

**mgr inż. Joanna Domagała**

**Ocena wpływu wybranych metabolitów na aktywność  
komórek NK**

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

Promotor: dr hab. n. med. Magdalena Winiarska

Zakład Immunologii

Wydział Lekarski

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2022

*Joanna Domagała*

*M. Winiarska*



## Streszczenie w języku polskim

### Ocena wpływu wybranych metabolitów na aktywność komórek NK

Terapia adoptywna to jedna z terapii przeciwnowotworowych opierająca się na zastosowaniu komórek układu odpornościowego, w tym również komórek NK. Komórki NK charakteryzują się unikalnymi właściwościami rozpoznawania i zabijania komórek nowotworowych z zachowaniem tolerancji względem zdrowych komórek organizmu, co umożliwia ich potencjalne zastosowanie terapeutyczne w nowotworach różnego typu. Komórki NK zdolne są do zabicia komórki docelowej w trzech mechanizmach: 1) indukcję apoptozy poprzez receptory śmierci za pomocą FasL oraz TRAIL, 2) uwolnienie ziarnistości litycznych zawierających między innymi perforynę i granzym B, 3) uwolnienie cytokin (np. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). Jednak jednym z istotnych ograniczeń dla efektywnego działania komórek NK jest immunosupresyjne środowisko guza nowotworowego. Nasilonemu metabolizmowi towarzyszy gromadzenie się w środowisku nowotworu produktów przemiany materii, które mogą mieć negatywny wpływ na efektywność działania komórek NK oraz ograniczyć skuteczność stosowanych immunoterapii. Komórki nowotworowe są w dużym stopniu zależne od metabolizmu glukozy i glutaminy. W procesie glutaminolizy w pierwszej kolejności glutamina ulega przekształceniu do kwasu glutaminowego, a następnie do kwasu  $\alpha$ -ketoglutazarowego, natomiast produktem ubocznym powyższej reakcji jest  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ . Dotychczas opisano wpływ produktów glikolizy na efektywność działania komórek NK, jednak stosunkowo niewiele wiadomo na temat wpływu produktów glutaminolizy na cytotoksyczność komórek NK.

Celem pracy doktorskiej było:

- określenie wpływu metabolitów obecnych w środowisku komórek nowotworowych na przeżycie oraz funkcje efektorowe komórek NK;
- zbadanie wpływu  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  na przeżycie oraz funkcje efektorowe komórek NK;
- wyjaśnienie molekularnego mechanizmu wpływu  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  na funkcje efektorowe komórek NK.

Doświadczenia zostały wykonane z wykorzystaniem pierwotnych komórek NK izolowanych od zdrowych dawców oraz linii komórkowej NK-92. Za pomocą cytometrii przepływowej zbadano naturalną cytotoksyczność komórek NK wobec komórek K562, cytotoksyczność zależną od przeciwciał wobec komórek Raji, zdolność komórek NK do tworzenia koniugatów komórkowych oraz odłączania się od komórek docelowych, jak również oceniono poziom degranulacji komórek NK i ich zdolność do wytwarzania cytokin. W

przypadku badania cytotoksyczności komórek CD19-CAR-NK-92 wykorzystano pomiar luminescencji w komórkach nowotworowych wykazujących ekspresję lucyferazy. Zmiany w ilości wybranych enzymów litycznych (granzym B, perforyna) oceniono metodą Western blotting lub cytometrii przepływowej z wykorzystaniem wielokolorowych barwień. Ilość uwalnianej perforyny po kontakcie z komórką docelową oceniono z wykorzystaniem testu ELISA. Pomiaru stężenia  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  dokonano zarówno w modelu *in vitro* w zmetabolizowanej pożywce hodowlanej, jak i *in vivo* w płynie śródmiąższowym guza oraz płynie podskórnym. Mikroskopię konfokalną zastosowano do oceny pH lizosomów wydzielniczych komórek NK. Do oceny mechanizmu zabijania wykorzystywanego przez komórki NK wykorzystano komórki linii HeLa charakteryzujące się ekspresją cząsteczki CD48 oraz transfekowanych wektorem NES-ELQTD-mGFP-T2A-NES-RIEADS-RFP. Narzędzie to pozwala na ocenę aktywacji kaspazy 8 oraz granzymu B w komórkach docelowych w wyniku zabicia przez komórki NK. Mikroskopię wykorzystano również do oceny zdolności komórek NK do seryjnego zabijania komórek docelowych K562.

Uzyskane wyniki wskazują, że w środowisku nowotworu znajdują się drobnocząsteczkowe metabolity, które hamują naturalną cytotoksyczność komórek NK. Jednym z nich jest  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ , którego stężenie w warunkach *in vitro* mieści się w granicach od 0,6 mM do 1,7 mM, zaś *in vivo* od 0,3 mM do 4,8 mM. Eksperymenty wykazały, że  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  upośledza cytotoksyczność komórek NK, w tym również ich zdolność do seryjnego zabijania komórek nowotworowych bez wpływu na ich żywotność. Uzyskane wyniki wskazują, że molekularnym mechanizmem odpowiedzialnym za hamowanie aktywności komórek NK przez  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  jest zmiana pH lizosomów wydzielniczych, przez co zostaje upośledzony proces dojrzewania i wydzielania perforyny. Zaobserwowano również powtórna degranulację w obecności  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ , co sprzyja gromadzeniu się na powierzchni komórek NK FasL i aktywacji kaspazy 8. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń mogą przyczynić się do dokładniejszego poznania immunosupresyjnego wpływu środowiska guza na działanie komórek NK, co w przyszłości potencjalnie może pozwolić na zwiększenie skuteczności stosowanych immunoterapii z wykorzystaniem komórki NK.