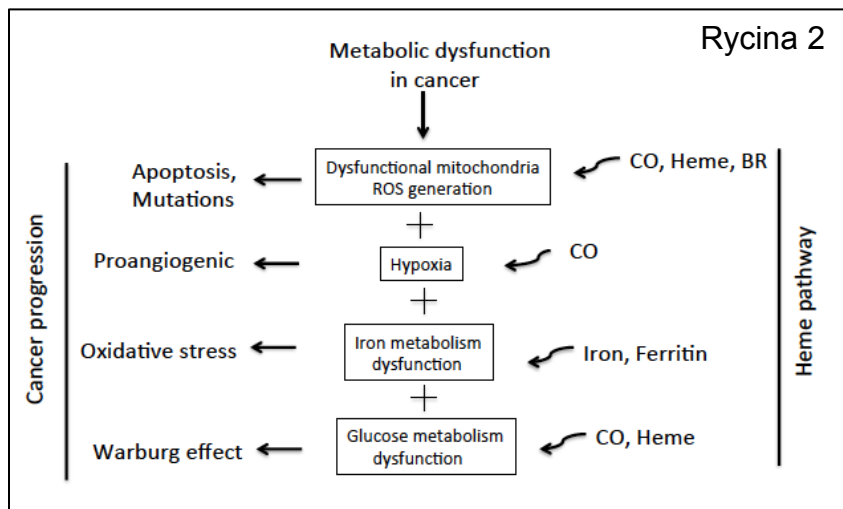
może być związany z modulacją ROS²⁸⁻³¹. Ostatnio wykazano, że CO jednocześnie zmniejszył aktywność oksydazy cytochromu c w komórkach z niedotlenieniem²⁵. Jednakże endogenne CO hamuje oddychanie komórkowe w warunkach normalnego poziomu tlenu tylko nieznacznie²⁵. Ponadto stwierdzono, że CO zwiększa aktywność oksydazy cytochromu C oraz szybkość zużycia tlenu komórkowej (OCR)^{32,33} w astrocytach, biogenezę mitochondriów w neuronach i komórkach mięśnia sercowego³⁴ działając przez PPAR γ i jego koaktywator (PGC) i Nrf2. Polepszenie oddychania komórkowego, w odpowiedzi na CO w astrocytach towarzyszyło zwiększeniu zużycia tlenu, obniżeniu poziomu mleczanu i zmniejszenia wykorzystania glukozy,³² podobnie jak w naszych obserwacji w hodowlach komórek nowotworowych (**Węgiel i wsp, Cancer Research 2013**). Podobne obserwacje wykazano niedawno w komórkach śródbłonna w odpowiedzi na działanie cząsteczek uwalniających CO (CORMs)³⁵. CO poprawia stan energetyczny komórek ze zwiększeniem proporcji ATP/ADP i zmniejszeniem produkcji mleczanu sugerujących, że nawet, gdy stężenie glukozy jest mniejsze, metabolizm jest nadal skuteczny³⁶. W naszych badaniach wykazaliśmy zwiększenie OCR po ekspozycji komórek raka gruczołu krokowego na CO. OCR i zwiększona produkcja ROS w odpowiedzi na CO doprowadziła do zahamowania cyklu komórkowego i ostatecznie do zatrzymania oddychania komórkowego w procesie wyczerpania metabolicznego w komórkach nowotworowych (**Węgiel i wsp, Cancer Research 2013**).

CO w formie wziewnego gazu jest obecnie badany jako terapeutyk w czterech badaniach klinicznych fazy II. BR / BV zostały przetestowane w przedklinicznych modelach zwierzęcych. Zatem istnieje możliwość zastosowania tych cząsteczek w klinice dla pacjentów z rakiem lub zespołami metabolicznymi w przyszłości.

4.c.2. HO-1 i CO w kontroli wzrostu nowotworów

4.c.2.1. Rola HO-1 w regulacji wzrostu nowotworu.

Szybki rozrost guza pierwotnego i przeżycia komórek nowotworowych podczas rozprzestrzeniania się nowotworu do odległych narządów, jak również odporność na leczenie jest możliwe w części ze względu na niezwykłą adaptację metabolizmu komórek nowotworowych, znane jako efekt Warburga³⁸. Efekt Warburga charakteryzuje zwiększony wychwyty glukozy i glikolizy z ograniczonym zużyciem tlenu (OCR), które prowadzi do wysokiej wydajności fermentacji mlekowej^{39,40}. Duże zapotrzebowanie na energię potrzebną do syntezy białka, DNA i kwasów tłuszczowych w komórkach nowotworowych często towarzyszy nasileniu stanu oksydacyjnego niefunkcjonujących mitochondriów⁴¹ (**Rycina 2**).



Wzrost guza wymaga po części selekcji komórek nowotworowych ze zmniejszoną aktywnością mitochondrialną⁴². Wady metabolizmu mitochondrialnego i produkcji ROS w komórkach rakowych korelują bezpośrednio ze zwiększonym metabolizmem glukozy. Teoria rozwoju nowotworu na podstawie akumulacji wolnych rodników sugeruje nadmierną produkcję ROS jako główną przyczyną wczesnych mutacji, jak również późniejszej oporności na leczenie⁴³⁻⁴⁷. CO i HO-1 są kluczowymi regulatorami metabolizmu i aktywności mitochondrialnej^{48,49,50}. Poprzez bezpośredni lub pośredni wpływ na poziom glukozy, metabolizmu hemu i żelaza, szlak HO-1 wpływa na wzrost nowotworu. Potencjalne miejsca oddziaływania szlaku hemu na metabolizm nowotworu podane są na **Rycinie 2**. Nasze badania w komórkach nienowotworowych, sugerują że HO-1 jako regulator homeostazy komórkowej może zapobiegać rozwojowi nowotworu złośliwego^{51,52},

jednakże dokładna rola i mechanizm działania HO-1 w nowotworzeniu jest wciąż słabo poznany z wieloma sprzecznymi doniesieniami w literaturze¹⁷. Nadekspresja HO-1 przeciwdziała proliferacji i zwiększa apoptozę w liniach komórkowych raka piersi⁵³. Wcześniejsze badania z użyciem nieselektywnych inhibitorów HO-1 jak ZnPP lub SnPP (pochodne hemu) wykazały znaczącą regresję wzrostu guzów. PEG-ZnPP zablokowała wzrost przez indukcję stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji śmierci apoptotycznej nowotworów implantowanych w skórze grzbietu DDY myszy bez widocznych efektów ubocznych⁵⁴, a także przyspieszyła odpowiedź na chemioterapię⁵⁵. Następnie liczne badania podkreślają przeciwnowotworowe działanie ZnPP, pomimo że jego działanie je najprawdopodobniej związane z efektami niezależnymi od HO-1⁵⁶. Laboratorium kierowane przez Prof. Dennery wykazało, że ZnPP hamuje między innymi ekspresję cykliny D1 niezależnie od aktywności HO-1⁵⁷.

HO-1 wykazuje silne przeciwproliferacyjne działanie za pośrednictwem regulacji mechanizmów antyoksydacyjnych jak wykazano w komórkach raka płuc^{53,58}. Wysoką ekspresję HO-1 skorelowano z lepszą przeżywalnością u pacjentów z rakiem jelita grubego oraz mniejszą inwazyjnością komórek guza do węzłów chłonnych⁵⁹. W przeciwieństwie do tego nadmierna ekspresja HO-1 przyspieszyła agresywność raka trzustki, zwiększając wzrost nowotworów, angiogenezę i przerzutowość⁶⁰. Ponadto, w modelu mysim nadekspresja HO-1 zwiększyła żywotność, proliferację i angiogeny potencjał komórek czerniaka, a także zwiększyła liczbę przerzutów, jednocześnie zmniejszając przeżycie myszy z nowotworem⁶¹. Podobne efekty zaobserwowano również w nowotworach żołądka⁶² czy nerek^{63,64}. Nasze badania wykazały, że zmiana ekspresji HO-1 w makrofagach hamuje wzrost, ale i zwiększa ilość przerzutów guza gruczołu krokowego (**Nemeth i wsp, Oncotarget 2015**). Rozbieżności te tłumaczy się albo różnicowym efektem HO-1 w różnych rodzajach raka, stanu metabolicznego komórek, szybkości proliferacji nowotworu lub aktywności szlaku hemu. Ponadto, w wielu tych badaniach zastosowano niespecyficzne inhibitory HO-1 jak SnPP, a zatem zastosowanie bardziej specyficznych inhibitorów HO-1 może być konieczne w celu oceny roli HO-1 w leczeniu raka.

