

lek. Mieszko Krzysztof Lachota

Badanie profilu migracji komórek NK i poszukiwanie metody poprawiającej ich infiltrację w terapii nowotworów litych

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon

Zakład Immunologii Klinicznej
Laboratorium Terapii Komórkowych i Genetycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

Streszczenie w języku polskim

Komórki „naturalni zabójcy” (NK, ang. *natural killer cells*) są obiecującym narzędziem w rozwijaniu nowej generacji terapii przeciwnowotworowych z zastosowaniem inżynierii genetycznej. Nieprzyjazne warunki mikrośrodowiska guzów litych (TME, ang. *tumor microenvironment*) uniemożliwiają komórkom NK pełnienie swojej funkcji, co wymaga odpowiednich modyfikacji poprawiających ich odporność na czynniki obecne w TME. Innym warunkiem, często pomijanym a niezbędnym do przeniesienia sukcesu terapii komórkowych z nowotworów hematologicznych na guzy lite, jest zdolność migracji komórek do organu docelowego. Celem mojej pracy doktorskiej, opartej na trzech publikacjach, jest dogłębna charakteryzacja wzorców migracji komórek NK i identyfikacja strategii poprawiającej ich migrację do guzów litych.

Pierwszą publikacją jest artykuł przeglądowy zatytułowany *Prospects for NK Cell Therapy of Sarcoma*, opublikowany w „Cancers”, czasopiśmie otwartego dostępu (ang. *open access*) wydawanym przez MDPI, o zakresie obejmującym biologię i immunologię nowotworów. W artykule omówiono rolę komórek NK w nadzorze immunologicznym mięsaków, jak również mechanizmy unikania przez ten typ nowotworów odpowiedzi immunologicznej hamującej aktywność komórek NK. Mechanizmy te obejmują: zwiększoną ekspresję cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy I (MHC, ang. *major histocompatibility complex*), zrzucanie z powierzchni ligandów aktywujących komórki NK, zmiany metaboliczne oraz zwiększone wydzielanie immunosupresyjnych cytokin. Wszystkie powyższe czynniki przyczyniają się do tworzenia nieprzyjaznego mikrośrodowiska, co prowadzi do ograniczenia migracji komórek NK i tłumienia ich cytotoksyczności, a ostatecznie do postępu choroby. Ponadto w artykule przeanalizowano strategie aktywacji i modyfikacji genetycznych komórek NK, które zwiększają ich zdolność do rozpoznawania komórek nowotworowych, migracji do guza i odporność na czynniki hamujące obecne w TME. W artykule podjęto również dyskusję nad możliwościami wyczulenia komórek mięsaków na komórki NK za pomocą przeciwciał monoklonalnych, radioterapii, hipertermii i innych metod.

Druga publikacja to również artykuł przeglądowy opublikowany w czasopiśmie „Cancers”, zatytułowany *The Tumor Microenvironment—A Metabolic Obstacle to NK Cells' Activity*. Podsumowano w nim, w jaki sposób mechanizmy unikania odpowiedzi immunologicznej wykorzystywane przez różne guzy lite wpływają na poszczególne funkcje efektorowe komórek NK, takie jak migracja, formowanie synapsy litycznej i produkcja

cytokin. Do wspomnianych mechanizmów należą między innymi hipoksja, zmniejszone pH, stres oksydacyjny, immunosupresyjne cytokiny, ograniczenie dostępności aminokwasów, immunosupresyjne metabolity lipidów czy też metabolity adenozyiny. W artykule zostały także omówione strategie mające na celu zwiększenie odporności komórek NK na nieprzyjazne warunki TME, oceniane obecnie w badaniach *in vitro* i *in vivo*, a także w badaniach klinicznych.

Trzecia publikacja to artykuł oryginalny, zatytułowany *Mapping the Chemotactic Landscape in NK Cells Reveals Subset-specific Synergistic Migratory Responses to Dual Chemokine Receptor Ligation*, opublikowany w „eBioMedicine”, czasopiśmie otwartego dostępu grupy Lancet, poświęconemu odkrywczym badaniom podstawowym. Przedstawione w artykule badanie bazuje na spostrzeżeniu, że w odróżnieniu od innych typów komórek dojrzałe komórki NK rzadko występują w guzach litych, a ich wzorce migracji są słabo zrozumiane. Dlatego zbadano wzorce migracji ludzkich komórek NK, wykorzystując wieloparametrową cytometrię przepływową, cytometrię masową (CyTOF, ang. *cytometry by time-of-flight*) i sekwencjonowanie RNA na poziomie pojedynczych komórek w połączeniu z testami funkcjonalnymi. W wyniku przeprowadzonych badań odkryto, że repertuar receptorów chemokinowych komórek NK z krwi obwodowej zmienia się w skoordynowany sposób, stając się stopniowo bardziej zróżnicowany w trakcie procesu dojrzewania. Wykazano, że ekspresja receptorów chemokinowych jest ściśle związana ze zdolnością do migracji poszczególnych podtypów komórek NK. Odkryto także, że jednoczesna aktywacja receptorów CXCR1/2 i CX3CR1 prowadzi do synergistycznie wzmożonej migracji. Analiza 9471 litych nowotworów z baz danych TCGA/TARGET ujawniła dziewięć dominujących profili ekspresji chemokin, różniących się w zależności od typu guza. Co istotne, żaden z nich nie miał ligandów dla więcej niż jednego receptora chemokinowego obecnego na dojrzałych komórkach NK. Nasze wyniki pokazują, że rzadkość naturalnie występujących par chemokin-receptorów chemokinowych może tłumaczyć systematyczne wykluczanie komórek NK z TME i reprezentuje niewykorzystany potencjał dla inżynierii nowej generacji terapii przeciwnowotworowych opartych na komórkach NK.

Podsumowując, przeprowadzenie przeglądu literatury pozwoliło na zidentyfikowanie problemu ograniczonej infiltracji guzów litych przez komórki NK oraz niektóre z leżących u jego podstaw mechanizmów. Następnie przeprowadzono systematyczną charakteryzację profilu migracyjnego podtypów komórek NK, która w połączeniu z analizą bioinformatyczną ponad dziewięć tysięcy guzów litych dostarczyła dowodów na systematyczne wykluczanie

komórek NK z mikrośrodowiska guzów litych poprzez restrykcyjny profil chemokin. Co najważniejsze, wyniki przedstawione w tej rozprawie wskazują, że wyposażenie komórek NK w co najmniej dwa receptory chemokinowe, odpowiadające profilowi chemokin guza, reprezentuje nowe, obiecujące podejście do inżynierii terapii przeciwnowotworowych bazujących na komórkach NK, oparte na odkrytym zjawisku synergii pomiędzy receptorami chemokinowymi.