

AUTOREFERAT



DR N. BIOL. MAŁGORZATA CZYSTOWSKA-KUŹMICZ

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Spis treści

1.	Życiorys i podsumowanie pracy zawodowej	3
1.1.	Imię i nazwisko	3
1.2.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	3
1.3.	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
2.	Analiza bibliometryczna dorobku naukowego	4
3.	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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311).....	4
3.1.	Prace oryginalne	4
3.2.	Praca pogładowa.....	5
3.3.	Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	6
4.	Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową	24
5.1.	Działalność organizacyjna, dydaktyczna i popularyzująca naukę.....	29
5.1.	Działalność dydaktyczna.....	29
5.2.	Działalność organizacyjna, popularyzująca naukę.....	30
6.	Współpraca międzynarodowa	31
7.	Nagrody i wyróżnienia	31

1. Życiorys i podsumowanie pracy zawodowej

1.1 Imię i nazwisko

Małgorzata Czystowska-Kuźmicz

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

2006: stopień doktora nauk biologicznych, „magna cum laude”

Wydział Matematyczny oraz Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Heinrich-Heine Düsseldorf, Düsseldorf, Niemcy

Data obrony - 03 lutego 2006

Tytuł rozprawy doktorskiej: “Molecular characterization of tumor-associated genes in gynaecological tumors”

2001: tytuł magistra biologii, specjalność biologia molekularna

Wydział Matematyczny oraz Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Heinrich-Heine Düsseldorf, Düsseldorf, Niemcy

Data obrony - 19 września 2002

Tytuł: „Funkcja heptahelikalnego receptora HC110-R z pasożytniczego nicienia *Haemonchus contortus*”

1.3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

2019-obecnie: adiunkt naukowy w Katedrze i Zakładzie Biochemii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

2016 – 2019: adiunkt naukowy w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, kierownik projektów badawczych finansowanych przez NCN

2013 – 2016: pracownik naukowy w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, uczestnik stażu podoktorskiego w multidyscyplinarnym programie BASTION, finansowanym w ramach 7 Programu Ramowego UE

2010-2012: przerwa w karierze naukowej – urlop macierzyński i wychowawczy

2006 – 2009: staż podoktorski (post-doc), Department of Pathology, University of Pittsburgh Cancer Institute (UPMC), Pennsylvania, USA

Opiekun: prof. Theresa L. Whiteside

2001 – 2006: doktorat, asystent naukowy w Laboratorium Molekularno-Genetycznym Oddziału Położniczo-Ginekologicznego Kliniki przy Uniwersytecie Heinrich-Heine w Düsseldorfie, Niemcy

1998-2000: pomoc naukowa w Instytucie Diagnostyki Transplantologicznej i Terapii Komórkowej Uniwersytetu Heinrich-Heine w Niemczech

2. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego

Liczba publikacji: 20 prac w tym 14 oryginalnych i 6 prac przeglądowych

1 rozdział w monografii zagranicznej

Sumaryczny impact factor: 116,308

Sumaryczna liczba punktów MEiN: 1294

Liczba cytowań z bazy Scopus (bez autocytacji) z dn.06.06.22 : 1700

Liczba cytowań z bazy Web of Science (bez autocytacji) z dn.06.06.22 : 1633

Indeks H (Scopus) z dn. 14

Indeks Hirscha z bazy Web of Science: 15

3. Wskazanie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie osiągnięć o których mowa w z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r.

Tytuł osiągnięcia: MECHANIZMY IMMUNOSUPRESJI W NOWOTWORACH – ROLA MIKROPEČHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl **5 prac oryginalnych** dotyczących badań nad wybranymi mechanizmami immunosupresji indukowanej przez mikropęcherzyki zewnątrzkomórkowe i egzosomy pochodzenia nowotworowego oraz nad metodami charakteryzacji tych mikropęcherzyków, a także **1 praca pogładowa** opisująca rolę mikropęcherzyków pochodzenia nowotworowego w diagnostyce, prognozie i immunoterapii chorób nowotworowych

Sumaryczny Impact Factor cyklu publikacji = 43,243

3.1. Prace oryginalne:

- 1) **Czystowska-Kuzmicz M**, Sosnowska A, Nowis D, Ramji K, Szajnik M, Chlebowska-Tuz J, Wolinska E, Gaj P, Grazul M, Pilch Z, Zerrouqi A, Graczyk-Jarzynka A, Soroczynska K, Cierniak S, Koktysz R, Elishaev E, Gruca S, Stefanowicz A, Blaszczyk R, Borek B, Gzik A, Whiteside T, Golab J.

Small extracellular vesicles containing arginase-1 suppress T-cell responses and promote tumor growth in ovarian carcinoma.

Nat Commun. 2019;10(1):3000.

IF: 12,121 Liczba cytowań wg. Scopus z dn. 06.06.22: 98

Merytoryczny wkład w powstanie pracy: koncepcja badania, izolacja EVs z materiału od pacjentów, wykonanie większości badań in vitro, opracowanie i interpretacja danych, zebranie i interpretacja piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu, poprawa manuskryptu zgodnie z wymaganiami recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

- 2) Długolecka M, Szymanski J, Zareba L, Homoncik Z, Domagała-Kulawik J, Polubiec-Kownacka M, **Czystowska-Kuzmicz M. (autor korespondencyjny)**. Characterization of Extracellular Vesicles from Bronchoalveolar Lavage Fluid and Plasma of Patients with Lung Lesions Using Fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis

Cells 2021;10(12):3473

IF: 6,600 Liczba cytowań wg. Scopus z dn. 06.06.22: 0

Merytoryczny wkład w powstanie pracy: koncepcja badania, planowanie, koordynacja i nadzór nad zadaniami badawczymi, udział w opracowaniu i interpretacji danych, zebranie i interpretacja piśmiennictwa, udział w przygotowaniu i poprawie manuskryptu, korespondencja z recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

- 3) **Czystowska M**, Han J, Szczepanski MJ, Szajnik M, Quadrini K, Brandwein H, Hadden JW, Signorelli K, Whiteside TL.

IRX-2, a novel immunotherapeutic, protects human T cells from tumor-induced cell death.

Cell Death Differ. 2009;16(5):708-18

IF: 8,240 Liczba cytowań wg. Scopus z dn. 06.06.22: 51

Merytoryczny wkład w powstanie pracy: wykonanie większości badań biochemicznych i funkcjonalnych, opracowanie i interpretacja danych, zebranie i interpretacja piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu, poprawa manuskryptu zgodnie z wymaganiami recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- 4) **Czystowska M**, Szczepanski MJ, Szajnik M, Quadrini K, Brandwein H, Hadden JW, Whiteside TL. Mechanisms of T-cell protection from death by IRX-2: a new immunotherapeutic.

Cancer Immunol Immunother. 2011;60(4):495-506.

IF: 3,701 Liczba cytowań wg. Scopus z dn. 06.06.22: 22

Merytoryczny wkład w powstanie pracy: koncepcja badań, wykonanie większości badań biochemicznych i funkcjonalnych, opracowanie i interpretacja danych, zebranie i interpretacja piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu, poprawa manuskryptu zgodnie z wymaganiami recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

5) **Czystowska M**, Gooding W, Szczepanski MJ, Lopez-Abaitero A, Ferris RL, Johnson JT, Whiteside TL.

The immune signature of CD8(+)CCR7(+) T cells in the peripheral circulation associates with disease recurrence in patients with HNSCC.

Clin Cancer Res. 2013;19(4):889-899

IF: 8,193 **Liczba cytowań wg. Scopus z dn. 06.06.22: 37**

Merytoryczny wkład w powstanie pracy: wykonanie większości badań cytometrii przepływowej, współudział w opracowaniu i interpretacji danych, zebranie i interpretacja piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu, poprawa manuskryptu zgodnie z wymaganiami recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

3.2. Praca poglądowa:

Czystowska-Kuzmicz M, Whiteside TL. The potential role of tumor-derived exosomes in diagnosis, prognosis, and response to therapy in cancer. Expert Opin Biol Ther. 2021;21(2):241-258.

IF: 4,388 **Liczba cytowań wg. Scopus z dn. 06.06.22: 13**

Merytoryczny wkład w powstanie pracy: koncepcja i układ pracy, zebranie i interpretacja większości piśmiennictwa, przygotowanie podrozdziałów 3,5,6, przygotowanie tabel, udział w redagowaniu całego manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%

3.3. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Główne cele prowadzonych badań w ramach przedstawionego cyklu:

1. Zbadanie molekularnych mechanizmów apoptozy limfocytów T indukowanych przez mikropęcherzyki zewnątrzkomórkowe oraz ocena skuteczności immunoterapii cytokinowej in vitro (publikacje 1, 2)
2. Ocena potencjału diagnostycznego i prognostycznego profilu immunologicznego i stopnia apoptozy limfocytów CD8+ na przykładzie nowotworu głowy i szyi (publikacja 3)
3. Identyfikacja nowych mechanizmów immunosupresji indukowanych przez małe mikropęcherzyki zewnątrzkomórkowe (egzosomy): zbadanie roli arginaz pochodzenia egzosomalnego w immunosupresji w raku jajnika (publikacja 4)
4. Wdrożenie i optymalizacja najnowszych technik badawczych do oceny ilościowej i fenotypowania molekularnego mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych w immuno-onkologii (publikacja 5)
5. Rola mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych i egzosomów w diagnostyce, prognostyce i immunoterapii nowotworów (publikacja 6 – praca przeglądowa)

3.3.1. Wprowadzenie

Mechanizmy immunoedycji i ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego

Zdolność układu immunologicznego do rozpoznania i zwalczania rozwijającego się nowotworu jest dyskutowana i badana już od dziesięcioleci. W licznych badaniach *in vivo* oraz z udziałem pacjentów dowiedziono, że układ immunologiczny jest w stanie specyficznie rozpoznać i wyeliminować komórki nowotworowe na podstawie wytwarzanych przez nie antygenów nowotworowych lub cząsteczek indukowanych w wyniku stresu komórkowego. Proces ten, zwany nadzorem immunologicznym nad nowotworem (ang. *tumor immune surveillance*), eliminuje komórki nowotworowe na wczesnym etapie rozwoju nowotworu, kiedy jeszcze nie ma klinicznych objawów choroby. Etap ten jednak zazwyczaj przechodzi w dalszy etap równowagi i uśpienia nowotworu, kiedy to komórki nowotworowe i komórki układu immunologicznego osiągają stan dynamicznej równowagi i trzymają się nawzajem w ryzach, a nowotwór nie jest całkowicie usuwany. Presja układu immunologicznego w tej fazie kontroluje dalszy rozrost nowotworu jeszcze przez jakiś czas, jednak w większości przypadków prowadzi ostatecznie do selekcji takich wariantów komórek nowotworowych, które mają zdolność unikania lub zahamowania przeciw-nowotworowej odpowiedzi immunologicznej [1]. Komórki te stosują różnorodne i niezwykle skuteczne strategie obronne, często wykorzystując przy tym naturalne mechanizmy regulacyjne odporności wrodzonej czy nabytej. W efekcie dochodzi do tzw. ucieczki nowotworu (ang. *tumor escape*) spod nadzoru immunologicznego.

Te dynamiczne relacje pomiędzy nowotworem a układem odpornościowym zostały w roku 2004 ujęte w tzw. teorię immunoedycji nowotworów przez Dunn i wsp. [2]. W ostatnich latach uznano, że mechanizmy ucieczki guza spod nadzoru immunologicznego mogą być podstawową przyczyną odporności nowotworów na stosowane immunoterapie i przyczyną niskiego odsetka pacjentów onkologicznych odpowiadających na leczenie szczepionkami przeciwnowotworowymi, zawierającymi np. antygeny nowotworowe. Z drugiej strony spektakularne efekty immunoterapii ukierunkowanych na tzw. immunologiczne punkty kontrolne, osiągnięte w ostatnich latach w leczeniu niektórych nowotworów niezbiecie dowodzą, że ingerencja w szlaki tłumiące reakcje immunologiczne może być bardziej skuteczna niż dodatkowa, niezbyt specyficzna stymulacja mechanizmów efektorowych limfocytów, zwłaszcza w przypadku nowotworów u których immunosupresyjne mikrośrodowisko jest wyjątkowo silnie ukształtowane. Terapie celowane, blokujące aktywność szlaków hamujących odpowiedź immunologiczną, mogą okazać się całkiem nowym i skutecznym sposobem na przywrócenie pełnego potencjału immunoterapii [3].

Mechanizmów immunoedycji wykorzystywanych przez nowotwór jest wiele i obejmują one takie procesy jak: obniżenie ekspresji antygenów nowotworowych lub ekspresji cząsteczek MHC służących do ich prezentacji, wytwarzanie immunosupresyjnych cytokin i enzymów oraz rekrutację do mikrośrodowiska guza limfocytów T regulatorowych (Treg) czy mieloidalnych komórek supresorowych (MDSC), które inaktywują cytotoksyczne limfocyty T. Najistotniejszym jednak mechanizmem ucieczki pod kątem ingerencji w stosowane nowoczesne terapie jest przejęcie przez komórki nowotworowe fizjologicznego mechanizmu tolerancji i autoregulacji odpowiedzi immunologicznej, niedopuszczającego do rozwoju chorób autoimmunologicznych. Komórki guza ekspozują przy tym na swojej powierzchni ligandy, które łączą się z odpowiednimi receptorami na powierzchni limfocytów T,

tw, immunologicznymi punktami kontrolnymi (ang. *immune checkpoints*), hamując odpowiedź immunologiczną. Prowadzi to do anergii i stanu „wyczerpania” limfocytów T, które mimo rozpoznania antygenów nowotworowych pozostają wówczas niereaktywne, a nawet umierają w procesie apoptozy. Do punktów kontroli immunologicznej należą np. cząsteczki PD-1, CTLA-4, Tim-3, BTLA, LAG-2 i VISTA i są wraz z ich odpowiednimi ligandami białkowymi obecnymi na komórkach nowotworowych celami terapeutycznymi we wspomnianych wcześniej najnowszych immunoterapiach. Bazują one na przeciwciałach monoklonalnych blokujących sygnały pochodzące z punktów kontrolnych układu odpornościowego, takich jak ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab czy durivalumab.