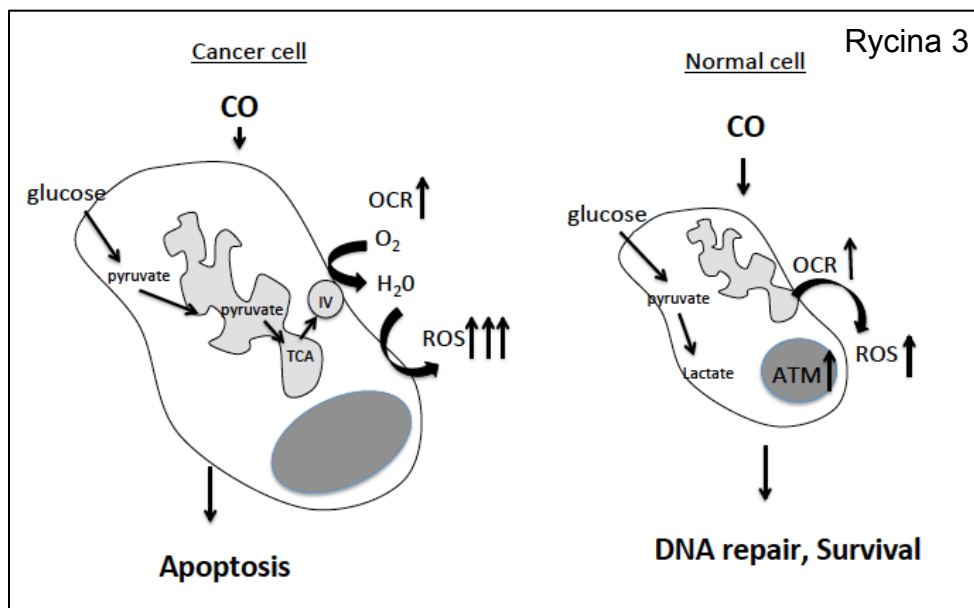
HO-1 ulega ekspresji zarówno w leukocytach jak również w komórkach nowotworowych w zależności od rodzaju nowotworu. U pacjentów cierpiących na raka gruczołu krokowego, HO-1 jest zlokalizowana w jądrze i jej ekspresja w tym przedziale komórkowym jest skorelowana gorszą przeżywalnością pacjentów^{2,65}. Nasze niepublikowane prace pokazują, że jądrowa HO-1 zwiększa wzrost komórek raka w półpłynnym agarze. Jądrową HO-1 wykryto w nowotworze płaskonabłonkowym głowy i szyi⁶⁶. Jądrowa HO-1 jest związana z opornością na leczenie z użyciem imatinibu i bortezomibu w przewlekłej białaczce⁶⁷. Zahamowanie jądrowej HO-1 zwiększyło wrażliwość komórek białaczki na bortezomib i zmniejszyło niestabilność genomową¹². U pacjentów z nowotworem gruczołu krokowego, jądrowa i enzymatycznie nieaktywna HO-1 koreluje z zaawansowaniem raka^{2, 65}, podczas gdy lepsze wskaźniki przeżycia obserwowano u pacjentów z rakiem jelita grubego, gdzie ekspresja HO-1 okrężnicy skorelowana była z mniejszą przerzutowością⁵⁹. Nadmierna ekspresja HO-1 zarówno w wrażliwych i niewrażliwych na androgen komórkach raka gruczołu krokowego prowadzi do wyraźnego zmniejszenia proliferacji i migracji komórek, które były związane z niższą ekspresją MMP-9⁶⁸. W badaniu przeprowadzonym przez Li i wsp, połączenie nadekspresji HO-1 z utratą PTEN skorelowane było ze zwiększoną złośliwością raka gruczołu krokowego⁶⁹. Istnieje również dowód istnienia polimorfizmu długości GT w promotorze HO-1, który wpływa na ekspresję HO-1 i częstość występowania raka^{70,71}. Osoby z wieloma powtórzeniami GT w promotorze HO-1 mają niską ekspresję HO-1 i większą częstość występowania raka żołądka lub gruczolakoraka płuc i raka płaskonabłonkowego jamy ustnej niż ci z krótkimi powtórzeniami GT a więc i wyższą ekspresją HO-1⁷². Jednakże wciąż konieczne są dokładniejsze badania opisujące rolę HO-1 i hemu w regulacji metabolizmu komórek nowotworowych, a co ważniejsze, uściślenia powiązań między metabolizmem hemu, wzrostem nowotworu i zużyciem energii.

4.c.2.2. Regulacja nowotworzenia przez CO

Nasze laboratorium jako pierwsze wykazało przeciwnowotworową rolę egzogenego CO w niskich dawkach w raku płuc i gruczołu krokowego². Co ciekawe, pierwsze anty-mitotyczne efekty CO zauważono już w przypadku nieprawidłowych komórek mięśni gładkich w modelu przerostu ściany naczynia, jak również aktywowanych limfocytów^{73,74}. Metabolizm takich szybko proliferujących komórek jest podobny do komórek

nowotworowych i spełnia kryteria efektu Warburga o wysokiej absorpcji glukozy i wysoki stopień glikolizy. Tak więc, moją hipotezę o tym że CO mogą blokować cykl komórek nowotworowych lub wpłynąć na wzrost guza in vivo oparty był na tych wynikach. Początkowo wykazałam, że CO blokuje cyklu komórkowy i fosforylację białka glejaka siatkówki (Rb) w komórkach raka gruczołu krokowego⁷⁵ z równoczesną indukcją uszkodzeń DNA w komórkach nowotworowych (**Węgiel i wsp, Cancer Research 2013**), w przeciwieństwie do normalnych komórek (**Otterbein i wsp, PNAS 2011**). CO gwałtownie zwiększa aktywność mitochondriów komórek rakowych, która prowadzi do wyczerpania metabolicznego powodując regresję nowotworu. Ponadto, CO zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapeutyki tysiącokrotnie, jednocześnie chroniąc komórki normalne przed apoptozą (**Węgiel i wsp, Cancer Research 2013; Otterbein i wsp, PNAS 2011**). Badania przeprowadzone przez innych potwierdziły nasze obserwacje pokazując, że CO hamuje proliferację komórek guza i angiogenezę w guzach⁷⁶. Vitek i wsp wykazali ostatnio, że CO blokuje również wzrost raka trzustki i zwiększa przeżycie myszy z tym nowotworem⁷⁶.

Komórki nowotworowe mają znacznie wyższy poziom ROS niż komórki normalne, pochodzących w dużej mierze z mitochondriów, które mogą zbliżyć się do poziomu wywołującego cytotoxycznosc⁷⁷⁻⁸⁰. CO indukuje produkcję ROS w makrofagach co prowadzi do ochrony komórek¹⁶. HO-1/CO odwraca zahamowanie biogenezy mitochondriów w odpowiedzi na adriamycynę w mysim modelu uszkodzenia serca³⁴. W przeciwieństwie do tego, w przypadku komórek nowotworowych CO zwiększa wytwarzanie ROS w celu osiągnięcia progu cytotoxycznego w komórkach nowotworowych i w ten sposób prowadzi do ich śmierci².



Rzeczywiście wzrost produkcji H₂O₂ w odpowiedzi na cytotoxyczne leki przeciwnowotworowe może powodować śmierć komórek nowotworowych, ale nie normalnych komórek⁷⁸. Tak aktywny wzrost guza wymaga selekcji komórek nowotworowych ze zmniejszoną aktywnością mitochondrialną⁸¹. CO indukuje OCR (oxygen consumption rate; szybkość zużycia tlenu) w komórkach raka gruczołu krokowego w celu zahamowanie cyklu komórkowego (**Węgiel i inni, Cancer Research 2013**). Moje badania wyraźnie wskazują, że paradoksalne zwiększenie OCR mitochondriów w komórkach nowotworowych prowadzi do nadmiernego wykorzystania glukozy z ostatecznym wycieńczeniu substratów i spadku metabolizmu prowadzącego do śmierci komórek (**Rycina 3**).