Za pomocą wyżej opisanych mechanizmów komórki nowotworowe tworzą wysoko supresyjne mikrośrodowisko, wykorzystując dodatkowo cząsteczki sygnałowe indukujące chroniczny stan zapalny, jak np. cząsteczki adhezji, cytokiny i chemokiny oraz czynniki wzrostu. Dotychczasowe dane epidemiologiczne dowodzą, że chroniczne zapalenie towarzyszące chorobie nowotworowej związane jest z gorszym rokowaniem. Badania prowadzone w ciągu ostatnich lat wykazały kluczowy wpływ mikrośrodowiska guza na rozwój i progresję nowotworu, odpowiedź na stosowane terapie przeciwnowotworowe jak i na przeżycie pacjentów. Środowisko to obejmuje nie tylko same komórki nowotworowe, ale także komórki układu immunologicznego jak i komórki podścieliska i naczyń krwionośnych. Komórki guza w miarę swojej progresji odpowiednio edytują te pozostałe komórki mikrośrodowiska na swoją korzyść, tak że odtąd wspierają one dalszy rozwój guza i tworzenie przerzutów [4].

Rola mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych w immuosupresyjnym środowisku guza

Przez wiele dziesięcioleci uznawano, że głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za komunikację i regulację międzykomórkową w zdrowych jak i patologicznych tkankach odpowiedzialne są głównie cząsteczki rozpuszczalne takie jak cytokiny, chemokiny i hormony. Jednakże odkrycie kilkanaście lat temu mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako pełnoprawnych uczestników sieci międzykomórkowej komunikacji zrewidowało to spojrzenie. Odtąd mikropęcherzyki międzykomórkowe, w literaturze anglojęzycznej określane w skrócie jako EVs (od ang. *extracellular vesicles*), wydzielane przez komórki nowotworowe, komórki immunologiczne jak i inne komórki z mikrośrodowiska guza, wzbudzają ogromne zainteresowanie naukowców. Obecnie są obiektem intensywnych badań mających wyjaśnić ich wpływ na odpowiedź immunologiczną w przebiegu choroby nowotworowej [5]. EVs są pęcherzykami błonowymi o podwójnej błonie lipidowej i wielkości poniżej 1 μm , i wydzielane są do przestrzeni międzykomórkowej przez wszystkie rodzaje komórek, jednakże szczególnie intensywnie przez komórki nowotworowe. Tworzą grupę bardzo heterogenną pod względem wielkości, pochodzenia komórkowego, niesionego cargo oraz funkcji. Najczęściej klasyfikuje się je w oparciu o ich biogenezę i wielkość. Obecnie stosowana nomenklatura obejmuje egzosomy (30-150 nm), mikropęcherzyki (150-1000 nm) i ciała apoptotyczne (> 1000 nm). Egzosomy są wydzielane w ramach ściśle regulowanego szlaku endolizosomalnego (ang. *endolysosomal pathway*) obejmującego endocytozę oraz powstanie tzw. ciałek wielopęcherzykowych (ang. *multivesicular bodies, MVB*). W odróżnieniu od egzosomów mikropęcherzyki powstają bezpośrednio poprzez uwypuklenie błony komórkowej na zewnątrz zaś ciała apoptotyczne pochodzą z komórek ulegających apoptozie i

powstają poprzez ich rozpad. Wszystkie rodzaje EVs zawierają bogaty ładunek molekularny, obejmujący enzymy, receptory, białka sygnałowe, mRNA, miRNA oraz DNA. Ze względu na swoją biogenezę, egzosomy zawierają markery endocytozowe, takie jak Tsg101, Alix, flotylinę i inne, zaś molekularna topografia ich powierzchni odzwierciedla topografię ich komórek parentalnych. Z powodu tego podobieństwa profilu molekularnego i genetycznego egzosomów pochodzenia nowotworowego do parentalnych komórek nowotworowych, uważane są one za potencjalne tzw. „płynne biopsje” o możliwym potencjale diagnostycznym [6].

W licznych badaniach wykazano, że komórki nowotworowe wydzielają ogromne ilości EVs, a płyny biologiczne pacjentów z nowotworami są bardzo bogate w mikropęcherzyki pochodzenia nowotworowego, tzw. T-Evs (ang. *tumor-derived EVs*, *T-EVs*). Poprzez oddziaływania parakryne i jukstakryne T-Evs przekazują swój aktywny ładunek molekularny innym komórkom mikrośrodowiska guza, jak np. komórkom immunologicznym. Komórki te zostają pod wpływem tego ładunku przeprogramowane na korzyść nowotworu i zaczynają swoją drogą wydzielać zmienione mikropęcherzyki, które także wspomagają dalszy rozwój guza. To „przejęcie władzy” nad komórkami immunologicznymi przez EVs są istotną częścią procesu aranżowanego przez nowotwór w celu przeobrażenia mikrośrodowiska guza w taki sposób, aby wspierał jego rozwój i hamował przeciwnowotworowe funkcje układu odpornościowego. Chociaż pokazano, że T-EVs są też nośnikiem antygenów nowotworowych i w niektórych przypadkach działają immunogennie, ich interakcje w mikrośrodoisku guza z przeprogramowanymi komórkami prezentującymi antygen nie prowadzą zazwyczaj do aktywacji efektorowych limfocytów T. Zamiast tego indukowane są hamujące szlaki sygnałowe, które prowadzą do utraty funkcji przeciwnowotworowych. Istotne przy tym jest, że ponieważ T-EVs mogą się rozprzestrzeniać systemowo przez układ krwionośny i limfatyczny, ich supresyjne działania nie ograniczają się tylko do mikrośrodowiska guza, lecz mają zazwyczaj charakter ogólnoustrojowy [7, 8].

Stąd też dogłębne poznanie mechanizmów immunosupresji indukowanych przez mikropęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzenia nowotworowego są niezbędne do opracowania nowych metod leczniczych, identyfikacji nowych celów terapii molekularnych oraz udoskonalania obecnie stosowanych immunoterapii.

3.3.2. Zbadanie molekularnych mechanizmów apoptozy limfocytów T indukowanych przez mikropęcherzyki zewnątrzkomórkowe oraz ocena skuteczności immunoterapii cytokinowej in vitro (publikacje 1,2)

Jednym z mechanizmów immunosupresyjnych stosowanych przez nowotwór jest bezpośrednia eliminacja efektorowych limfocytów T poprzez indukcję ich apoptozy. Ten fenomen, określany w literaturze często jako ‘kontratak guza’ (ang. *tumor counterattack*) był początkowo łączony wyłącznie z ekspresją FasL (CD95) oraz innych ligandów receptorów śmierci na komórkach nowotworowych i ich interakcji z odpowiednimi receptorami na powierzchni limfocytów. Podczas gdy ten mechanizm tłumaczył apoptozę limfocytów w bezpośrednim sąsiedztwie guza, nie stanowił wyjaśnienia dla spadku liczby i zwiększonej apoptozy limfocytów T z dala od nowotworu, np. w krwi obwodowej. Istotnie, u pacjentów z różnymi rodzajami nowotworów obserwowano zwiększoną częstotliwość spontanicznej

apoptozy krążących limfocytów T, szczególnie komórek CD8+, w porównaniu do zdrowych osób. Ponadto, poziom apoptozy komórek CD8+ oraz redukcja ich liczby korelowała z zaawansowaniem choroby i złą prognozą [9].

Na parę lat przed podjęciem przeze mnie opisywanych niżej badań pojawiły się pierwsze doniesienia, że do obserwowanej apoptozy limfocytów T indukowanej przez nowotwór mogą przyczyniać się także mikropęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzenia nowotworowego (T-EVs). Wykazano, że komórki nowotworowe nie tylko ekspresują FasL na swojej powierzchni, ale także wydzielają go w postaci T-EVs, które poprzez płyny biologiczne docierają w miejsca odległe od guza i są w stanie hamować funkcje limfocytów T np. w węzłach chłonnych i krwi obwodowej. EVs uzyskane z hodowli nowotworowych linii komórkowych lub z krwi obwodowej pacjentów z rakiem zawierały FasL i wywoływały apoptozę po ko-inkubacji ze zdrowymi limfocytami T *in vitro*. Zaobserwowano korelację pomiędzy poziomem FasL-pozytywnych EVs w osoczu pacjentów a apoptozą i aberracjami w receptorze limfocytów TCR w efektorowych limfocytach T CD8+ oraz z zaawansowaniem nowotworu i przeżyciem tych pacjentów [10, 11]. Mimo tych pierwszych doniesień, w momencie podejmowania niżej opisanych badań koncepcja, że EVs pochodzenia nowotworowego mogą być odpowiedzialne za dysfunkcję limfocytów T w chorobie nowotworowej, uchodziła wciąż za kontrowersyjną i nie do końca była akceptowana przez środowisko naukowe. Jednocześnie trwały intensywne poszukiwania metod i terapii, które mogłyby przeciwdziałać obserwowanemu u pacjentów z rakiem upośledzeniu funkcji limfocytów T.

Stąd też celem pracy było potwierdzenie indukcji apoptozy w limfocytach T przez EVs pochodzenia nowotworowego (w tym czasie nazywanych po prostu mikropęcherzykami – MVs) w funkcjonalnych testach *in vitro*. Kolejnym celem było zbadanie, czy biologicznie czynny immunoterapeutyk na bazie cytokin o nazwie IRX-2, jest w stanie ochronić limfocyty T przed śmiercią komórkową indukowaną przez nowotwór. Do tego celu zastosowaliśmy opracowany wcześniej model apoptozy *in vitro*, z użyciem MVs wyizolowanych z hodowli linii komórkowej raka głowy szyi PCI-13, ekspresyjnej 42 kDa transbłonową formę FasL. Jako komórek docelowych dla FasL-pozytywnych MVs użyliśmy komórek Jurkat z ekspresją CD8 lub aktywowanych *in vitro* pierwotnych limfocytów CD8+ lub CD4+ izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców. Wykazaliśmy, że po 3 h inkubacji nowotworowe MV wywoływały apoptozę komórek Jurkat lub pierwotnych limfocytów T, widoczną w postaci silnej aktywacji kaspaz oraz wiązania aneksyny V do powierzchni komórek. Co ciekawe, limfocyty CD8+ wykazywały większą wrażliwość na apoptozę za pośrednictwem MVs niż limfocyty CD4+. Oprócz wczesnych zmian w błonie komórkowej limfocytów (wiązanie aneksyny V) i aktywacji kaspaz 3 oraz 7, ko-inkubacja z MV powodowała też wydzielanie międzybłonowych białek apoptotycznych takich jak cytochromu c z mitochondriów, utratę mitochondrialnego potencjału membranowego oraz fragmentację DNA w komórkach docelowych. Te wyniki wskazywały na to, że MV indukują apoptozę w limfocytach T, angażując zarówno tzw. zewnątrzpochodne szlaki sygnałowe, tzn. związane z aktywacją tzw. receptorów śmierci na powierzchni limfocytów (w tym wypadku Fas) jak i szlaki wewnątrzpochodne związane z mitochondriami. Ponieważ wiadomo, że wspólny łańcuch sygnałowy receptora cytokin gamma pośredniczy w przekazywaniu sygnałów związanych z przeżyciem za pośrednictwem szlaku JAK-3/Stat-5, zbadaliśmy wpływ MVs na ekspresję tych

cząsteczek. Zaobserwowaliśmy spadek ekspresji JAK-3 i zahamowanie fosforylacji Stat-5 pod wpływem MVs oraz zmniejszenie ekspresji łańcucha CD3 zeta, kluczowego komponentu szlaku sygnałowego receptora limfocytów T (TCR), istotnego dla aktywacji i proliferacji limfocytów. Ponadto stwierdziliśmy zależną czasowo de-fosforylację Akt i zmiany w poziomach białek pro- i anty-apoptotycznych związanych z mitochondrium z rodziny białek Bcl-2. Stosując monoklonalne przeciwciało ZB4 blokujące receptor Fas udowodniliśmy, że obserwowana apoptoza za pośrednictwem MVs zależna jest od interakcji liganda FasL znajdującego się na powierzchni MVs z receptorem Fas na limfocytach.

Drugim celem pracy było zbadanie potencjału ochronnego immunoterapeutyku IRX-2 wobec apoptozy indukowanej przez MVs. IRX-2 jest lekiem opartym na wystandaryzowanej mieszance cytokin w fizjologicznych stężeniach, pozyskiwanej w warunkach cGMP ze stymulowanych komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej zdrowych dawców, opracowanym przez amerykańską firmę IRX Therapeutics i będącym wówczas na etapie wczesnych badań klinicznych [12]. Pokazaliśmy, że IRX-2 nie tylko chroni limfocyty CD8+ i CD4+ przed apoptozą indukowaną przez MVs, ale także przed śmiercią komórkową spowodowaną bezpośrednią aktywacją receptora Fas przeciwciałem CH-11 lub apoptozą wywołaną cytostatykiem staurosporyną. IRX-2 działało protekcyjnie na wszystkie badane etapy procesu apoptozy, blokując aktywację kaspaz, wydzielanie mitochondrialnych białek apoptotycznych do cytozolu i deaktywację szlaku PI3K/Akt. Ponieważ głównym składnikiem IRX-2 jest cytokina IL-2, porównaliśmy jego działanie z cytoprotekcyjnym efektem samej cytokiny IL-2 oraz innych cytokin związanych z przeżyciem. IRX-2 okazał się mieć największy potencjał protekcyjny, szczególnie w przypadku apoptozy inicjowanej poprzez aktywację receptora Fas. Co istotne, protekcyjne działanie IRX-2 było zauważalne tylko w przypadku wstępnej inkubacji limfocytów z tym immunoterapeutykiem przed dodaniem MVs, co wskazywało na to, że w momencie kiedy MVs zainicjują już proces apoptozy, IRX-2 nie jest już w stanie go odwrócić.

W kolejnej pracy kontynuowaliśmy badania mające na celu głębsze poznanie szlaków uczestniczących w indukcji apoptozy przez MVs pochodzenia nowotworowego oraz mechanizmów protekcji inicjowanych przez IRX-2. Poprzednie badania dowiodły, że apoptoza za pośrednictwem MVs w dużej mierze zależna jest od aktywacji kaspaz. Stosując specyficzne inhibitory dla poszczególnych kaspaz dowiedliśmy, że apoptoza wywołana przez MV wymaga przede wszystkim aktywności kaspazy 3, a w mniejszym stopniu aktywności kaspaz 8 i 9, lecz angażuje też szlaki niezależne od kaspaz. Nasze wcześniejsze badania ujęte w pierwszej pracy sugerowały, że oprócz kaspaz istotną rolę w obserwowanym procesie apoptozy mogą też pełnić białka apoptogeniczne uwalniane z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Prześledziliśmy więc ekspresję anty-apoptotycznych (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, FLIP) i anty-apoptotycznych (Bax, Bim) białek po inkubacji z MVs i/lub IRX-2. Okazało się, że sam IRX-2 zwiększa procent komórek produkujących anty-apoptotyczne białka FLIP, Bcl-2 i Mcl-1. Traktowanie limfocytów MVs zmniejsza ekspresję tych białek, zaś wcześniejsza inkubacja komórek z IRX-2 zapobiega częściowo temu spadkowi ekspresji. I odwrotnie, MVs zwiększały ekspresję pro-apoptotycznych białek Bax i Bim, a IRX-2 przeciwdziałał temu wzrostowi. Pokazaliśmy ponadto, że regulacja białek z rodziny Bcl-2 przez MVs wymaga zaangażowania kaspaz 8 i 9, zaś ich modulacja przez IRX-2 jest od nich niezależna.

Ponieważ nasze wcześniejsze eksperymenty wskazywały na zaangażowanie szlaku PI3K/Akt, chcieliśmy sprawdzić jak zahamowanie tego szlaku wpłynie na potencjał ochronny IRX-2. Aktywacja Akt okazała się być niezbędna nie tylko dla ochrony przed zewnątrzpochodną apoptozą za pośrednictwem Fas i kaspaz 8 i 9, ale także przed mitochondrialną apoptozą. Pokazaliśmy przy tym, że zwiększenie poziomu anty-apoptotycznych Bcl-2 i FLIP i zmniejszenie poziomu pro-apoptotycznych Bax i Bim za pośrednictwem IRX-2 jest zależne od Akt. Potwierdzało to dane literaturowe sugerujące, że Akt reguluje przeżycie komórki modelując białka z rodziny Bcl-2. Nasze wcześniejsze badania pokazały, że jednym ze szlaków inicjujących apoptozę w limfocytach przez MVs jest szlak Fas/FasL. Teraz sprawdziliśmy, czy protekcyjne działanie IRX-2 może być związane z modulacją ekspresji Fas na limfocytach. MVs okazały się zwiększać odsetek Fas-pozytywnych komórek i poziom ekspresji Fas na komórkach Jurkat i na pierwotnych limfocytach CD8+ i CD4+. Traktowanie samym IRX-2 nie wpływało na ekspresję na komórkach Jurkat, ale znacząco zmniejszało ją na pierwotnych limfocytach CD8+ i CD4+. Co ważniejsze, traktowanie limfocytów IRX-2 przed inkubacją z MVs znacząco hamowało wzrost poziomu Fas pod wpływem MVs. Wynika z tego, że jeden z mechanizmów ochronnych IRX-2 może polegać na zwiększeniu odporności limfocytów T na apoptozę poprzez zmniejszenie obecności Fas na ich powierzchni. Kontynuując poprzednie badania które dowiodły, że IRX-2 zapobiega obniżeniu ekspresji FLIP, odkryliśmy że sam IRX-2 zwiększa poziom FLIP. FLIP jest białkiem, które jako inhibitor kaspazy 8, jest głównym modulatorem apoptozy za pośrednictwem Fas. Aby potwierdzić znaczenie FLIP dla funkcji ochronnej IRX-2, zbadaliśmy wyznaczniki apoptozy takie jak wiązanie aneksyny V, aktywację kaspaz i uwolnienie cytochromu c, w komórkach Jurkat transfekowanych cFLIP i w komórkach kontrolnych. Komórki z nadekspresją cFLIP okazały się znacząco mniej podatne na apoptozę wywołaną przez MVs, a efekt ochronny IRX-2 był wyraźnie większy w tych komórkach w stosunku do kontroli.

Podsumowując wyniki obu prac, wykazaliśmy po pierwsze, że MVs pochodzenia nowotworowego zawierające FasL indukują w limfocytach T oba szlaki apoptotyczne: zewnątrzpochodny szlak apoptozy poprzez aktywację receptora śmierci Fas jak i wewnątrzpochodny poprzez zaburzenie równowagi mitochondrialnych białek z rodziny Bcl-2. Po drugie, potwierdziliśmy ochronny potencjał immunoterapeutyku IRX-2, który skutecznie chroni limfocyty T przed apoptozą indukowaną przez MVs, blokując apoptotyczny szlak sygnałowy na różnych poziomach. Pokazaliśmy, że IRX-2 utrudnia skuteczną aktywację szlaku receptora śmierci poprzez redukcję ekspresji Fas na powierzchni limfocytów. Poza tym hamuje dalszy przekaz sygnału z kompleksu CD95 DISC poprzez zwiększenie ekspresji cFLIP, co prowadzi nie tylko do zahamowania kaspazy 8 i dalszej aktywacji zewnątrzpochodnego szlaku apoptozy, ale także do blokady mitochondrialnego szlaku apoptozy poprzez zahamowanie rozpadu Bid. Ponadto dowiedliśmy, że poprzez przywrócenie równowagi w poziomach białek mitochondrialnych z rodziny Bcl-2, czyli poprzez zwiększenie ekspresji białek anty-apoptotycznych i zmniejszenie ekspresji białek pro-apoptotycznych, IRX-2 zapewnia dodatkową ochronę przed wewnątrzpochodnym szlakiem apoptozy indukowanym przez MVs. Dodatkowo aktywacja szlaków związanych z PI3K/Akt i NFκB za pośrednictwem IRX-2 może aktywować dodatkowe białka związane z przeżyciem, zwiększając odporność limfocytów T na apoptozę. Tym samym udowodniliśmy, że IRX-2 zapewnia skuteczną tarczę ochronną dla limfocytów T przed

immunosupresyjnym działaniem MV pochodzenia nowotworowego i może być cennym lekiem wspomagającym inne formy immunoterapii.

Dowodem na istotne znaczenie tej pracy jest to, że badania nad IRX-2 kontynuowane są do dnia dzisiejszego i w tej chwili lek ten znajduje się w I i II fazie badań klinicznych. Obecnie IRX-2 jest testowany jako neoadjuwantowa terapia w II fazie badań w raku głowy i szyi i w śródbłonkowej neoplazji sromu i szyjki macicy oraz w I fazie badań w raku piersi. W trakcie tych badań udokumentowano już pierwsze działanie immunoprotekcyjne tego immunoterapeutyku [13-15].

3.3.3. Ocena potencjału diagnostycznego i prognostycznego profilu immunologicznego i stopnia apoptozy limfocytów CD8+ na przykładzie nowotworu głowy i szyi (publikacja 3)

O ile pierwsze dwie prace skupiały się na rozwikłaniu molekularnych podstaw indukowanej przez EVs apoptozy jako mechanizmu immunosupresyjnego, o tyle celem tej pracy było sprawdzenie, czy mechanizm ten może mieć znaczenie kliniczne. Zarówno nasze wcześniejsze badania jak i prace innych badaczy wskazywały na zwiększoną liczbę limfocytów T ulegających spontanicznej apoptozie w krwi obwodowej pacjentów nowotworowych w porównaniu do zdrowych kontroli [16-18]. Zauważono przy tym, że komórki CD8+ są bardziej podatne na apoptozę niż komórki CD4+ oraz że receptor chemokin CCR7 chroni limfocyty CD8+ przed apoptozą [19]. Receptor chemokinowy CCR7 pełni ważną funkcję w migracji limfocytów T naiwnych (dziewicznych) i pamięci oraz dojrzałych komórek dendrytycznych do węzłów chłonnych oraz w indukcji tolerancji obwodowej i regulacji odpowiedzi immunologicznej przez limfocyty T regulatorowe.

W naszych badaniach chcieliśmy zweryfikować te obserwacje, określając ekspresję receptora CCR7 na limfocytach oraz poziom zróżnicowania i apoptozy limfocytów CD8+ w próbkach krwi obwodowej pobranych od 67 pacjentów z rakiem głowy i szyi o różnym stopniu zaawansowania oraz od 57 zdrowych kontroli. Do badania za pomocą cytometrii przepływowej użyto markerów CD45RO/RA, CCR7 i CD28, oraz barwienia na aneksynę V i 7AAD w celu wykrycia wczesnej i późnej apoptozy oraz martwych komórek. Różne kombinacje obecności badanych markerów określały przy tym stopień dojrzenia limfocytów. Limfocyty T naiwne (dziewicze), są CD45Roneg/CCR7+ i wchodzi w interakcję z komórkami prezentującymi antygen we wtórnych węzłach chłonnych, i po rozpoznaniu antygeny ulegają klonalnej ekspansji i różnicowują się w stronę limfocytów pamięci centralnej (CD45RO+/CCR7+; ang. *central memory T-cells* – T_{CM}) i limfocytów pamięci obwodowej (CD45Roneg/CCR7+; ang. *peripheral memory T-cells* – T_{PM}), zwanych też limfocytami terminalnie zróżnicowanymi. Limfocyty T_{PM} migrują do tkanek obwodowych, gdzie obejmują funkcje efektorowe. Limfocyty T_{CM} nie posiadają funkcji efektorowych, migrują do wtórnych węzłów chłonnych zachowując zdolność do proliferacji i różnicowania w stronę komórek T_{PM} po ponownej stymulacji antygenem. Podobnie, dziewicze limfocyty T i komórki pamięci posiadają ko-stymulujący receptor CD28, potrzebny do nawiązania interakcji z komórkami prezentującymi antygen, w odróżnieniu od dojrzałych komórek efektorowych.

Potwierdziliśmy poprzednie obserwacje, że chorzy na raka wykazują zwiększoną liczbę apoptotycznych limfocytów CD8+ w krwi obwodowej niż osoby zdrowe, przy czym większość z tych limfocytów CD8+ jest CCR7 negatywna. Pomimo, że komórki CD8+CCR7neg okazały się znacząco bardziej podatne na apoptozę niż limfocyty posiadające CCR7, stwierdziliśmy znaczący spadek udziału procentowego jak i całkowitej liczby limfocytów CD8+CCR7+ i CD4+CCR7+ w krwi obwodowej pacjentów. Co ciekawe, liczba komórek CD8+ AnxV+, czyli komórek apoptotycznych w krwi obwodowej pacjentów i zdrowych kontroli korelowała z liczbą limfocytów CD8+ które nie posiadały CCR7. Pacjenci z rakiem głowy i szyi charakteryzowali się zatem zmniejszoną frekwencją limfocytów CD8+CCR7+ i jednocześnie podwyższonym odsetkiem apoptotycznych limfocytów CD8+ wiążących AnxV. Dzięki dokładniejszemu fenotypowaniu limfocytów CD8+ poprzez określenie obecności markerów CCR7, CD45RO i CD28 w cytometrii przepływowej, chcieliśmy ustalić czy wczesna apoptoza komórek CD8+ może być związana z ich stopniem dojrzewania. Stwierdziliśmy, że zwiększony odsetek komórek CD8+CCR7neg u pacjentów nowotworowych związany jest z nagromadzeniem terminalnie zróżnicowanych limfocytów T (ang. *terminally differentiated T-cells, T_{TD}*), inaczej zwanych limfocytami T efektorowymi, które wykazywały najwyższy poziom apoptozy i najwyższy odsetek komórek AnxV+. Natomiast częstotliwość CCR7-negatywnych limfocytów dziewiczych była u pacjentów obniżona w stosunku do kontroli, zaś liczba limfocytów pamięci T_{CM} i T_{PM} była porównywalna między obiema grupami. Nie zaobserwowaliśmy różnic w liczebności omawianych populacji limfocytów między pacjentami z aktywną chorobą (ang. *active disease*) a pacjentami bez klinicznych objawów nowotworu (ang. *non-evident disease*).