4.c.3. Kontrola odpowiedzi na uszkodzenia DNA przez HO-1 i CO

DNA musi spełniać swoje funkcje przez czas życia komórki i organizmu dlatego musi być systematycznie i wiarygodnie naprawiane. Nagromadzenie uszkodzeń DNA i mutacji w czasie pogarsza funkcję komórkową. Po określonej liczbie podziałów normalne komórki somatyczne wchodzą w stan nieodwracalnego zatrzymania wzrostu zwanego replikacyjnym starzeniem. Każdy pojedynczy nukleotyd w genomie jest podatny na uszkodzenia⁸², dlatego też regulacja homeostazy jądrowej obejmuje kilka mechanizmów i setki białek regulatorowych. Wady w szybkim wykrywaniu i prawidłowej naprawie uszkodzeń DNA (DSB, double stranded breaks) mogą prowadzić do niestabilności genomowej, raka lub przedwczesnego starzenia⁸³. Brak lub nieprawidłowa funkcja genów, które są zaangażowane w naprawę DSB (tj. ATM lub RAD50) prowadzi do

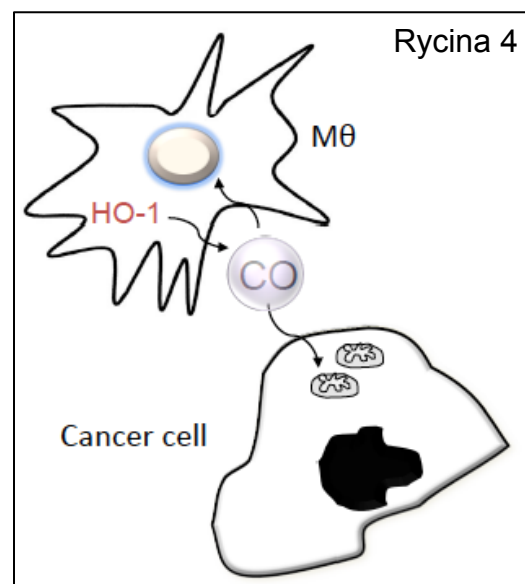
przedwczesnego starzenia się skóry lub nowotworzenia częściowo z powodu podwyższonego poziomu ROS^{82,84,85}.

W ostatnich latach stało się oczywiste, że naprawa DNA i systemy antyoksydacyjne w komórce są istotne w zwalczaniu swoistych zmian, które w przeciwnym razie prowadzić do starzenia lub raka. Zwiększenie przeżywalności *C. elegans* korelują z opornością na różne stresy środowiskowe, takie jak zmiany poziomu ROS, temperatury i promieniowania jonizującego. Kilka genów antyoksydacyjnych, w tym dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej są zaangażowane w usuwanie nadmiaru ROS i mają działanie przeciwnowotworowe i opóźniające starzenie⁸⁷. ROS są głównym źródłem trwałego uszkodzenia DNA i może przyczynić się do przyspieszonego starzenia⁸⁷. HO-1 działa pośrednio jako silny przeciwutleniacz i regulator naprawy DNA ze względu na usunięcie hemu i wytworzenie CO. Niezwiązany hem katalizuje utlenianie białek, lipidów i przyspiesza uszkodzenie DNA poprzez wzrost stresu oksydacyjnego^{88,89}. W naszej pracy wykazałam, że HO-1 działa jako centralne białko w sygnalizacji w odpowiedzi na uszkodzenie DNA utrzymaniu i stabilności genomu przez przyspieszenie naprawy DSB. DSB są rozpoznawane przez kompleks Mre11-RAD50-NBS1 (MRN), który rekrutuje ATM do miejsca uszkodzenia DNA⁹⁰ (**Otterbein i wsp, PNAS 2011**). Ponadto wykazałam, że ATM jest regulowana poprzez CO pochodzące z aktywności HO-1. Po aktywacji, ATM fosforyluje wielu białek docelowych, w tym 53BP1, kompleksu BRCA1 i MRN i Chk2, które regulują naprawę i proliferację komórek. W świetle naszych ustaleń, HO-1/CO może odgrywać istotną rolę w zapobieganiu nagromadzeniu mutacji oraz nowotworzeniu. Ponadto, HO-1/CO umożliwia ochronę normalnych komórek przed skutkami ubocznymi chemioterapii lub napromieniowania. Warto jeszcze raz podkreślić, że CO zwiększa odpowiedź na chemioterapię / naświetlanie w komórkach nowotworowych, a chroni normalne komórki przed efektami ubocznymi leczenia, dlatego może być doskonałym adiuwantem w leczeniu nowotworów.

Ze względu na różnorodność czynników które indukują HO-1 (tj. toksyny, utleniaczy, hemu, cytokiny), HO-1 może również odgrywać istotną funkcję w utrzymaniu integralności genomu w odpowiedzi na stres komórkowy. Jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję HO-1 jest Nrf2⁹¹⁻⁹³. Zarówno HO-1 jak i Nrf2 są indukowane po napromieniowaniu lub chemioterapii⁹³⁻⁹⁵. Analiza wyłączenia genu HO-1 (*Hmox1*^{-/-}) u myszy a także kilka przypadków dzieci z niedoborem HO-1 sugeruje że HO-1 jest ważną częścią w obronie organizmu przed stresem oksydacyjnym^{51,52}. Myszy *Hmox1*^{-/-} dochodzi do uszkodzenia tkanek, niedokrwistości i przewlekłego stanu zapalnego ze względu na bardzo niskie stężenie żelaza w surowicy a duże w tkankach. Fenotyp myszy *Hmox1*^{-/-} może być odwrócony przez podawanie CO^{96,97}.

4.c.4. Rola szlaku hemu w mikrośrodowiska nowotworu - rola komórek szpikowych i makrofagów w niszy nowotworu (TAM).

Komórki nowotworowe silnie wpływają na otaczające je komórki niszy i podobnie mikrośrodowisko reguluje rozwój nowotworu. Makrofagi w niszy nowotworu (TAMs) i komórki szpiku (myeloid cells) są kluczowe w rozwoju nowotworu i jego przerzutowaniu⁹⁸. TAMs i komórki supresorowe pochodzące ze szpiku (MDSC, myeloid-derived suppressor cells) są często postrzegane jako immunosupresyjne i spolaryzowane w obrębie guza. TAMs są rekrutowane do guza w celu promowania przebudowy tkanki, a ich obecność jest często ale nie zawsze związana z gorszą prognozą u pacjentów. Rekrutacja komórek szpikowych z krwi do guza, a następnie ich różnicowanie w kierunku TAMs może być korzystne i sprzyjać regresji niektórym nowotworom. Komórki odpornościowe wpływają również na komórki nowotworowe poprzez regulację procesu transformacji epitelialno-mezenchymalnej (EMT, epithelial to mesenchymal transition), zdarzenie charakteryzujące się utratą przyczepności komórka-komórka, wzmocnienia migracji i



inwazyjności oraz odporności na apoptozę^{99,100}. EMT zazwyczaj występuje w rejonach komórek inwazyjnych, gdzie też gromadzą się TAMs¹⁰¹. Indukcja HO-1 zapobiega utracie E-kadheryny i jednoczesnemu zwiększeniu ekspresji aktyny charakterystycznej dla mięśni gładkich (SMA, smooth muscle actin), a w rezultacie przyspiesza proces EMT w szczerzym zwłóknienia nerek¹⁰². W przeciwieństwie do tej obserwacji, Bang i wsp. wykazali, że zwiększona ekspresja HO-1 zmniejszyła poziom markerów EMT: E-kadheryny i SMA¹⁰³. Podobnie, indukcja HO-1 sprzyja tworzeniu kompleksu E-kadheryny- β -kateniny i silniejszemu oddziaływaniu komórka-komórka¹⁰⁴. W ostatnich pracach Gueron i wsp. wykazali że indukcja HO-1 przez hem wiąże się z wysokim poziomem E-kadheryny w raku gruczołu krokowego i prowadzi do zmniejszonej angiogenezy¹⁰⁵. W naszych badaniach byliśmy zainteresowani wpływem szlaku degradacji hemu na odpowiedź komórek odpornościowych, takich makrofagów w czasie wzrostu nowotworu (**Rycina 4**). W większości nowotworów, TAMs są spolaryzowane w kierunku proangiogennych M2 makrofagów i wykazują wysoką zdolność do fagocytozy¹⁰⁶. Natomiast M1 ('klasycznie aktywowane') makrofagi są indukowane przez endotoksyny i bakterie¹⁰⁷ oraz przez prozapalne środowisko o wysokim poziomie TNF i IL1 β ¹⁰⁶.

W naszych badaniach wykazaliśmy, że HO-1 i CO są ważnymi regulatorami różnicowania komórek mieloidalnych w dojrzałe makrofagi przez indukcję CD14 / MCSFR⁴ (**Węgiel i wsp, CDDis 2014**). CO ma silny wpływ na rekrutację^{4,27} różnicowanie⁴ i polaryzacji komórek szpiku (*Nemeth i wsp; Oncotarget 2016, w druku*). Ponadto CO i HO-1 wykazuje silne działanie przeciwzapalne¹⁰⁹ co może być czynnikiem, który blokuje przewlekłe zapalenie guza¹¹⁰. Równowaga pomiędzy sygnalizacją prozapalną a mediatorami przeciwzapalnymi jest często zakłócona podczas nowotworzenia. Niedawno wykazaliśmy, że zastosowanie CO zwiększa produkcję prozapalnych cytokin w modelu zakażenia żywymi bakteriami^{110,112}. Podobny mechanizm zwiększenia odpowiedzi immunologicznych mógłby mieć działanie przeciwrakowe jak w przypadku immunoterapii. Rzeczywiście nasze badania wskazują, że CO zwiększa odpowiedź układu immunologicznego i ta odpowiedź zależna od indukcji CD86 na komórkach mieloidalnych jest ważnym elementem zablokowania wzrostu nowotworu po aplikacji CO (*Nemeth i wsp; Oncotarget 2016, w druku*).

Nasze badania pokazały że ekspresja HO-1 ma miejsce w Marco+ makrofagach w niszy nowotworów gruczołu krokowego (**Nemeth i wsp, Oncotarget 2015**). Marco jest receptorem, który pośredniczy w fagocytozie zależnej od przeciwciał¹¹³, a tym samym może być mechanizmem, przez który HO-1 reguluje wzrost nowotworu. HO-1 w TAMs jest związana z przyspieszonym wzrostem nowotworu i przerzutów raka piersi¹¹⁴. Nasze badania wykazały, że HO-1/CO zahamowały transformację mezenchymalną poprzez regulację ekspresji E-kadheryny¹¹⁵, jednak w tym samym modelu wzrost pierwotny guza z został przyspieszony (**Nemeth i wsp, Oncotarget 2015**). Przypuszczamy, że poziom endogennego CO nie jest wystarczający do zainicjowania odpowiedzi immunologicznej przeciw nowotworowi. W tym przypadku zastosowanie egzogenego CO może przewyższyć taki niedobór. W naszym modelu nowotworu gruczołu krokowego zaobserwowaliśmy znaczącą zmianę mikrośrodowiska guza, w formie liczby komórek NK (natural killers). Ilość komórek NK była zredukowana w nowotworach w nieobecności HO-1 w makrofagach w modelu in vivo. Co ciekawe, wykazano że CO wspomaga rozwój komórek NK w macicy¹¹⁶. Komórki NK nie tylko zabijają komórki rakowe lub komórki zakażone wirusem, ale także wytwarzają cytokiny, takie jak interferon- γ (INF γ), które wpływają na wytwarzanie cytokin prozapalnych w zrębie guza. INF γ jest krytyczna dla polaryzacji makrofagów M1, które hamują wzrost guza¹¹⁷. Alternatywnie aktywowane M2 TAMs aktywują EMT w nowotworze trzustki poprzez aktywację szlaku TLR-IL-10¹¹⁸. M2 TAMs akumulowane są w nowotworze po chemioterapii i odkryto że biorą udział w nasileniu angiogenezy guza i nawrocie nowotworu¹¹⁹. Indukcja HO-1 w obszarach okołonaczyniowych po chemioterapii może wskazywać na jego rolę w odpowiedzi na leczenie. Podsumowując, nasze badania i innych naukowców sugerują potencjalną rolę HO-1 jako regulatorów nowotworzenia oraz reakcji odpowiedzi immunologicznej w nowotworach. CO bezpośrednio wpływa na komórki rakowe i mikrośrodowisko guza. Regulacja poziomu HO-1 i CO może być ważna w przypadku obecnych i przyszłych terapii przeciwnowotworowych. Ponadto, egzogenne wdychany CO lub CO pochodzący z cząsteczki uwalniającej CO (CO-RM, CO-releasing molecules) mogą być potencjalnymi adiuwantami do leczenia przeciwnowotworowego.

Główne skutki ustaleń przedstawionych w pracy dyplomowej:

W czterech oryginalnych publikacjach i jednej publikacji przeglądowej, opisałem nowe ustalenia dotyczących rozwoju nowotworów oraz szlaku degradacji hemu, które są istotnymi badaniami w dziedzinie biologii hemu ale także poza. Opisałam po raz pierwszy rolę HO-1 / CO w procesach naprawy DNA (**Otterbein i wsp, PNAS 2011**). CO może być stosowany jako adiuwant do zapobiegania leczenia skutków ubocznych chemioterapii lub radioterapii. Ponadto, przedstawiłam po raz pierwszy, że zwiększoną wrażliwość komórek nowotworowych na uszkodzenia DNA w obecności CO, ale nie normalnych komórek. Zidentyfikowałam także szczegółowy i zaskakujący mechanizm działania CO przez przejściową aktywację mitochondriów i ROS co doprowadza do wyczerpania metabolicznego w komórkach nowotworowych (**Węgiel i wsp, Cancer Research 2013**). Oznacza to, że CO mógłby być stosowany jako środek przeciwnowotworowy w połączeniu z istniejącą chemioterapią lub napromieniowaniem gdyż nie tylko blokuje wzrost nowotworów, ale również chroni zdrowe tkanki przed toksycznością i skutkami ubocznymi leczenia przeciwnowotworowego. W pracy przeglądowej podsumowałam rolę HO-1 w metabolizmie komórek (**Węgiel i wsp, ARS, 2014**). Komórki układu odpornościowego i komórki stromy stanowią więcej niż połowę objętości guza. Co ważne, HO-1 ulega ekspresji i jest aktywna enzymatycznie w tych komórkach. Ekspresja HO-1 jest szczególnie wysoka w komórkach szpikowych i makrofagach. Dlatego moje badania dotyczyły funkcji HO-1 w tej populacji komórek podczas nowotworzenia a także w modelu przeszczepu szpiku kostnego. Wykazałam, po raz pierwszy, że HO-1 i CO skutecznie zwiększają różnicowanie komórek mieloidalnych w makrofagi (**Węgiel i wsp, CDDis 2014**). Co ważniejsze, zidentyfikowałam, że HO-1 w makrofagach związanych z nowotworem może regulować proces EMT oraz wzrost nowotworu (**Nemeth i wsp Oncotarget 2015**).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Temat badawczy:

5.1. Badania nad rolą szlaku degradacji hemu w angiogenezie i biologii naczyniowej.

W moich badaniach nad rolą szlaku degradacji hemu, zdefiniowałam rolę HO-1 i CO w komórkach śródbłonka w modelu uszkodzenia naczyń tętniczych. Badania nad rolą mobilizacji komórek progenitorowych śródbłonka w odpowiedzi na CO prowadziłam podczas mojej pracy doktorskiej, a później jako członek wydziału w Bostonie. Opisałam po raz pierwszy rolę CO w proliferacji i migracji komórek śródbłonka zależnie od generacji NO i w zwiększeniu szpiku kostnego komórek progenitorowych śródbłonka ze szpiku kostnego do uszkodzonego naczynia. Dalsze badania pozwoliły na wykazanie dodatkowych mechanizmów odpowiedzialnych za efekty CO na komórkach śródbłonka. Moja studentka w laboratorium wykazała rolę CO w modelowaniu chromatyny i sygnalizacji przez szlak Rev-Erb podczas naprawy uszkodzenia w naczyniach. Badania te poparte danymi o ważną rolę HO-1 / CO w regulacji rekrutacji i różnicowania komórek szpikowych pozwoliły na zrozumienie roli CO w komórkach śródbłonka. Badania te były finansowane przez AHA Scientist Development Grant (Kierownik projektu: Węgiel B.).