Dla kombinacji tych 4 badanych markerów – CCR7, CD45RO/RA, CD28 i AnxV – dających w sumie 20 możliwych fenotypów limfocytów CD8+, obliczyliśmy współczynniki korelacji rang Spearmana, które zostały ujęte w tzw. mapę ciepłą (ang. *heat map*). Matryca ta potwierdziła, że brak CCR7 na powierzchni limfocytów, czyli dotyczący podgrup T_{PM} i T_{TD}, pozytywnie koreluje z wysoką apoptozą i wiązaniem AnxV, w odróżnieniu od CCR7-pozytywnych limfocytów CD8+ dziewiczych, które słabo ulegają apoptozie. Nienadzorowane grupowanie hierarchiczne wszystkich 20 fenotypów zidentyfikowanych u pacjentów i kontroli doprowadziło do wyodrębnienia 2 odrębnych klastrów: grupy z wysoką apoptozą i niskim odsetkiem limfocytów CCR7-pozytywnych, obejmującej wyłącznie pacjentów, oraz grupy kontrolnej z fenotypem odwrotnym. Chcąc sprawdzić, czy któryś z użytych parametrów, czyli odsetek komórek CD8+AnxV+ i/lub odsetek CD8+CCR7+, umożliwi jednoznaczne rozróżnienie pacjentów od zdrowych kontroli, zastosowaliśmy metodę partycjonowania rekurencyjnego. Badani byli najpierw podzieleni pod względem odsetka komórek AnxV+ w podgrupie limfocytów T_{TD}, a następnie na podstawie odsetka limfocytów CD8+CCR7+. Model ten umożliwił prawidłową identyfikację badanych jako pacjentów lub osoby zdrowe z dokładnością 100%, zaś po walidacji krzyżowej z jednym wyjściem (ang. *leave-one-out cross-validation*) dokładność ta spadła do 88%. Nowy test walidacyjny na niezależnej grupie 15 pacjentów i 15 kontroli wykazał dokładność wynoszącą nawet 93%. Ponieważ jednak wiarygodny pomiar odsetka limfocytów CD8+ wiążących AnxV wymaga przeprowadzenia analizy zaraz po pobraniu próbki krwi od pacjenta, co byłoby trudne do osiągnięcia w rutynowej praktyce klinicznej, chcieliśmy zbadać czy drugi badany parametr – odsetek CD8+CCR7+ - nie byłby również wystarczającym parametrem diagnostycznym. Istotnie,

stwierdziliśmy że przy przyjęciu punktu odcięcia obliczonego przez algorytm jako 31% CD8+CCR7+, parametr ten pozwala na odróżnienie pacjentów od kontroli z dokładnością między 77% a 85%. Wykazaliśmy ponadto, że status HPV pacjentów, zwykle mocno wpływający na przebieg choroby, nie wpływa na liczbę limfocytów CD8+CCR7+.

Kolejnym ważnym pytaniem było, czy częstotliwość komórek CD8+CCR7+, oznaczana w momencie diagnozy przed podjęciem jakiegokolwiek leczenia, może służyć jako marker prognostyczny dla nawrotu choroby. Korelując odsetek limfocytów CD8+CCR7+ z danymi klinicznymi pacjentów stwierdziliśmy, że pacjenci z wyższym ich odsetkiem miały zmniejszone ryzyko wznowy nowotworu, niezależnie od zastosowanej po diagnozie terapii. Model proporcjonalnego hazardu Coxa oszacował współczynnik hazardu HR na 0,51 (przedział ufności CI: 0,27-0,96) na każde 10% wzrostu ponad wartość wyjściową dla odsetka limfocytów CD8+CCR7+. Po zastosowaniu rekursywnego modelu partycjonowania ustaliliśmy stabilny punkt odcięcia wynoszący 28% limfocytów CD8+CCR7+. Utworzony na tej podstawie wykres Kaplana-Meiera dowodził, że pacjenci z liczbą krążących limfocytów CD8+CCR7+ poniżej tej granicy 28% mają znacznie obniżone ryzyko wznowy nowotworu. Tylko jeden pacjent z 9 pacjentów tej grupy doświadczył wznowy w ciągu 4 lat od zakończenia terapii, podczas gdy w grupie 16 pacjentów mających poniżej 28% limfocytów CD8+CCR7+ niemal trzy czwarte (12 pacjentów) doświadczyło w tym czasie nawrotu choroby.

Podsumowując, w ramach tej pracy wykazaliśmy że u pacjentów z rakiem głowy i szyi częstotliwość występowania odpornych na apoptozę limfocytów CD8+CCR7+ w krwi obwodowej jest znacząco obniżona, zaś ich miejsce zajmuje zwiększona populacja limfocytów CD8+ pamięci peryferyjnej T_{PM} i limfocytów efektorowych T_{TD} , które są CCR7-negatywne i wysoce wrażliwe na apoptozę inicjowaną przez nowotwór. Potwierdzałoby to wcześniejsze doniesienia, że w przypadku nowotworu chroniczna ekspozycja na antygeny nowotworowe i stres oksydacyjny związany z nowotworem przyspiesza dojrzewanie limfocytów T naiwnych w stronę limfocytów terminalnie zróżnicowanych T_{TD} , które szybko obumierają w procesie apoptozy. Ostatecznie prowadzi to do stanu „wyczerpania” limfocytów efektorowych, utraty ich funkcji cytotoksycznych i zahamowanie przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej [20]. Ponadto odkryliśmy, że zwiększona utrata ekspresji CCR7 na powierzchni limfocytów CD8+ w procesie ich przyspieszonego dojrzewania może być ważnym markerem diagnostycznym, gdyż pozwala rozróżnić pacjentów od zdrowych kontroli, nawet w przypadku słabo zaawansowanych nowotworów (stoper T1). Co więcej, pokazaliśmy też, że parametr ten, mierzony w krwi obwodowej w momencie diagnozy, ma niezwykle potencjał diagnostyczny. Pomimo dość ograniczonej grupy badawczej okazał się bowiem miarodajnym markerem czasu przeżycia wolnego od choroby (ang. *disease-free survival, DFS*), niezależnie od zastosowanej ostatecznie terapii. Tym samym umożliwia już w momencie diagnozy identyfikację pacjentów o wysokim ryzyku wznowy, u których wtedy mogłaby być zastosowana bardziej agresywna terapia. Użyta przez nas prosta analiza liczby limfocytów CD8+CCR7 w krwi obwodowej za pomocą cytometrii przepływowej może być przy tym bez problemu przeniesiona do rutynowej praktyki klinicznej, choć jej potencjał prognostyczny wymaga jeszcze potwierdzenia na większej grupie pacjentów.

3.3.4. Identyfikacja nowych mechanizmów immunosupresji indukowanych przez małe mikropęcherzyki zewnątrzkomórkowe (egzosomy): zbadanie roli arginaz pochodzenia egzosomalnego w immunosupresji w raku jajnika (publikacja 4)

Podobnie jak w nowotworach głowy i szyi, badanych w powyżej omówionych pracach, również w przypadku raka jajnika mamy do czynienia z wysoce immunosupresyjnym mikrośrodowiskiem guza, tworzonym między innymi za pośrednictwem mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia nowotworowego. Rak jajnika jest wiodącym pod względem umieralności nowotworem, gdyż rozpoznanie zwykle następuje zwykle dopiero w zaawansowanym stadium, a pomimo początkowej dobrej odpowiedzi na standardową chemoterapię większość pacjentek doświadcza w ciągu kilku lat wznowy choroby z powodu rozwoju chemoodporności komórek nowotworowych. Próby stosowania różnych immunoterapii, w tym terapii inhibitorami punktów kontrolnych, nie przynoszą zadowalających efektów, czego powodem są między innymi wspomniane immunosupresyjne mechanizmy [21].

Jednym z ostatnio odkrytych mechanizmów supresji układu immunologicznego przez komórki nowotworowe jest edycja metabolizmu aminokwasów w mikrośrodowisku guza. Komórki nowotworowe wydzielają odpowiednie enzymy, które ograniczają w mikrośrodowisku dostępność niektórych aminokwasów, jak np. L-tryptofanu i L-argininy, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórek układu odpornościowego i zainicjowania efektywnej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Jednym z takich enzymów jest arginaza, która katalizuje rozkład L-argininy na L-ornitynę i mocznik. Wysoka aktywność arginazy (ARG) i związany z nią spadek L-argininy w mikrośrodowisku nowotworu powoduje zablokowanie funkcji limfocytów T. Poprzez zaburzenie szlaku GCN2 i fosforylację eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2 (EIF2 α , ang. eukaryotic initiation factor 2) dochodzi do zahamowania biosyntezy białek w komórce a w rezultacie do zahamowania proliferacji. Ponadto w wyniku spadku ekspresji łańcucha CD3 ζ , stanowiącego kluczowy element kompleksu receptora limfocyta T (TCR, ang. T cell receptor) zahamowana zostaje aktywacja limfocytów T. Niedobór L-argininy skutkuje też zmniejszeniem produkcji IFN γ , kluczowego mediatora odpowiedzi przeciwnowotworowej. Znane są dwa izoenzymy arginazy, które katalizują tę samą reakcję biochemiczną ale różnią się lokalizacją w komórce. Arginaza-1 (ARG1) jest enzymem cytoplazmatycznym, podczas gdy arginaza-2 (ARG2) znajduje się w mitochondriach. Zaobserwowano wysoką aktywność ARG1 lub/i ARG2 u chorych z nowotworami, zarówno z guzami litymi jak i z nowotworami układu krwiotwórczego, która często korelowała z niekorzystnym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia. Zwiększona aktywność ARG została stwierdzona w mikrośrodowisku guza, we krwi, i/lub we wtórnych narządach limfatycznych. Zwiększona obecność ARG w tych miejscach przypisywana była dotychczas głównie tzw. mieloidalnym komórkom supresorowym (MDSC, ang. myeloid-derived suppressor cell) jak również populacji makrofagów związanych z nowotworami (TAM, ang. tumor-associated macrophages) [22]. Jednak coraz więcej najnowszych badań dowodzi, że także same komórki nowotworowe mogą być źródłem ARG, jak np. w przypadku raka prostaty, neuroblastomy czy ostrej białaczki szpikowej. Shenoy i wsp. zaobserwowali w 2018 roku, że EVs wyizolowane z płynu otrzewnowego pacjentek z rakiem jajnika i zidentyfikowane jako egzosomy, hamowały proliferację oraz aktywację limfocytów T oraz wydzielanie cytokin [23]. Ta praca, oraz nasze

wcześniejsze obserwacje potwierdzające w osoczu i płynie otrzewnowym pacjentek z rakiem jajnika wysokie stężenia EVs, które, podobnie jak wyżej opisane EVs w rakach głowy i szyi, zmniejszały poziom CD3 ζ na limfocytach T [11], zainspirowały nas do badań nad znaczeniem ARG w immunosupresji w raku jajnika. Choć znaczenie tego enzymu w immunosupresji zostało już zbadane w niektórych nowotworach, jednakże nie w raku jajnika oraz przede wszystkim nie w kontekście mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Wyszliśmy do hipotezę, że komórki raka jajnika mogą wydzielać arginazę, i to nie tylko bezpośrednio, ale także za pośrednictwem mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Podejrzewaliśmy, że dzięki tym mikropęcherzykom rozprzestrzeniającym się systemowo poprzez układ krążenia, arginaza może być aktywna nie tylko w obrębie guza, ale może też prowadzić do globalnego niedoboru L-argininy, a przez to do ogólnoustrojowego upośledzenia aktywności limfocytów T. Tłumaczyłoby to dysfunkcje limfocytów T, w tym spadek ekspresji łańcucha CD3 ζ , obserwowane przez nas i innych w krwi obwodowej pacjentek z rakiem jajnika.

Celem badań było więc wykrycie ekspresji arginaz w komórkach raka jajnika jak i potwierdzenie obecności EVs zawierających ARG w hodowlach in vitro linii komórkowych raka jajnika jak i w płynach biologicznych (osocze, płyn otrzewnowy) pacjentek z rakiem jajnika oraz zbadanie ich wpływu na komórki układu odpornościowego w eksperymentach in vitro jak i in vivo w mysim modelu raka jajnika. Ponadto, stosując niedawno opracowany drobnocząsteczkowy inhibitor [24], chcieliśmy sprawdzić czy zahamowanie aktywności enzymatycznej ARG może być celem nowatorskich strategii przeciwnowotworowych.