Lista publikacji:

Wegiel B, Gallo D, Raman K, Karlsson J, Ozanich B, Chin BY, Tzeng E, Ahmad S, Ahmed S, Baty C, Otterbein LE. Nitric Oxide-Dependent Endothelial Progenitor Cell Mobilization by Carbon Monoxide Enhances Endothelial Repair Following Vascular Injury. *Circulation* 2010 Feb 2;121(4):537-48.

Li M, Gallo D, Csizmadia E, Otterbein LE, **Wegiel B***; Carbon monoxide induces chromatin remodeling to facilitate endothelial cell migration. *Thrombosis and Haemostasis*, 2014 Jan 30;111(5) (*corresponding)

5.2. Badania nad rolą biliwerdyny reduktazy w makrofagach.

Podczas studiów doktoranckich, wykazałam, po raz pierwszy, że BVR jest obecna w zewnętrznej błonie komórkowej makrofagów (i innych komórek), gdzie bierze udział w przekształceniu BV do BR. Fosforylacja BVR pozwala na wiązanie BVR z podjednostką p85 α 3-kinazy fosfatydyloinozytolu aktywując tym samym

kaskadę sygnałową AKT. BVR_{surf} jest silnie indukowana w obecności endotoksyn bakteryjnych (lipopolisacharydu), która inicjuje reakcję zapalną w makrofagach. Brak BVR_{surf} zmniejsza efekt ochronny BV w modelu sepsy u myszy. Prace nad BVR kontynuuję do dziś. W jednej z prac wykazaliśmy że BVR przemieszcza się do jądra po stymulacji biliwerdyną a efekt translokacji jest zależny od eNOS i produkcji NO, które nitrozyluje BVR. W jądrze BVR wiąże się z promotorem receptora TLR4, Toll-like receptor-4 w miejscach AP-1 i powoduje blokowanie transkrypcji tego czynnika prozapalnego. Jednym z mechanizmów przez który BV pośredniczy w funkcji BVR jest aktywacja fosforylacji eNOS w makrofagach przez kinazę zależną od $Ca(2+)$ /kalmoduliny. W badaniach in vivo na myszach, BV zapewnia ochronę z ostrym uszkodzeniem wątroby co zależy od dostępności NO. Badania te przyczyniły się do poznania ważnych informacji na temat sygnalizacji barwników żółciowych takich jak biliwerdyna. W ostatnich badaniach, które są przygotowywane do publikacji wykazałam że BVR jest receptorem na powierzchni komórki wiążący pozakomórkowy DNA, w szczególności mitochondrialnego DNA (mtDNA) uwalnianego z umierających komórek. Ponadto mtDNA pośredniczy sygnalizacji pro-zapalnej przez IRF3 i konkuruje z pigmentami żółciowych o wiązanie do BVR.

Lista publikacji:

Wegiel B, Baty CJ, Gallo D, Csizmadia E, Scott JR, Akhavan A, Chin BY, Kaczmarek E, Alam J, Bach FH, Zuckerbraun BS, Otterbein LE. Cell surface biliverdin reductase mediates biliverdin-induced anti-inflammatory effects via PI3K and Akt. *J Biol Chem* 2009 Aug 7;284(32):21369-78. (*highlighted in Science Stke*)

Wegiel B, Gallo D, Csizmadia E, Kaczmarek E, Rogers T, Harris C, Zuckerbraun B, Otterbein LE. Biliverdin Inhibits TLR4 Expression via Nitric Oxide-Dependent Nuclear Translocation of Biliverdin Reductase; *PNAS*, 2011; Nov 15;108(46):18849-54.

Wegiel B, Otterbein LE; Go green: anti-inflammatory role of biliverdin reductase. *Frontiers in Pharmacology*; 2012

Bisht K, **Wegiel B**, Tampe J, Neubauer O, Wagner KH, Otterbein LE, Bulmer AC. Biliverdin modulates the expression of C5aR in response to endotoxin in part via mTOR signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jun 20;449(1):94-9.

5.3. Rola szlaku degradacji hemu w trakcie sepsy i biologii makrofagów.

Jednym z moich długotrwałych zainteresowań jest translacyjna rola i mechanizmy działania niskich dawek CO oraz innych małych cząsteczek w stanach zapalnych. Niedawno odkryłam nową sygnalizację w szlaku HO-1/CO. CO działa bezpośrednio na bakterie, aby zwiększyć uwalnianie zewnątrzkomórkowej ATP. Pokazaliśmy, że makrofagi generujące CO promują produkcję ATP przez bakterie, które następnie aktywuje kompleks inflamosomu NALP3, intensyfikując zabijanie bakterii przez makrofagi. To jest pierwszy opis że, ATP może być nie tylko DAMP (danger associated molecular pattern), ale i PAMP (pathogen associated molecular pattern). Wykazałam, że CO pozwala na efektywną i skoordynowaną regulację odpowiedzi na inwazję drobnoustrojów. Odkrycia te mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia mechanizmów aktywacji Nalp3 i roli szlaku degradacji hemu w regulacji wrodzonej odporności na patogeny. Praca ta została opublikowana w *Journal of Clinical Investigations* w 2014 roku.

Lista publikacji:

Wegiel B, Larsen R, Gallo D, Chin BY, Harris C, Mannam P, Kaczmarek E, Lee P, Zuckerbraun BS, Flavell R, Soares MP and Otterbein LE. Bacterial Sensing by Macrophages Through Carbon Monoxide-Dependent Inflammasome Activation. *In press*, *Journal of Clinical Investigation*, October 8th 2014, see also an interview with Dr. Wegiel: <http://www.jci.org/posts/213>

Wegiel B, Hanto D, Otterbein LE. The social network of carbon monoxide in medicine. *Trends in Molecular Medicine*, *Trends Mol Med*. 2013 Jan;19(1):3-11 (*cover of January issue*)

Wegiel B, Hauser C, Otterbein LE, Heme as a danger molecule in pathogen recognition. FRBM in press 2015.

5.4. Rola regulatorów cyklu komórkowego w raku

Podczas pracy doktorskiej oraz post-doktoranckiej zidentyfikowałam po raz pierwszy, że cyklina A1 przyczynia się do zwiększenia ekspresji VEGF i transaktywacji sygnalizacji przez AR w raku gruczołu krokowego. Większość wyników i badań przeprowadziłam w laboratorium dr Bjartell i dr Persson na Uniwersytecie w Lund, gdzie utrzymuje wieloletnią współpracę. Opisano mechanizmy cykliny A1 raka gruczołu krokowego inwazji przez modulowanie ekspresji MMP i VEGF i interakcji z AR. Był to pierwszy mechanizm, który wyjaśnia niezależną od cyklu komórkowego rolę cykliny A1 w regulacji rozrostu i przerzutów raka gruczołu krokowego.

Wegiel B, Bjartell A, Ekberg J, Gadaleanu V, Brunhoff C, Persson J. A role for cyclin A1 in mediating the autocrine expression of VEGF in prostate cancer. *Oncogene* 2005;24:6385-6393.

Wegiel B, Bjartell A, Tumolea J, Dizeyi N, Tinzl M, Helczynski L, Nilsson E, Otterbein LE, Harkonen P, Persson JL. Multiple cellular mechanisms related to cyclin A1 in prostate cancer invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1022-1036.

Wegiel B, Bjartell A, Culig Z, Persson JL. Interleukin-6 activates PI3K/Akt signaling pathway and regulates the expression of cyclin A1 to promote tumor survival in prostate cancer. *Int J Cancer* 2008;122(7):1521-1529.

6. Wnioski końcowe i podsumowanie osiągnięć:

Powyżej zebrałam najważniejsze osiągnięcia mojej pracy naukowej, stanowiącej podstawę rozprawy habilitacyjnej i podsumowałam realizację projektów badawczych, w których brałam udział zarówno jako kierownik projektu czy wykonawca.

W ciągu ostatnich sześciu lat jako członek Wydziału Chirurgii, nie tylko założyłam moje niezależne laboratorium w Beth Israel Deaconess Medical Center na Harvard Medical School, ale także dokonałam wielu odkryć dotyczących funkcji i sygnalizacji działania enzymów degradacji hemu i ich produktów (tlenku węgla, CO; biliwerdyny, BV i bilirubiny, BR) w procesach zapalenia i nowotworzenia (patrz wywiad: <http://www.jci.org/posts/213>). Moje laboratorium jest obecnie częścią Instytutu Transplantacji oraz Instytutu Badań Raka w BIDMC / HMS. Jestem uznawana za eksperta w dziedzinie biologii hemu ze względu na opis funkcji biliwerdyny reduktazy (BVR) jako receptora w sygnalizacji na powierzchni komórki w makrofagach. Ponadto, jestem aktywnym członkiem Cancer Research Institute w BIDMC i Dana-Farber Cancer Center i uznanym naukowcem za odkrycie, że CO/HO-1 moduluje wzrost nowotworów i odpowiedź na terapie antynowotworowe. Ponadto moje badania wskazują na funkcje HO-1 i CO w modelach chorób, takich jak sepsa i uszkodzenie naczyń. Jednocześnie nadzoruję postdoków, doktorantów i studentów w pracy laboratoryjnej. Obecnie pracuję z 2 naukowcami (postdocs) w moim laboratorium.

Jestem laureatką wielu nagród a także jestem często zaproszona do przedstawienia mojej pracy na różnych konferencjach i zjazdach. Moje badania przyczyniły się do badania klinicznego wdychanego CO jako gazu terapeutycznego (obecnie w badaniach klinicznych II fazy), która dostarczyła mi rzadką okazję zobaczyć, jak badania podstawowe mają zastosowanie kliniczne. W ostatnich latach zainicjowałam również wiele współpracy szczególnie z naukowcami z BIDMC / HMS w programie o nazwie Affinity Badania Collaborative skupiającej ponad 10 naukowców z zainteresowaniem w dziedzinie raka i metabolizmu. Już na początku mojej kariery otrzymałam grant NIH EUREKA jako współbadacz z moim byłym opiekunem (Dr. Otterbein) aby badać rolę CO jako regulatora naprawy DNA i nowotworzenia. Moje badania są finansowane przez NIH. Ostatnio otrzymałam grant badawczy RO1 z Instytutu NIDDK w celu zbadania roli BVR i TLR9 w zapaleniu w wątrobie oraz ukończyłam dwuletni projekt fundowany z Instytutu NCI (R21) o roli HO-1 / CO w regulacji raka gruczołu krokowego. Moim obecnym celem jest zrozumienie roli immunomodulacyjnej enzymów degradacji hemu (HO-1 i BVR) w różnych liniach komórkowych oraz w modelach mysich *in vivo*. Działania te obejmują wiele wspólnych projektów w tym BIDMC w Bostonie, w Szwecji (pracownik naukowy na Uniwersytecie w Lund) oraz w Wielkiej Brytanii (honorowy wykładowca na Uniwersytecie Aston). Opublikowałam łącznie ponad 35 prac

(indeks h, 23, Google Scholar; a indeks h, 18, Web of Science), przy czym większość z nich jako pierwszy lub ostatni autor.

Podziękowania

Bardzo serdecznie dziękuję i doceniam ogromną pomoc ze strony Prof. Józefa Dulaka i dr hab. Agnieszki Łobody (Uniwersytet Jagielloński, Kraków), prof. Katarzyny Koziak (Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa), dr Elżbiety Kaczmarek, a także ze strony dr Kenneth Swanson (BIDMC, HMS, Boston) w trakcie pisania tej pracy za wsparcie i edycję tekstu. Jestem ogromnie wdzięczna mojej rodzinie za ciągłe wsparcie. Ta praca nie mogła być dokonana bez hojnego wsparcia ze strony prof. Elliot Chaikof (Chairman, Department of Surgery), a także finansowania z NIH (NIDDK 1R01DK104714-01A1, NCI 1R21CA169904-01), American Heart Association 10SDG2640091, funduszy z Zakładu Chirurgii w BIDMC i Fundacji Eleanor Shore HMS .

7. Bibliografia (prace stanowiące podstawę habilitacji podkreślono).

- 1 Otterbein, L. E. *et al.* Heme oxygenase-1 and carbon monoxide modulate DNA repair through ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14491-14496, doi:10.1073/pnas.1102295108 (2011).
- 2 Wegiel, B. *et al.* Carbon monoxide expedites metabolic exhaustion to inhibit tumor growth. *Cancer research* **73**, 7009-7021, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1075 (2013).
- 3 Wegiel, B., Nemeth, Z., Correa-Costa, M., Bulmer, A. C. & Otterbein, L. E. Heme oxygenase-1: a metabolic nuke. *Antioxidants & redox signaling* **20**, 1709-1722, doi:10.1089/ars.2013.5667 (2014).
- 4 Wegiel, B. *et al.* Heme oxygenase-1 derived carbon monoxide permits maturation of myeloid cells. *Cell death & disease* **5**, e1139, doi:10.1038/cddis.2014.97 (2014).
- 5 Nemeth, Z. *et al.* Heme oxygenase-1 in macrophages controls prostate cancer progression. *Oncotarget* **6**, 33675-33688, doi:10.18632/oncotarget.5284 (2015).
- 6 Maines, M. D. & Kappas, A. Cobalt induction of hepatic heme oxygenase; with evidence that cytochrome P-450 is not essential for this enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 4293-4297 (1974).
- 7 Rotenberg, M. O. & Maines, M. D. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding rat heme oxygenase-2. *The Journal of biological chemistry* **265**, 7501-7506 (1990).
- 8 Ewing, J. F. & Maines, M. D. In situ hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain: Differential distribution of isozyme 1 and 2. *Mol Cell Neurosci* **3**, 559-570 (1992).
- 9 Biswas, C. *et al.* Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses. *The Journal of biological chemistry* **289**, 26882-26894, doi:10.1074/jbc.M114.567685 (2014).
- 10 Lin, Q. *et al.* Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **282**, 20621-20633 (2007).
- 11 Tibullo, D. *et al.* Nuclear translocation of heme oxygenase-1 confers resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia cells. *Curr Pharm Des* **19**, 2765-2770 (2013).
- 12 Tibullo, D. *et al.* Heme oxygenase-1 nuclear translocation regulates bortezomib-induced cytotoxicity and mediates genomic instability in myeloma cells. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.7563 (2016).
- 13 Bach, F. H. Heme oxygenase-1 as a protective gene. *Wiener klinische Wochenschrift*. **114**, 1-3 (2002).
- 14 Ryter, S. W. & Choi, A. M. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Transl Res* **167**, 7-34, doi:10.1016/j.trsl.2015.06.011 (2016).
- 15 Wegiel, B., Hauser, C. J. & Otterbein, L. E. Heme as a danger molecule in pathogen recognition. *Free Radic Biol Med* **89**, 651-661, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.020 (2015).
- 16 Chin, B. Y. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 α stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5109-5114 (2007).
- 17 Jozkowicz, A., Was, H. & Dulak, J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxidants & redox signaling* **9**, 2099-2117, doi:10.1089/ars.2007.1659 (2007).