Istotnie, metodami WesternBlot oraz cytometrii przepływowej wykryliśmy ekspresję ARG1 (ale nie ARG2) w 8 ustalonych liniach komórkowych raka jak i komórkach wyizolowanych z płynu otrzewnowego tudzież w pierwotnych tkankach nowotworowych pacjentek metodą immunohistochemii. Spośród 84 zbadanych tkanek nowotworowych około 56% próbek wykazywało średnią ekspresję ARG1 w cytoplazmie, 11% próbek charakteryzowało się wysoką ekspresją zaś 33% niską ekspresją – w odróżnieniu od komórek nabłonka i podścieliska zdrowego jajnika, które były ARG1 negatywne. Bioinformatyczna analiza danych 2 niezależnych grup pacjentek z rakiem jajnika (215 oraz 75 pacjentek) ujętych w bazie The Cancer Genome Atlas (TCGA) wykazała, że pacjentki z niską ekspresją ARG1 w pierwotnym guzie mają statystycznie znacząco dłuższy całkowity czas przeżycia (ang. OS, overall survival) oraz czas przeżycia wolny od progresji (PFS, ang. progression-free survival). Za pomocą kolorymetrycznych testów enzymatycznych stwierdziliśmy ponadto podwyższoną aktywność ARG w osoczu pacjentek z rakiem jajnika pobranym w momencie diagnozy, przy czym aktywność ARG wzrastała wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu i była wyższa niż u zdrowych kontroli. W grupie 81 pacjentek test Kruskala-Wallisa oraz test post-hoc Dunna wykazał, że pacjentki z aktywnością arginazy w osoczu poniżej 7,5 U/ml mają znacząco dłuższy czas przeżycia.

Kolejnym krokiem było sprawdzenie, czy ARG1 jest obecna również w EVs wydzielanych przez nowotwór. Faktycznie, stwierdziliśmy obecność EVs zawierających ARG1 (ARG1-EVs) nie tylko w hodowlach komórkowych ustalonych linii raka jajnika, ale także w płynie otrzewnowym oraz osoczu pacjentek z rakiem jajnika. Kluczowym odkryciem było to, że wszystkie te ARG1-EVs wykazywały

aktywność enzymatyczną i hamowały proliferację limfocytów T CD8+ i CD4+ oraz ekspresję łańcucha CD3 ζ w tych komórkach w testach in vitro. Ilość ARG1-EVs oraz ich aktywność enzymatyczna w płynie otrzewnowym pacjentek była przy tym wyższa niż EVs wyizolowanych z płynu pobranego z łagodnych torbieli jako kontroli. To samo dotyczyło ilości i aktywności ARG1-EVs w osoczu pacjentek w porównaniu do zdrowych kontroli. Ponadto potwierdziliśmy wcześniejsze obserwacje obniżonej zdolności do proliferacji i ekspresji CD3 ζ limfocytów T w krwi obwodowej pacjentek z rakiem jajnika, jednakże tutaj mogliśmy dodatkowo wykazać, że stopień supresji tych limfocytów koreluje z ilością i aktywnością egzosomalnej ARG1 w osoczu. Również ARG1-EVs wyizolowane z płynu otrzewnowego ponad 40% badanych pacjentek silnie hamowały proliferację limfocytów T in vitro, w odróżnieniu od EVs kontrolnych pozyskanych z płynu torbieli. Co ważne, w obecności drobnocząsteczkowego inhibitora arginazy OAT-1746 lub nadmiaru L-argininy, immunosupresyjny efekt tych EVs został w niektórych przypadkach częściowo odwrócony, wskazując jednoznacznie na udział ARG1 w immunosupresyjnym mechanizmie indukowanym przez EVs.

W celu dokładniejszego zbadania mechanizmu immunosupresji za pośrednictwem egzosomalnej ARG1 stworzyliśmy myszy model raka jajnika z użyciem mysiej linii raka jajnika ID8 z indukowaną nadekspresją mysiej ARG1 znakowanej metką peptydową V5. Metka ta umożliwiła nam odróżnienie ARG1 pochodzenia egzosomalnego od ARG1 endogennej oraz specyficzne śledzenie ARG1-EVs w eksperymentach in vivo. Pokazaliśmy, że EVs uzyskane z hodowli komórek ID8 zawierają ARG1 z metką V5 i są pochłaniane in vitro przez mysie komórki dendrytyczne uzyskane ze szpiku kostnego. Co więcej, komórki te po wchłonięciu EVs zamiast pobudzać aktywację i proliferację limfocytów T, hamowały ją. Ten sam mechanizm zaobserwowaliśmy in vivo, kiedy to EVs zawierające ARG1 po podaniu podskórnym docierały już w ciągu 4 godzin do lokalnych węzłów chłonnych, gdzie blokowały indukowaną przez antygen (owoalbuminę) proliferację specyficznych limfocytów OT-I (limfocyty CD8+ rozpoznające owoalbuminę). Należy podkreślić, że nie zaobserwowaliśmy tego efektu po podaniu nawet wysokich, o rząd wielkości większych w porównaniu do stężenia ARG1 w EVs, dawek rekombinowanej ARG1. Analiza komórek układu immunologicznego z węzłów drenujących w cytometrii przepływowej wykazała, że ARG1-EVs obniżyły odsetek aktywowanych limfocytów OT-I i zahamowały w nich ekspresję CD3 ϵ , zaś blokada ARG1 inhibitorem OAT-1746 zahamowała ten proces.

Na koniec chcieliśmy znaleźć odpowiedź na pytanie najważniejsze pod kątem klinicznym, czyli czy zaobserwowane mechanizmy immunosupresji za pośrednictwem egzosomalnej ARG1 mają wpływ na rozwój nowotworu. Wykorzystując wspomniany myszy model raka jajnika, dość wiernie odzwierciedlający rozwój nowotworu u ludzi, pokazaliśmy że u myszy którym podano dootrzewnowo komórki nowotworowe zawierające ARG1, rozwój nowotworu następował szybciej niż u myszy kontrolnych. Akumulacja płynu w otrzewnej, będąca markerem rozwoju guza, następowała u tych myszy wcześniej i znacznie szybciej, w płynie tym obecne były obecne EVs z ARG1, a stężenie ARG1 w osoczu wzrastało wraz z rozwojem nowotworu. Analogicznie do eksperymentów in vitro, limfocyty obecne w jamie otrzewnej tych myszy wykazywały obniżony potencjał aktywacyjny i proliferacyjny. Co istotne, podanie dootrzewnowo inhibitora arginazy OAT-1746 2 tygodnie po inokulacji komórek

nowotworowych znacząco spowolniła rozwój nowotworu oraz częściowo zniósła immunosupresyjne działanie egzosomalnej ARG1 na komórki układu immunologicznego.

Podsumowując, w ramach tej pracy odkryliśmy nowy, dotychczas nieopisany w literaturze mechanizm wykorzystywany przez komórki nowotworowe w ucieczce spod nadzoru układu odpornościowego. Pokazaliśmy jako pierwsi, że komórki raka jajnika uwalniają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zawierające ARG1, które są istotnym metabolicznym mediatorem immunosupresji lokalnej jak i ogólnoustrojowej w raku jajnika. Aktywność ARG1 skutkuje niedoborem L-argininy, co prowadzi do zahamowania proliferacji i aktywacji cytotoksycznych limfocytów T – kluczowych komórek układu immunologicznego zwalczających nowotwór. W naszych badaniach pokazaliśmy, że EVs zawierające ARG1 docierają do lokalnych węzłów limfatycznych, gdzie blokują aktywację limfocytów T przez komórki dendrytyczne prezentujące antygen. Udowodniliśmy, że EVs zapewniają zwiększoną stabilność tego enzymu, ułatwiają jego przenikanie przez bariery międzytkankowe i umożliwiają szybką dystrybucję poprzez układ chłonny i układ krążenia, co prowadzi do globalnego niedoboru L-argininy, a przez to do ogólnoustrojowego upośledzenia układu immunologicznego. Wykazaliśmy również, że aktywność ARG1 w raku jajnika ma znaczenie kliniczne, gdyż wpływa na przeżycie pacjentek. Ponadto, dokumentując skuteczność przeciwnowotworową inhibitora arginazy w mysim modelu raka jajnika, wykazaliśmy, że blokowanie aktywności ARG1 może mieć istotne znaczenie kliniczne i być punktem wyjścia do opracowania nowatorskich terapii przeciwnowotworowych. Dowodem na istotne znaczenie tych badań jest to, że obecnie prowadzone są co najmniej cztery badania kliniczne I i II fazy z wykorzystaniem inhibitorów arginazy jako monoterapii lub w połączeniu z innymi immunoterapiami w różnych typach nowotworów [24].

3.3.5. Wdrożenie i optymalizacja najnowszych technik badawczych do oceny ilościowej i fenotypowania molekularnego mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych w immuno-onkologii (publikacja 5)

Do prowadzenia z powodzeniem badań translacyjnych i opracowywania metod diagnostycznych i terapii bazujących na pęcherzykach zewnątrzkomórkowych niezbędne są wiarygodne metody analizy ilościowej i jakościowej EVs. Szczególnie w przypadku EVs pozyskiwanych z płynów fizjologicznych od pacjentów nowotworowych taka analiza jest utrudniona z powodu częstego zanieczyszczenia próbek białkami, lipoproteinami czy lipidami, ko-izolowanymi razem z pęcherzykami. Obecnie stosowane metody izolacji tylko w niewielkim stopniu pozwalają na pozbycie się tych zanieczyszczeń, stąd z jednej strony poszukuje się nowych metod izolacji, a z drugiej rozwija się dostępne metody analizy EVs, tak aby możliwe zanieczyszczenia jak najmniej zaburzały pomiary.

Jedną z najnowszych metod analizy EVs jest analiza śledzenia cząstek (ang. Nanoparticle tracking analysis, NTA). Technika ta polega na rejestrowaniu przez kamerę podłączoną do mikroskopu tzw. ruchów Brown'a nanocząstek zawieszonych w cieczy. Kamera rejestruje przy tym światło rozpraszane przez każdą pojedynczą cząstkę oraz jej ścieżkę ruchu. Na podstawie ilości zaobserwowanych cząstek obliczane jest stężenie, a za pomocą równania Stokesa-Einsteina i zarejestrowanej prędkości poruszania się, rozkład wielkości cząstek. Do niedawna analizy metodą NTA obejmowały tylko pomiary w trybie światła rozproszonego (ang. scatter mode). Umożliwiało to jednak jedynie analizę

nanocząstek jako takich i nie pozwalało na odróżnienie „prawdziwych” EVs od agregatów białkowych, lipoprotein i innych zanieczyszczeń o podobnej wielkości. Ostatnio rozszerzono analizy NTA o możliwość pomiaru w trybie fluorescencyjnym (ang. fluorescent mode), który pozwolił na identyfikację markerów charakterystycznych dla EVs, jak np. tetraspanin, po uprzednim barwieniu badanych próbek odpowiednimi przeciwciałami sprzężonymi ze znacznikami fluorescencyjnymi, a także identyfikację błon lipidowych odpowiednimi barwnikami fluorescencyjnymi. Tym sposobem łatwiejsze stało się odróżnienie „prawdziwych” EVs o podwójnej błonie lipidowej i posiadających tetraspaniny, od innych zanieczyszczeń., a co za tym idzie, dokładniejsze i bardziej wiarygodne pomiary stężenia EVs izolowanych z płynów biologicznych. Ta niedawno opracowana opcja znakowania specyficznych białek na powierzchni EVs fluorescencyjnymi przeciwciałami i ich pomiar w trybie fluorescencyjnym NTA otworzyła ponadto drogę do fenotypowej charakteryzacji EVs i identyfikacji różnych subpopulacji. Ponieważ jednak metoda fluorescencyjnego NTA (fl-NTA) została wprowadzona zaledwie przed paroma laty, prac opisujących wykorzystanie tej metody do pomiaru stężenia i fenotypowania EVs, szczególnie pochodzących z próbek klinicznych, było do momentu podjęcia tej pracy bardzo niewiele. Dostępne pojedyncze prace ograniczały się przy tym do EVs uzyskanych z hodowli komórkowych i do detekcji tylko pojedynczych tetraspanin [25, 26].

Stąd też celem naszej pracy była optymalizacja tej metody pod kątem EVs uzyskanych z takich płynów biologicznych jak osocze i płyn z płukania oskrzelowo-pecherzykowego (ang. bronchoalveolar lavage fluid, BALF) pobranych od pacjentów z nie drobnokomórkowym rakiem płuc. Nowatorskim aspektem podjętej pracy było pozyskanie EVs bezpośrednio z mikrośrodowiska guza w postaci BALF – w odróżnieniu od dotychczasowych badań przeprowadzanych w krwi obwodowej lub w wycinkach tkankowych. EVs w krwi obwodowej mogą nie odzwierciedlać istotnych z punktu widzenia terapii zmian w mikrośrodowisku nowotworu i EVs pozyskane z BALF mogły okazać się lepszym indykatorem. Metoda pozyskiwania BALF jest mało inwazyjnym, wystandaryzowanym zabiegiem możliwym do przeprowadzenia podczas rutynowej bronchofiberoskopii diagnostycznej wykonywanej u każdego pacjenta z podejrzeniem raka płuc [27]. Zaznaczyć należy, że w przypadku EVs izolowanych z BALF pacjentów z rakiem płuc, była to jedna z pierwszych prób tak dogłębnej analizy tego typu mikropęcherzyków. Po raz pierwszy też bezpośrednio porównany został profil molekularny EVs danego pacjenta uzyskanych z BALF pobranego z płuca objętego nowotworem (cBALF), z BALF pobranego symetrycznie z drugiego płuca bez zmian (oBALF) oraz EVs uzyskanych z osocza.