- 18 Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M. F., Person, M. D. & Paull, T. T. ATM activation by oxidative stress. *Science* **330**, 517-521, doi:330/6003/517 [pii] 10.1126/science.1192912.
- 19 Otterbein, L. E., Soares, M. P., Yamashita, K. & Bach, F. H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in immunology*. **24**, 449-455 (2003).
- 20 Sarady-Andrews, J. K. *et al.* Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. **289**, L1131-1137 (2005).
- 21 Sarady, J. K. *et al.* Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **18**, 854-856 (2004).
- 22 Otterbein, L. E., Mantell, L. L. & Choi, A. M. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* **276**, L688-694 (1999).
- 23 Motterlini, R. & Otterbein, L. E. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 728-743, doi:nrd3228 [pii] 10.1038/nrd3228.
- 24 Otterbein, L. E. Carbon monoxide: innovative anti-inflammatory properties of an age-old gas molecule. *Antioxidants & redox signaling*. **4**, 309-319 (2002).
- 25 D'Amico, G., Lam, F., Hagen, T. & Moncada, S. Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide. *J Cell Sci* **119**, 2291-2298, doi:10.1242/jcs.02914 (2006).
- 26 Almeida, A. S., Figueiredo-Pereira, C. & Vieira, H. L. Carbon monoxide and mitochondria-modulation of cell metabolism, redox response and cell death. *Front Physiol* **6**, 33, doi:10.3389/fphys.2015.00033 (2015).
- 27 Wegiel, B. *et al.* Nitric oxide-dependent bone marrow progenitor mobilization by carbon monoxide enhances endothelial repair after vascular injury. *Circulation* **121**, 537-548, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.887695 (2010).
- 28 Cheng, Y., Mitchell-Flack, M. J., Wang, A. & Levy, R. J. Carbon monoxide modulates cytochrome oxidase activity and oxidative stress in the developing murine brain during isoflurane exposure. *Free Radic Biol Med* **86**, 191-199, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.029 (2015).
- 29 Piantadosi, C. A. Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **45**, 562-569, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.013 (2008).
- 30 Kim, H. S., Loughran, P. A., Rao, J., Billiar, T. R. & Zuckerbraun, B. S. Carbon monoxide activates NF-kappaB via ROS generation and Akt pathways to protect against cell death of hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G146-G152, doi:10.1152/ajpgi.00105.2007 (2008).
- 31 Zuckerbraun, B. S. *et al.* Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J* **21**, 1099-1106, doi:10.1096/fj.06-6644com (2007).
- 32 Almeida, A. S., Queiroga, C. S., Sousa, M. F., Alves, P. M. & Vieira, H. L. Carbon monoxide modulates apoptosis by reinforcing oxidative metabolism in astrocytes: role of Bcl-2. *The Journal of biological chemistry* **287**, 10761-10770, doi:10.1074/jbc.M111.306738 (2012).
- 33 Queiroga, C. S., Almeida, A. S. & Vieira, H. L. Carbon monoxide targeting mitochondria. *Biochem Res Int* **2012**, 749845, doi:10.1155/2012/749845 (2012).
- 34 Suliman, H. B. *et al.* The CO/HO system reverses inhibition of mitochondrial biogenesis and prevents murine doxorubicin cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation* **117**, 3730-3741 (2007).
- 35 Kaczara, P. *et al.* Carbon monoxide released by CORM-401 uncouples mitochondrial respiration and inhibits glycolysis in endothelial cells: A role for mitoBKCa channels. *Biochim Biophys Acta* **1847**, 1297-1309, doi:10.1016/j.bbabi.2015.07.004 (2015).
- 36 Ahlstrom, K. *et al.* Metabolic responses in ischemic myocardium after inhalation of carbon monoxide. *Acta Anaesthesiol Scand* **53**, 1036-1042, doi:10.1111/j.1399-6576.2009.01992.x (2009).
- 37 Wegiel, B., Chin, B. Y. & Otterbein, L. E. Inhale to survive, cycle or die? Carbon monoxide and cellular proliferation. *Cell Cycle* **7**, 1379-1384 (2008).
- 38 Levine, A. J. & Puzio-Kuter, A. M. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* **330**, 1340-1344, doi:10.1126/science.1193494 (2010).

- 39 Warburg, O. Iron, the Oxygen-Carrier of Respiration-Ferment. *Science* **61**, 575-582, doi:10.1126/science.61.1588.575 (1925).
- 40 Koppenol, W. H., Bounds, P. L. & Dang, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* **11**, 325-337, doi:10.1038/nrc3038 (2011).
- 41 He, Y. *et al.* Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* **464**, 610-614, doi:10.1038/nature08802 (2010).
- 42 Sanchez-Arago, M., Chamorro, M. & Cuezva, J. M. Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis* **31**, 567-576, doi:10.1093/carcin/bgq012 (2010).
- 43 Oberley, L. W. & Buettner, G. R. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer research* **39**, 1141-1149 (1979).
- 44 Bize, I. B., Oberley, L. W. & Morris, H. P. Superoxide dismutase and superoxide radical in Morris hepatomas. *Cancer research* **40**, 3686-3693 (1980).
- 45 Spitz, D. R., Sim, J. E., Ridnour, L. A., Galoforo, S. S. & Lee, Y. J. Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism? *Ann N Y Acad Sci* **899**, 349-362 (2000).
- 46 Ahmad, I. M. *et al.* Mitochondrial O₂⁻ and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **280**, 4254-4263, doi:10.1074/jbc.M411662200 (2005).
- 47 Aykin-Burns, N., Ahmad, I. M., Zhu, Y., Oberley, L. W. & Spitz, D. R. Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem J* **418**, 29-37, doi:10.1042/BJ20081258 (2009).
- 48 Gozzelino, R., Jeney, V. & Soares, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**, 323-354, doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105600 (2010).
- 49 Tenhunen, R., Marver, H. S. & Schmid, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **61**, 748-755 (1968).
- 50 Tenhunen, R., Marver, H. S. & Schmid, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *The Journal of biological chemistry*. **244**, 6388-6394 (1969).
- 51 Poss, K. D. & Tonegawa, S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**, 10919-10924 (1997).
- 52 Yachie, A. *et al.* Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *The Journal of clinical investigation*. **103**, 129-135 (1999).
- 53 Hill, M. *et al.* Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *Faseb J* **19**, 1957-1968 (2005).
- 54 Fang, J. *et al.* In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer research* **63**, 3567-3574 (2003).
- 55 Fang, J., Sawa, T., Akaike, T., Greish, K. & Maeda, H. Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int J Cancer* **109**, 1-8, doi:10.1002/ijc.11644 (2004).
- 56 Hirai, K., Sasahira, T., Ohmori, H., Fujii, K. & Kuniyasu, H. Inhibition of heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin IX reduces tumor growth of LL/2 lung cancer in C57BL mice. *Int J Cancer* **120**, 500-505, doi:10.1002/ijc.22287 (2007).
- 57 La, P. *et al.* Zinc protoporphyrin regulates cyclin D1 expression independent of heme oxygenase inhibition. *The Journal of biological chemistry* **284**, 36302-36311, doi:10.1074/jbc.M109.031641 (2009).
- 58 Lin, C. W., Shen, S. C., Hou, W. C., Yang, L. Y. & Chen, Y. C. Heme oxygenase-1 inhibits breast cancer invasion via suppressing the expression of matrix metalloproteinase-9. *Mol Cancer Ther* **7**, 1195-1206, doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-2199 (2008).
- 59 Becker, J. C. *et al.* Colonic expression of heme oxygenase-1 is associated with a better long-term survival in patients with colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* **42**, 852-858 (2007).
- 60 Sunamura, M. *et al.* Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis* **6**, 15-24 (2003).