Kolejnym celem pracy była próba kompleksowej charakteryzacji populacji tych EVs metodą fl-NTA pod kątem obecności tetraspanin, co miało w dalszej perspektywie umożliwić rozszerzenie tych badań na inne markery o znaczeniu klinicznym oraz umożliwić korelację profilu molekularnego EVs ze stopniem immunosupresji pacjentów i ich danymi klinicznymi. Jak już pokazaliśmy w wyżej omawianych badaniach, EVs są kluczowym elementem komunikacji międzykomórkowej zachodzącej w mikrośrodowisku guza i jako nośnik materiału genetycznego i funkcjonalnych cząsteczek supresyjnych pochodzących z guza, są istotnym mediatorem immunosupresji lokalnej jak i ogólnoustrojowej. Spodziewaliśmy się, że EVs z BALF odzwierciedlają profil EVs znajdujących się w mikrośrodowisku guza, są wyznacznikiem zmian w obrębie nowotworu oraz znacząco wpływają na

lokalną odpowiedź immunologiczną, przyczyniając się do ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru układu immunologicznego.

Analizę EVs z osocza oraz BALF nową metodą fl-NTA uzupełniliśmy klasycznymi metodami charakteryzacji EVs rekomendowanymi przez Międzynarodowe Towarzystwo Badań nad Pęcherzykami (International Society of Extracellular Vesicles, ISEV), takimi jak Western Blot, transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. transmission electron microscopy, TEM) oraz cytometrią przepływową z wykorzystaniem kulek [28]. Aby otrzymać EVs o odpowiedniej jakości do badań fl-NTA, w pierwszej kolejności zoptimizowaliśmy pod tym kątem izolację mikropęcherzyków z osocza i BALF, używając do izolacji EVs z osocza metody chromatografii wykluczenia (ang. size-exclusion chromatography, SEC), zaś do izolacji EVs z BALF metodę ultrawierwienia i filtracji. Za pomocą wyżej wymienionych klasycznych metod charakteryzacji wykazaliśmy, że obie metody zapewniają izolację nienaruszonych mikropęcherzyków o wielkości i wyglądzie typowych dla „prawdziwych” EVs czy egzosomów. Za pomocą Western Blot wykazaliśmy zarówno w EVs z osocza jak i w EVs z BALF obecność egzosomalnych markerów transbłonowych, takich jak tetraspaniny CD9 i CD81, jak i markerów cytoplazmatycznych takich jak Tsg101, syntenina. Porównanie EVs z osocza i BALF w TEM wykazało, że o ile EVs z BALF stanowią mało zanieczyszczoną, choć zróżnicowaną pod względem wielkości (100-200 nm) populację mikropęcherzyków o podwójnej błonie lipidowej, o tyle EVs z osocza, o jednorodnej wielkości około 100 nm, były silnie zanieczyszczone lipoproteinami i agregatami białkowymi, widocznymi pod postacią małych (<50 nm), ciemnych cząstek. Wysokie zanieczyszczenie potwierdziły badania obecności tetraspanin klasyczną cytometrią przepływową, gdzie po przyłączeniu EVs do kulek magnetycznych i barwieniu próbek fluorescencyjnymi przeciwciałami, stwierdziliśmy znaczny niższy odsetek EVs pozytywnych dla tetraspanin w osoczu w porównaniu do BALF. Zaobserwowaliśmy linearność pomiarów NTA zarówno w trybie światła rozproszonego (scatter mode), jak i w trybie fluorescencyjnym (fluorescent mode). Stwierdziliśmy około 100 razy większe stężenie cząstek w scatter mode w osoczu w porównaniu z BALF. Ponadto analiza NTA potwierdziła mniejszy rozmiar EVs z osocza w porównaniu z pęcherzykami z BALF. Dalsza analiza próbek EVs po barwieniu barwnikiem lipidowym i pomiaru fl-NTA potwierdziły wysokie zanieczyszczenie próbek EVs z osocza cząstkami innymi niż EVs – najprawdopodobniej lipoproteinami. Barwienie barwnikiem CMDR wykazało, że tylko 30% cząstek z osocza posiada błonę lipidową i może być uznane za „prawdziwe” EVs, w odróżnieniu od próbek z BALF, gdzie ten odsetek wynosił ponad 50%. Rzeczywiście, metodą Western Blot z użyciem przeciwciała przeciwko Apo-B, lipoproteiny obecnej w cząsteczkach takich jak LDL, VLDL i IDL, potwierdziliśmy obecność lipoprotein w izolatach mikropęcherzykowych z osocza, ale nie w izolatach z BALF. Tym samym potwierdziliśmy, że zanieczyszczenia lipoproteinami, szczególnie często występujące w przypadku EVs izolowanych z osocza, prowadzą do znacznego zawyżenia stężenia cząstek mierzonego w trybie światła rozproszonego metodą NTA i niezbędna jest detekcja innych markerów charakterystycznych dla EVs w trybie fluorescencyjnym NTA, aby oszacować rzeczywiste stężenie EVs w próbkach biologicznych.

W przypadku barwień na poszczególne tetraspaniny i analizy fl-NTA, stwierdziliśmy obecność wszystkich 3 badanych tetraspanin, CD9, CD81 i CD63, na EVs z BALF, w odróżnieniu od EVs z osocza, gdzie tylko w pojedynczych próbkach zauważalny był bardzo niski odsetek EVs pozytywnych

dla CD9. Ponieważ metodą Western Blot bez problemu mogliśmy potwierdzić obecność CD9 i CD81 w EVs z osocza, podejrzewaliśmy że to wysokie zanieczyszczenie lipoproteinami w połączeniu z ograniczeniami technicznymi sprzętu uniemożliwia detekcję tetraspanin metodą fl-NTA. Nasze wstępne próby usunięcia lipoprotein z próbek EVs za pomocą kulek magnetycznych pokrytych przeciwciałami wiążącymi te cząsteczki udowodniliśmy, że rzeczywiście te zanieczyszczenia znacznie wpływają na pomiary metodą fl-NTA. Po usunięciu lipoprotein odnotowaliśmy znaczny wzrost procentowy cząsteczek zabarwionych CMDR, czyli pęcherzyków posiadających błonę lipidową. Wpływ usunięcia lipoprotein na detekcję tetraspanin nie był taki jednoznaczny – tylko w niektórych próbkach stwierdziliśmy wzrost procentowy EVs pozytywnych dla CD9, stąd też zastosowana przez nas metoda usuwania lipoprotein wymaga dalszej optymalizacji i zbadania jej wpływu na pomiary fl-NTA.

Jeśli chodzi o profil molekularny (tetraspaniny), wielkość i stężenie EVs z BALF pacjentów z nie drobnokomórkowym rakiem płuc, nie stwierdziliśmy istotnych statystycznie różnic między populacją EVs z płuca objętego nowotworem (cBALF) a populacją z kontrlateralnego płuca „zdrowego” (oBALF), co potwierdzałoby wcześniejsze doniesienia oraz nasze analizy profilu komórkowego, że w przypadku nie drobnokomórkowego raka płuc oba płuca stanowią jedno środowisko. Badane w omawianej pracy parametry EVs z uwagi na ograniczoną grupę badawczą nie pozwoliły na wykrycie statystycznych różnic pomiędzy pacjentami z rakiem a kontrolami oraz korelacji z danymi klinicznymi. Obecnie kontynuujemy nasze badania na znacznie większej grupie badawczej (łącznie ponad 80 pacjentów) i widzimy już pierwsze korelacje profilu EVs z danymi klinicznymi, m. in. z zaawansowaniem nowotworu. W ramach współpracy międzynarodowej w kierowanym przeze mnie projekcie programu Akademickie Partnerstwa Międzynarodowe Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA) planujemy rozszerzenie naszych badań nad fenotypem EVs z BALF i osocza pacjentów z rakiem płuc o inne najnowsze techniki badawcze, takie jak cytometria obrazowa z użyciem sprzętu Amnis Image Stream, który umożliwia bezpośrednie fenotypowanie i obrazowanie EVs w materiale wyjściowym bez konieczności wcześniejszej izolacji.

Podsumowując, w omawianej pracy przedstawiliśmy pierwszą tak dogłębną charakterystykę molekularną EVs uzyskanych z BALF pacjentów z rakiem płuc i porównaliśmy ją z populacją EVs obecnych w osoczu, zarówno stosując uznane klasyczne metody charakteryzacji EVs jak i nowatorską metodę fl-NTA. Pokazaliśmy, że metoda fl-NTA może dostarczyć miarodajnych informacji dotyczących stężenia, wielkości, dystrybucji cząstek i fenotypu molekularnego EVs w heterogennych izolatach uzyskanych z płynów biologicznych, pod warunkiem, że są one pozbawione większych zanieczyszczeń. Udowodniliśmy, że mając na uwadze te ograniczenia, metoda fl-NTA posiada potencjał do dalszego rozwoju w kierunku detekcji bardziej specyficznego ładunku molekularnego, jak np. markerów nowotworowych, na powierzchni EVs, i może być stosowana do oceny próbek EVs pod kątem jakości, funkcji biologicznej i znaczenia klinicznego. Kontynuacja naszych badań nad fenotypem molekularnym EVs w niedrobnokomórkowym raku płuc, szczególnie pod kątem obecności cząsteczek immunosupresyjnych i ich wpływu na komórki immunologiczne, pozwoli na ocenę przydatności EVs z BALF i osocza jako markerów dysfunkcji układu odpornościowego, jako potencjalnych markerów diagnostycznych/prognostycznych czy jako celów dla terapii celowanych molekularnie.

3.3.6. Publikacja 6. (artykuł poglądowy) – “

Na zaproszenie edytora czasopisma „Expert Opinion on Biological Therapy”, wspólnie z wieloletnim zagranicznym współpracownikiem naukowym, prof. Thresą L. Whiteside, dokonaliśmy przeglądu i podsumowania najnowszych wyników badań dotyczących roli egzosomów i mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia nowotworowego (ang. tumor-derived exosomes, TEX) w diagnostyce i prognostyce chorób nowotworowych oraz ich potencjału jako biomarkerów odpowiedzi na terapię przeciwnowotworowe.

W omawianej publikacji przedyskutowaliśmy następujące zagadnienia:

- Definicja i biogeneza TEX, mechanizmy ich interakcji z komórkami i komponentami w mikrośrodkowisku guza
- Przegląd dostępnych metod izolacji TEX pod kątem ich specyficzności, wad i zalet
- Omówienie najnowszych odkryć dotyczących roli TEX w interakcji między komórkami nowotworu a innymi komórkami znajdującymi się w mikrośrodkowisku guza i poza nim, w szczególności z komórkami układu immunologicznego
- Wpływ immunosupresyjnego cargo, w tym w szczególności PD-L1, niesionego przez TEX, na odpowiedź przeciwnowotworową i stosowane immunoterapie w mysich modelach in vivo i w badaniach klinicznych
- Potencjalne zastosowanie TEX z osocza pacjentów nowotworowych jako tzw. „płynne biopsje” i biomarkery diagnostyczne i prognostyczne oraz wyznaczniki odpowiedzi na immunoterapie

W ramach wymienionych wyżej zagadnień, dokonaliśmy krytycznego przeglądu i podsumowania w sumie ponad 160 prac, w tym także wiele prac własnych dotyczących tematu, systematyzując wybrane zagadnienia także w postaci dwóch tabel oraz przedstawiając omawiane mechanizmy w postaci 5 poglądowych rycin.

Literatura:

1. Ostrand-Rosenberg S: **Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity**. *Curr Opin Genet Dev* 2008, **18**(1):11-18.
2. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD: **The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting**. *Immunity* 2004, **21**(2):137-148.
3. Topalian SL, Taube JM, Pardoll DM: **Neoadjuvant checkpoint blockade for cancer immunotherapy**. *Science* 2020, **367**(6477).
4. Giannone G, Ghisoni E, Genta S, Scotto G, Tuninetti V, Turinetti M, Valabrega G: **Immuno-Metabolism and Microenvironment in Cancer: Key Players for Immunotherapy**. *Int J Mol Sci* 2020, **21**(12).
5. Czystowska-Kuzmicz M, Whiteside TL: **The potential role of tumor-derived exosomes in diagnosis, prognosis, and response to therapy in cancer**. *Expert Opin Biol Ther* 2021, **21**(2):241-258.
6. Latifkar A, Hur YH, Sanchez JC, Cerione RA, Antonyak MA: **New insights into extracellular vesicle biogenesis and function**. *J Cell Sci* 2019, **132**(13).
7. Moller A, Lobb RJ: **The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer**. *Nat Rev Cancer* 2020, **20**(12):697-709.
8. Whiteside TL, Diergaarde B, Hong CS: **Tumor-Derived Exosomes (TEX) and Their Role in Immuno-Oncology**. *Int J Mol Sci* 2021, **22**(12).
9. Whiteside TL: **The role of death receptor ligands in shaping tumor microenvironment**. *Immunol Invest* 2007, **36**(1):25-46.
10. Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S, Whiteside TL: **Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes**. *Clin Cancer Res* 2005, **11**(3):1010-1020.

11. Taylor DD, Gercel-Taylor C, Lyons KS, Stanson J, Whiteside TL: **T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-zeta by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(14):5113-5119.
12. Wolf GT, Moyer JS, Kaplan MJ, Newman JG, Egan JE, Berinstein NL, Whiteside TL: **IRX-2 natural cytokine biologic for immunotherapy in patients with head and neck cancers.** *Onco Targets Ther* 2018, **11**:3731-3746.
13. Liu S, Bellile E, Nguyen A, Zarins K, D'Silva N, Rozek L, Wolf GT, Sartor MA, Investigators ITC: **Characterization of the immune response in patients with cancer of the oral cavity after neoadjuvant immunotherapy with the IRX-2 regimen.** *Oral Oncol* 2021, **123**:105587.
14. Wolf GT, Liu S, Bellile E, Sartor M, Rozek L, Thomas D, Nguyen A, Zarins K, McHugh JB, Investigators ITC: **Tumor infiltrating lymphocytes after neoadjuvant IRX-2 immunotherapy in oral squamous cell carcinoma: Interim findings from the INSPIRE trial.** *Oral Oncol* 2020, **111**:104928.
15. Page DB, Pucilowska J, Sanchez KG, Conrad VK, Conlin AK, Acheson AK, Perlewitz KS, Imatani JH, Aliabadi-Wahle S, Moxon N *et al*: **A Phase Ib Study of Preoperative, Locoregional IRX-2 Cytokine Immunotherapy to Prime Immune Responses in Patients with Early-Stage Breast Cancer.** *Clin Cancer Res* 2020, **26**(7):1595-1605.
16. Yoshikawa T, Saito H, Osaki T, Matsumoto S, Tsujitani S, Ikeguchi M: **Elevated Fas expression is related to increased apoptosis of circulating CD8+ T cell in patients with gastric cancer.** *J Surg Res* 2008, **148**(2):143-151.
17. Dworacki G, Meidenbauer N, Kuss I, Hoffmann TK, Gooding W, Lotze M, Whiteside TL: **Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**(3 Suppl):947s-957s.
18. Saito T, Dworacki G, Gooding W, Lotze MT, Whiteside TL: **Spontaneous apoptosis of CD8+ T lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**(4):1351-1364.
19. Kim JW, Ferris RL, Whiteside TL: **Chemokine C receptor 7 expression and protection of circulating CD8+ T lymphocytes from apoptosis.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(21):7901-7910.
20. Dolina JS, Van Braeckel-Budimir N, Thomas GD, Salek-Ardakani S: **CD8(+) T Cell Exhaustion in Cancer.** *Front Immunol* 2021, **12**:715234.
21. Kurnit KC, Fleming GF, Lengyel E: **Updates and New Options in Advanced Epithelial Ovarian Cancer Treatment.** *Obstet Gynecol* 2021, **137**(1):108-121.
22. Grzywa TM, Sosnowska A, Matryba P, Rydzynska Z, Jasinski M, Nowis D, Golab J: **Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response.** *Front Immunol* 2020, **11**:938.
23. Shenoy GN, Loyall J, Maguire O, Iyer V, Kelleher RJ, Jr., Minderman H, Wallace PK, Odunsi K, Balu-Iyer SV, Bankert RB: **Exosomes Associated with Human Ovarian Tumors Harbor a Reversible Checkpoint of T-cell Responses.** *Cancer Immunol Res* 2018, **6**(2):236-247.
24. Pilanc P, Wojnicki K, Roura AJ, Cyranowski S, Ellert-Miklaszewska A, Ochocka N, Gielniewski B, Grzybowski MM, Blaszczyk R, Stanczak PS *et al*: **A Novel Oral Arginase 1/2 Inhibitor Enhances the Antitumor Effect of PD-1 Inhibition in Murine Experimental Gliomas by Altering the Immunosuppressive Environment.** *Front Oncol* 2021, **11**:703465.
25. Panagopoulou MS, Wark AW, Birch DJS, Gregory CD: **Phenotypic analysis of extracellular vesicles: a review on the applications of fluorescence.** *J Extracell Vesicles* 2020, **9**(1):1710020.
26. Desgeorges A, Hollerweger J, Lassacher T, Rohde E, Helmbrecht C, Gimona M: **Differential fluorescence nanoparticle tracking analysis for enumeration of the extracellular vesicle content in mixed particulate solutions.** *Methods* 2020, **177**:67-73.
27. Domagala-Kulawik J: **The relevance of bronchoalveolar lavage fluid analysis for lung cancer patients.** *Expert Rev Respir Med* 2020, **14**(3):329-337.
28. Witwer KW, Goberdhan DC, O'Driscoll L, Thery C, Welsh JA, Blenkinsop C, Buzas EI, Di Vizio D, Erdbrugger U, Falcon-Perez JM *et al*: **Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles.** *J Extracell Vesicles* 2021, **10**(14):e12182.

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

Pracą naukową zainteresowałam się jeszcze w czasie studiów na Wydziale Matematyki i Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Heinrich-Heine w Düsseldorfie w Niemczech. Moja praca magisterska w Instytucie Zoomorfologii, Biologii Komórki i Parazytologii obejmowała badania eksperymentalne w zakresie biologii molekularnej i dotyczyła funkcji receptora śródbłonowego HCR-110, mającego znaczenie w zakażeniach pasożytniczych w hodowli zwierząt gospodarczych.

Po obronie pracy magisterskiej, chcąc prowadzić badania o większym potencjale translacyjnym i klinicznym, zmieniłam tematykę badań i rozpoczęłam doktorat w Laboratorium Molekularno-

Genetycznym Oddziału Położniczo-Ginekologicznego Kliniki Uniwersytetu Heinrich-Heine w Düsseldorfie w dziedzinie onkologii molekularnej. Oprócz prowadzenia prac badawczych do własnego doktoratu byłam także zaangażowana w badania molekularne nad dziedzicznymi formami raka piersi i jajników prowadzone w ramach Niemieckiego Stowarzyszenia Pomocy Chorym na Raka (Deutsche Krebshilfe) oraz w badania genetyczne nad identyfikacją nowych biomarkerów nowotworów ginekologicznych w ramach Niemieckiego Projektu Badań Genomu Ludzkiego (Deutsches Humangenom-Projekt – J. Pathol. 2005; 205:21-28).

Po uzyskaniu w roku 2006 tytuł doktora nauk przyrodniczych na Uniwersytecie Heinrich-Heine w Düsseldorfie rozpoczęłam ponad 3-letni staż post-doc na Uniwersytecie w Pittsburgu (Department of Pathology, University of Pittsburgh Cancer Institute, Pennsylvania, USA). W laboratorium prof. Theresy L. Whiteside, jednym z czołowych światowych ekspertów w dziedzinie immuno-onkologii, biologii nowotworów i immunoterapii, prowadziłam badania naukowe dotyczące mechanizmów ucieczki nowotworów spod nadzoru immunologicznego i rozwoju nowych immunoterapii w ramach grantów finansowanych przez NIH: „Immune Escape in Human Cancer-Mechanisms and Therapeutic Implications” (PO1 CA-109688), “Apoptosis, Signaling defects and T lymphocyte Homeostasis in Patients with Cancer” (RO1 DE-13918), “Vaccine development for Oral carcinoma” (PO1 DE-12321).

Wspomniane prace badawcze dotyczyły takich zagadnień jak:

I. Rola szlaku sygnałowego związanego z receptorem TLR4 w progresji i rozwoju chemoodporności guzów litych

w płaskonabłonkowych rakach głowy i szyi:

- Szczepanski MJ, **Czystowska M**, Szajnik M, Harasymczuk M, Boyiadzis M, Kruk-Zagajewska A, Szyfter W, Zeromski J, Whiteside TL.

Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. Cancer Res. 2009;69(7):3105-13

IF: 7,543

Liczba cytowań wg Scopus z dn.06.06.22: 194

W tej pracy pokazaliśmy, że ekspresja i aktywacja receptora TLR4, obecnego na ustalonych liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka głowy i szyi oraz na pierwotnych komórkach guza, wspiera rozwój nowotworu poprzez indukcję proliferacji i wydzielania cytokin prozapalnych oraz zwiększenie oporności na chemioterapie i cytotoksyczność komórkową.

w raku jajnika:

- Szajnik M, Szczepanski MJ, **Czystowska M**, Elishaev E, Mandapathil M, Nowak-Markwitz E, Spaczynski M, Whiteside TL.

TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer.

Oncogene. 2009;28(49):4353-63

IF: 7,135

Liczba cytowań wg Scopus z dn. 06.06.22.: 179

Tematem tej pracy było zbadanie szlaków sygnałowych związanych z TLR4 indukowanych przez LPS i paklitaksel w komórkach raka jajnika. Wykazaliśmy, że wpływ LPS i paklitakselu na indukcję proliferacji, apoptozy i produkcje prozapalnych cytokin zależy od obecności i aktywacji MyD88,

cJun, IRAK4 i TRIF, cząsteczek pośredniczących w dalszym przekazywaniu sygnału z receptora TLR4. Znaczenie kliniczne może być nasze odkrycie, że szczególnie obecność MyD88 znacząco determinuje chemoodporność komórek raka jajnika na paklitaksel.

II. Znaczenie limfocytów T regulatorowych (Treg) w immunonkologii: mechanizmy immunosupresji i regulacji, wpływ na rozwój nowotworu i prognozę

- Szczepanski MJ, Szajnik M, **Czystowska M**, Mandapathil M, Strauss L, Welsh A, Foon KA, Whiteside TL, Boyiadzis M. I
Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia.
Clin Cancer Res. 2009;15(10):3325-32

IF: 6,477

Liczba cytowań wg Scopus z dn. 06.06.22.: 198

Była to jedna z pierwszych prac opisujących stężenie, fenotyp i funkcje biologiczną limfocytów T regulatorowych (Treg) w krwi obwodowej pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Ma znaczenie translacyjne, gdyż wykazała że stężenie i potencjał immunosupresyjny Treg w momencie diagnozy koreluje z odpowiedzią na chemioterapię, a pacjenci z niską liczbą Treg w krwi obwodowej w momencie diagnozy statystycznie częściej osiągają całkowitą remisję nowotworu po chemioterapii.

- Strauss L, **Czystowska M**, Szajnik M, Mandapathil M, Whiteside TL.
Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin.
PLoS One. 2009;4(6):e5994.

IF: 4,351

Liczba cytowań wg Scopus z dn.06.06.22: 126

Praca ta wyjaśniła molekularny mechanizm obserwowanej wcześniej selektywnej ekspansji komórek Treg z hodowli komórek CD4+CD25+ pod wpływem immunosupresyjnego leku rapamycyny. Mechanizm ten polega na odmiennej regulacji proliferacji, apoptozy i szlaków sygnałowych PI3K/Akt/mTOR. Wyniki te umożliwiają opracowanie metod wielko-skalowej hodowli komórek Treg do celów terapeutycznych oraz metod farmakologicznej regulacji poziomu Treg w chorobach nowotworowych czy autoimmunologicznych.

- Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, Lang S, Jackson EK, Gorelik E, Whiteside TL
Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells.
J Biol Chem. 2010;285(10):7176-86.

IF: 5,328

Liczba cytowań wg Scopus z dn.06.06.22: 284

Praca jako jedna z pierwszych opisuje nowy mechanizm immunosupresji indukowanej przez komórki Treg, który bazuje na indukcji szlaku adenosynergicznego i ekspresji ektonukleotydu CD39 i CD73. Zidentyfikowaliśmy CD39 jako nowy marker fenotypu i funkcji dla Treg oraz pokazaliśmy, że Treg w odróżnieniu od innych limfocytów TCD4+ posiadają wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie adenozy, którą dostarczają do innych limfocytów, hamując tym samym ich aktywność.

- **Czystowska M**, Strauss L, Bergmann C, Szajnik M, Rabinowich H, Whiteside TL.
Reciprocal granzyme/perforin-mediated death of human regulatory and responder T cells is regulated by interleukin-2 (IL-2).
J Mol Med (Berl). 2010;88(6):577-88.

IF: 5,192

Liczba cytowań wg Scopus z dn.06.06.22: 22

W pracy tej badaliśmy mechanizmy wzajemnych oddziaływań między komórkami Treg a limfocytami T efektorowymi, obejmujące m.in. cytotoksyczność komórkową bazującą na wydzielaniu perforyn i granzymów. Odkryliśmy, że wzajemna eliminacja komórek efektorowych i

Treg jest ściśle zależna od stężenia IL-2, co może mieć znaczenie kliniczne, np. w terapiach przeciwnowotworowych wysokimi dawkami IL-2.

III. Udział mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych w mechanizmach immunosupresji w różnych typach nowotworów

- Bergmann C, Strauss L, Wieckowski E, **Czystowska M**, Albers A, Wang Y, Zeidler R, Lang S, Whiteside TL.
Tumor-derived microvesicles in sera of patients with head and neck cancer and their role in tumor progression.
Head Neck. 2009;31(3):371-80

IF: 2,283

Liczba cytowań wg Scopus z dn.: 70

Tematem pracy była charakteryzacja fenotypowa i funkcjonalna mikropęcherzyków z krwi obwodowej pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem głowy i szyi. Pokazaliśmy, że profil molekularny i aktywność mikropęcherzyków mogą wskazywać na zaawansowanie choroby i być biomarkerem prognostycznym.

- Szajnik M, **Czystowska M**, Szczepanski MJ, Mandapathil M, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). PLoS One. 2010;5(7):e11469.