- 61 Was, H. *et al.* Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *Am J Pathol* **169**, 2181-2198 (2006).
- 62 Yin, Y. *et al.* Expression and function of heme oxygenase-1 in human gastric cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* **237**, 362-371, doi:10.1258/ebm.2011.011193 (2012).
- 63 Banerjee, P. *et al.* The heme oxygenase-1 protein is overexpressed in human renal cancer cells following activation of the Ras-Raf-ERK pathway and mediates anti-apoptotic signal. *The Journal of biological chemistry* **286**, 33580-33590, doi:10.1074/jbc.M111.248401 (2011).
- 64 Banerjee, P. *et al.* Heme Oxygenase-1 Promotes Survival of Renal Cancer Cells through Modulation of Apoptosis- and Autophagy-regulating Molecules. *The Journal of biological chemistry* **287**, 32113-32123, doi:10.1074/jbc.M112.393140 (2012).
- 65 Sacca, P. *et al.* Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. *Br J Cancer* **97**, 1683-1689 (2007).
- 66 Gandini, N. A. *et al.* Nuclear localization of heme oxygenase-1 is associated with tumor progression of head and neck squamous cell carcinomas. *Exp Mol Pathol* **93**, 237-245, doi:10.1016/j.yexmp.2012.05.001 (2012).
- 67 Tibullo, D. *et al.* Nuclear translocation of heme oxygenase-1 confers resistance to Imatinib in chronic myeloid leukemia cells. *Curr Pharm Des* (2012).
- 68 Gueron, G. *et al.* Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* **7**, 1745-1755, doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0325 (2009).
- 69 Li, Y. *et al.* PTEN deletion and heme oxygenase-1 overexpression cooperate in prostate cancer progression and are associated with adverse clinical outcome. *The Journal of pathology* **224**, 90-100, doi:10.1002/path.2855 (2011).
- 70 Kikuchi, A. *et al.* Association of susceptibility to the development of lung adenocarcinoma with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism. *Hum Genet* **116**, 354-360 (2005).
- 71 Chang, K. W. *et al.* Polymorphism in heme oxygenase-1 (HO-1) promoter is related to the risk of oral squamous cell carcinoma occurring on male areca chewers. *Br J Cancer* **91**, 1551-1555 (2004).
- 72 Lo, S. S. *et al.* Heme Oxygenase-1 Gene Promoter Polymorphism is Associated with Risk of Gastric Adenocarcinoma and Lymphovascular Tumor Invasion. *Ann Surg Oncol* **14**, 2250-2256 (2007).
- 73 Morita, T., Mitsialis, S. A., Koike, H., Liu, Y. & Kourembanas, S. Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **272**, 32804-32809 (1997).
- 74 Song, R. *et al.* Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells. *The Journal of biological chemistry* **279**, 44327-44334, doi:10.1074/jbc.M406105200 (2004).
- 75 Węgiel, B., Chin, B. Y. & Otterbein, L. E. Inhale to survive, cycle or die? Carbon monoxide and cellular proliferation. *Cell Cycle* **7** (2008).
- 76 Vitek, L. *et al.* Antiproliferative effects of carbon monoxide on pancreatic cancer. *Dig Liver Dis* **46**, 369-375, doi:10.1016/j.dld.2013.12.007 (2014).
- 77 Schumacker, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* **10**, 175-176, doi:S1535-6108(06)00255-8 [pii] 10.1016/j.ccr.2006.08.015 (2006).
- 78 Laurent, A. *et al.* Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer research* **65**, 948-956, doi:65/3/948 [pii] (2005).
- 79 Chandel, N. S. & Schumacker, P. T. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol* **88**, 1880-1889 (2000).
- 80 Szatrowski, T. P. & Nathan, C. F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer research* **51**, 794-798 (1991).
- 81 Sanchez-Arago, M., Chamorro, M. & Cuezva, J. M. Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis* **31**, 567-576, doi:bgq012 [pii] 10.1093/carcin/bgq012.
- 82 Lombard, D. B. *et al.* DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* **120**, 497-512, doi:S0092-8674(05)00102-9 [pii]

- 10.1016/j.cell.2005.01.028 (2005).
- 83 Chen, J. H., Hales, C. N. & Ozanne, S. E. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res* **35**, 7417-7428 (2007).
- 84 Barzilai, A., Rotman, G. & Shiloh, Y. ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **1**, 3-25 (2002).
- 85 Ito, K. *et al.* Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **431**, 997-1002 (2004).
- 86 Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 44-84, doi:S1357-2725(06)00219-6 [pii] 10.1016/j.biocel.2006.07.001 (2007).
- 87 Balaban, R. S., Nemoto, S. & Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495 (2005).
- 88 Soares, M. P. & Bach, F. H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends in molecular medicine* **15**, 50-58 (2009).
- 89 Kumar, S. & Bandyopadhyay, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* **157**, 175-188 (2005).
- 90 Harper, J. W. & Elledge, S. J. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**, 739-745 (2007).
- 91 Srisook, K., Kim, C. & Cha, Y. N. Molecular mechanisms involved in enhancing HO-1 expression: de-repression by heme and activation by Nrf2, the "one-two" punch. *Antioxidants & redox signaling* **7**, 1674-1687 (2005).
- 92 Alam, J. *et al.* Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing Nrf2. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F743-752 (2003).
- 93 Hirota, A. *et al.* Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: protective role in UVA-induced apoptosis. *J Invest Dermatol* **124**, 825-832, doi:JID23670 [pii] 10.1111/j.0022-202X.2005.23670.x (2005).
- 94 Risom, L., Moller, P., Vogel, U., Kristjansen, P. E. & Loft, S. X-ray-induced oxidative stress: DNA damage and gene expression of HO-1, ERCC1 and OGG1 in mouse lung. *Free Radic Res* **37**, 957-966 (2003).
- 95 Reeve, V. E. & Tyrrell, R. M. Heme oxygenase induction mediates the photoimmunoprotective activity of UVA radiation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9317-9321 (1999).
- 96 Chora, A. A. *et al.* Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *The Journal of clinical investigation* **117**, 438-447 (2007).
- 97 Chung, S. W., Liu, X., Macias, A. A., Baron, R. M. & Perrella, M. A. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. *The Journal of clinical investigation* **118**, 239-247 (2008).
- 98 Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* **42**, 717-727, doi:S0959-8049(06)00040-2 [pii] 10.1016/j.ejca.2006.01.003 (2006).
- 99 Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* **119**, 1420-1428, doi:10.1172/JCI39104 (2009).
- 100 Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704-715, doi:10.1016/j.cell.2008.03.027 (2008).
- 101 Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology* **11**, 889-896, doi:10.1038/ni.1937 (2010).
- 102 Shin, D. H. *et al.* The NRF2-heme oxygenase-1 system modulates cyclosporin A-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Free radical biology & medicine* **48**, 1051-1063, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.021 (2010).
- 103 Bang, K. *et al.* Heme oxygenase-1 attenuates epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells. *Clinical and experimental nephrology* **17**, 284-293, doi:10.1007/s10157-012-0699-y (2013).
- 104 Gueron, G. *et al.* Heme-oxygenase-1 implications in cell morphology and the adhesive behavior of prostate cancer cells. *Oncotarget* (2014).

- 105 Gueron, G. *et al.* Heme-oxygenase-1 implications in cell morphology and the adhesive behavior of prostate cancer cells. *Oncotarget* **5**, 4087-4102 (2014).
- 106 Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* **122**, 787-795, doi:10.1172/JCI59643 (2012).
- 107 Benoit, M., Desnues, B. & Mege, J. L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* **181**, 3733-3739 (2008).
- 108 Lehn, S. *et al.* Down-regulation of the oncogene cyclin D1 increases migratory capacity in breast cancer and is linked to unfavorable prognostic features. *The American journal of pathology* **177**, 2886-2897, doi:10.2353/ajpath.2010.100303 (2010).
- 109 Otterbein, L. E. *et al.* Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature medicine*. **6**, 422-428 (2000).
- 110 Wegiel, B., Hanto, D. W. & Otterbein, L. E. The social network of carbon monoxide in medicine. *Trends in molecular medicine* **19**, 3-11, doi:10.1016/j.molmed.2012.10.001 (2013).
- 112 Wegiel, B. *et al.* Macrophages sense and kill bacteria through carbon monoxide-dependent inflammasome activation. *The Journal of clinical investigation* **124**, 4926-4940, doi:10.1172/JCI72853 (2014).
- 113 Gul, N. *et al.* Macrophages eliminate circulating tumor cells after monoclonal antibody therapy. *The Journal of clinical investigation* **124**, 812-823, doi:10.1172/JCI66776 (2014).
- 114 Deng, R. *et al.* Inhibition of tumor growth and alteration of associated macrophage cell type by an HO-1 inhibitor in breast carcinoma-bearing mice. *Oncology research* **20**, 473-482 (2013).
- 115 Nemeth Z, L. M., Csizmadia E, Dome B, Johansson M, Persson JL, Seth P, Otterbein LE, Wegiel B. Heme oxygenase-1 in macrophages controls prostate cancer progression. . *Oncotarget* (2015 in press).
- 116 Linzke, N., Schumacher, A., Woidacki, K., Croy, B. A. & Zenclussen, A. C. Carbon monoxide promotes proliferation of uterine natural killer cells and remodeling of spiral arteries in pregnant hypertensive heme oxygenase-1 mutant mice. *Hypertension* **63**, 580-588, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02403 (2014).
- 117 Liu, L., Yue, Y. & Xiong, S. NK-derived IFN-gamma/IL-4 triggers the sexually disparate polarization of macrophages in CVB3-induced myocarditis. *Journal of molecular and cellular cardiology* **76**, 15-25, doi:10.1016/j.yjmcc.2014.07.021 (2014).
- 118 Liu, C. Y. *et al.* M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **93**, 844-854, doi:10.1038/labinvest.2013.69 (2013).
- 119 Hughes, R. *et al.* Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy. *Cancer research* **75**, 3479-3491, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3587 (2015).