IF: 4,411

Liczba cytowani wg. Web of Science z dn.06.06.22: 299

W tej pracy odkryliśmy nowy mechanizm ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego wykorzystujący EVs. Pokazaliśmy, że EVs pochodzące z linii komórkowych raka jajnika, osocza lub wodobrzusza pacjentek z rakiem jajnika, indukują różnicowanie Treg z komórek CD4+CD25neg oraz zwiększają ich proliferację i funkcje immunosupresyjne. Udowodniliśmy, że w indukcję komórek Treg zaangażowane są cząsteczki TGF- β i IL-10 obecne na EVs, zaś EVs zwiększają w Treg ekspresję cząsteczek cytotoksycznych, immunosupresyjnych i anty-apoptotycznych.

IV. Opracowanie nowych metod immunoterapii nowotworów na bazie szczepionek

- Rahma OE, Ashtar E, **Czystowska M**, Szajnik ME, Wieckowski E, Bernstein S, Herrin VE, Shams MA, Steinberg SM, Merino M, Gooding W, Visus C, Deleo AB, Wolf JK, Bell JG, Berzofsky JA, Whiteside TL, Khleif SN.
A gynecologic oncology group phase II trial of two p53 peptide vaccine approaches: subcutaneous injection and intravenous pulsed dendritic cells in high recurrence risk ovarian cancer patients.
Cancer Immunol Immunother. 2012;61(3):373-84.

IF: 2,283

Liczba cytowań wg Scopus z dn.06.06.22: 70

Celem tej pracy klinicznej było porównanie w ramach pilotażowej II fazy badań klinicznych efektywności dwóch różnych sposobów podania szczepionki antygenowej zawierającej peptyd wtP53 264-272 pacjentkom z zaawansowanym rakiem jajnika. Poprzez monitorowanie wtp53-reaktywnych cytotoksycznych limfocytów T w krwi obwodowej pacjentek, udowodniliśmy że prostsza i tańsza metoda bezpośredniego podawania podskórnego szczepionki jest tak samo efektywna co znacznie bardziej skomplikowana metoda podawania za pomocą autologicznych komórek dendrytycznych. Co ważniejsze, odkryliśmy że jednoczesne podawanie IL-2, do tej pory często stosowane w schematach terapii antygenowych, może być niewskazane z uwagi na indukcję ekspansji komórek Treg.

Podsumowując, efektem tego niezwykle owocnego stażu jest 12 wysoko cytowanych publikacji w takich czasopismach jak: Cancer Research, Clinical Cancer Research, PLOS One, Oncogene, Cancer Immunology and Immunotherapy, Cell Death and Differentiation, etc. Staż ten ugruntował moje zainteresowania badawcze dotyczące roli mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych w biologii i immunologii nowotworów. Do tej pory utrzymuję aktywną współpracę z naukowcami z Pittsburga, która przekłada się na kooperacji w ramach programu NAWA oraz współautorstwo we wspólnych publikacjach.

Po powrocie do Polski i 3-letniej przerwie w karierze naukowej z uwagi na urodzenie i wychowanie dwójki dzieci, podjęłam na nowo pracę naukową w dziedzinie mikropęcherzyków w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Jako doświadczony badacz byłam zatrudniona w latach 2013-2014 w ramach multidyscyplinarnego projektu badawczego BASTION (From Basic to Translational Research in Oncology) w 7. Programu Ramowego – REGPOT Unii Europejskiej i prowadziłam badania nad mikropecherzykami zewnątrzkomórkowymi, których zwieńczeniem było uzyskanie pierwszego grantu naukowego z NCN. Od tego czasu rozpoczęłam samodzielną pracę naukową kierując grupą badawczą najpierw Zakładzie Immunologii, a od 2019 roku w Katedrze i Zakładzie Biochemii WUM. Prowadzone przeze mnie badania były i są obecnie finansowane w ramach kierowanych przeze mnie w sumie czterech grantów na łączną kwotę prawie 7 mln PLN.

Kierownictwo projektów:

OPUS 21 - Udział pecherzyków zewnątrzkomórkowych oraz egzosomalnej arginazy w dysfunkcji układu immunologicznego w endometriozie (2021/41/B/NZ6/02291)

NAWA-Program Akademickie Partnerstwa Międzynarodowe – Nowoczesne metody izolacji i analizy zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych w ramach badań w immuno-onkologii (EVIONA) (PPI/APM/2019/00051/U/00001)

OPUS 14 - Profil molekularny egzosomów znajdujących się w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego jako nowy biomarker upośledzenia odpowiedzi immunologicznej w niedrobnokomórkowym raku płuca (2017/27/B/NZ6/01990)

OPUS 6 - Zbadanie roli arginaz pochodzenia nowotworowego i egzosomalnego w unikaniu przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej w raku jajnika (2013/11/B/NZ6/02790)

Obecnie kieruję zespołem, w skład którego wchodzi 2 doktorantów oraz 3 studentów. Nasze badania koncentrują się na roli mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych w chorobach nowotworowych oraz innych schorzeniach o podłożu zapalnym. Szczególnie interesuje nas wpływ mikropęcherzyków na układ immunologiczny. Współpracujemy z wieloma zagranicznymi jednostkami naukowymi takimi jak:

Uniwersytet w Pittsburgu (prof. Theresa Whiteside), Uniwersytet w Pensylwanii (prof. Wei Guo, prof. Serge Fuchs), Kings College London (prof. Tony Ng), Uniwersytet Duisburg-Essen (prof. Bernd Giebel). W najbliższym czasie planuje rozszerzyć nasze badania nad mikropęcherzykami na dziedzinę medycyny regeneracyjnej i rozpocząć badania nad zastosowaniem terapeutycznym mikropęcherzyków z komórek macierzystych oraz nad rozwojem procesów biotechnologicznych w standardzie GMP do pozyskiwania mikropęcherzyków do zastosowań w medycynie regeneracyjnej. W tym celu nawiązałam współpracę z prof. Romaldas Maciulaitis z Litewskiego Uniwersytetu Nauk o Zdrowiu (LSMU), prof. Renaldas Urniezius z Uniwersytetu Technicznego w Kownie (KTU) oraz z prof. Ryuichi Nishinakamura z Uniwersytetu Kumamoto w Japonii oraz z litewskimi firmami start-up w dziedzinie biotechnologii (Kelifarma, Cumulatis). Aby zacieśnić tę współpracę aplikuję obecnie o kolejny projekt z NAWY w ramach programu Partnerstwa Strategiczne. Tytuł projektu to: „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe uzyskane z komórek macierzystych w regeneracji tkanek – EVIRA”. W dalszej perspektywie planujemy w latach 2022-23 ubiegać się o finansowanie z funduszy europejskich jako konsorcjum naukowe w ramach Horyzontu Europa.

5. Działalność organizacyjna, dydaktyczna i popularyzująca naukę

5.1. Działalność dydaktyczna

Byłam opiekunem naukowym i promotorem pomocniczym 2 prac magisterskich:

- 2017: Karolina Soroczyńska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, kierunek Biotechnologia
Rola egzosomów zawierających arginazę-1 w immunosupresji raka jajnika
- 2021: Jacek Szymański, Politechnika Warszawska, kierunek Biotechnologia
Charakterystyka immunosupresyjnego profilu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w osoczu pacjentów z rozpoznaniem raka płuc.

Obecnie jestem opiekunem naukowym i promotorem pomocniczym 2 doktoratów:

- Magdalena Długołęcka, Szkoła Doktorska Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Znaczenie egzosomów znajdujących się w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego dla odpowiedzi immunologicznej i prognozy w nie drobnokomórkowym raku płuc.
- Karolina Soroczyńska, Studium Medycyny Molekularnej
Rola egzosomów i egzosomalnej arginazy w rozwoju endometriozy.

W ramach prowadzonych przeze mnie projektów angażowałam i wdrażam obecnie w pracę naukową licznych studentów WUM i spoza WUM i wspieram w ich w pozyskiwaniu własnego finansowania (Dominika Ambrożej, Preludium 20, projekt pt.: „Analiza miRNA w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych pobranych z dróg oddechowych związanych z patomechanizmem astmy w populacji pediatrycznej.”; Miłosz Majka, aplikacja do „Perły Nauki” z projektem pt.: „Wpływ profilu molekularnego egzosomów na patomechanizm kardiomiopatii cukrzycowej”).

Współautorstwo rozdziału w monografii:

- **Czystowska-Kuźmicz M**, Whiteside TL Interplay between exosomes and autophagy: Are they partners in crime?

Chouaib Salem (red.): Autophagy in Immune Response: Impact on Cancer Immunotherapy, 2020, London, Academic Press, 242 s., ISBN 978-0-12-819609-0.
p.197 – 212 (**punkty MNiSW: 200**)

Jestem też głównym autorem wyżej wymienionego rozdziału w recenzowanej monografii, napisanego wspólnie z prof. Theresą Whiteside na zaproszenie redaktora naczelnego prof. Salem Chouaiba, światowego specjalisty w dziedzinie immunoterapii nowotworów. Monografia ta została wydana przez renomowane anglojęzyczne wydawnictwo Academic Press, należące do światowej grupy wydawniczej Elsevier i mające najwyższą punktację na liście MNiSW (200 pkt).

Artykuł stanowiący rozdział jest jedną z nielicznych obecnie prac próbujących znaleźć i krytycznie omówić powiązania między dwoma obecnie najszybciej rozwijającymi się i nowatorskimi dziedzinami badań, czyli badaniami nad egzosomami oraz badaniami nad autofagią. Opracowanie jest cennym źródłem wiedzy w dziedzinie immuno-onkologii i immunoterapii dla studentów i doktorantów medycyny. Ukazuje znaczenie badań podstawowych dla rozwoju skutecznych terapii w medycynie, uzmysławia studentom złożoność i znaczenie interakcji na styku biologii komórki, immunologii i biologii nowotworów, zachęca ich do podejmowania działalności badawczej.

W październiku 2021 wygłosiłam specjalistyczny wykład oraz przygotowałam pytania zaliczeniowe dla doktorantów projektu współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej, HQMedEd – High Quality Medical Education, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Tytuł wykładu: "Extracellular Vesicles (EVs) – the secret special agents in health and disease."

5.1. Działalność organizacyjna, popularyzująca naukę

- Członkostwo w towarzystwach naukowych:

W latach 2006-2010 byłam członkiem International Society of Biological Therapy of Cancer (iSBTC) oraz American Association for Cancer Research (AACR, associate member).

Od roku 2020 jestem członkiem International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) a od 2022 roku Polskiego Towarzystwa Badań nad Pęcherzykami Zewnątrzkomórkowymi (PSEV).

- Recenzje dla czasopism naukowych:

Recenzowałam publikacje w następujących czasopismach naukowych posiadających współczynnik oddziaływania (IF): International Journal of Molecular Science, Cells, Journal of Personalized Medicine, Biomedicines

Byłam też redaktorem specjalnego wydania (Special Issue) Journal of Personalized Medicine pt.: Special Issue "Cancer-Induced Immunosuppressive Mechanism"

- Uczestnictwo w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań:

Brałam udział w pracach panelów ekspertów Narodowego Centrum Nauki w ocenie konkursów Opus, Preludium i Sonata.

- Organizacja konferencji i warsztatów:

W ramach projektu EVIONA-NAWA byłam razem z dr Beatą Pyrzyńską głównym organizatorem międzynarodowej konferencji dotyczącej roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pt.: "Extracellular vesicles in immuno-oncology, medical diagnostics and therapy" oraz połączonych z nią warsztatów dla młodych badaczy pt. " Novel methods of extracellular vesicles isolation" – organizowanych w dniach 30.-31.05.2022. Czołowi międzynarodowi (z USA, Kanady, Wielkiej Brytanii i Niemiec) oraz krajowi eksperci w dziedzinie badań nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi podsumowali w formie wykładów aktualną wiedzę w dziedzinie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz przedstawili wyniki swoich badań zaś w czasie praktycznych warsztatów firmy sponsorskie (Particle Metrix, Sygnis, Cytek) zaprezentowały najnowsze techniki i sprzęt do izolacji i analizy mikropęcherzyków.

- Prowadzenie strony internetowej informującej o prowadzonych badaniach:
<https://eviona.wum.edu.pl/>

6. Współpraca międzynarodowa:

- Prof. Theresa L. Whiteside, UPMC Hillman Cancer Center, University of Pittsburgh, USA
- Prof. Wei Guo, Department of Biology, University of Pennsylvania, USA
- Prof. Serge Fuchs, Department of Biomedical Sciences, University of Pennsylvania, USA
- Prof. Tony Ng, King's College London, UK;
- Prof. Bernd Giebel, Institute for Transfusion Medicine, University Duisburg-Essen, Niemcy
- prof. Romaldas Maciulaitis, Instytut Fizjologii i Farmakologii, Litewski Uniwersytet Nauk o Zdrowiu (LSMU), Kowno, Litwa
- dr Justinias Maciulaitis, firma Kelifarma, Kowno, Litwa
- prof. Renaldas Urniezius, Zakład Automatyki, Uniwersytet Techniczny w Kownie (KTU), Kowno, Litwa
- prof. Ryuichi Nishinakamura, Institute of molecular Embryology and Genetics (IMEG), Uniwersytet Kumamoto (KU), Japonia

7. Nagrody i wyróżnienia:

- 2021: Nagroda Dydaktyczna Indywidualna III Stopnia Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
- 2021: nominacja do nagrody Naukowiec Przyszłości 2021 w kategorii: Nauka dla lepszego życia w przyszłości Centrum Inteligentnego Rozwoju
- 2020: Nagroda Naukowa zespołowa I Stopnia Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego