

STRESZCZENIE

Przeprogramowanie mikrośrodowiska guza raka jajnika przy wykorzystaniu wirusoterapii onkolitycznej wycelowanej w oś sygnałową CXCL12/CXCR4

Rak jajnika jest jednym z najczęstszych nowotworów ginekologicznych i charakteryzuje się najwyższym wskaźnikiem śmiertelności. Często diagnozuje się go w zaawansowanym stopniu, gdy u pacjentów pojawiają się już przerzuty. W takich przypadkach terapie pierwszej linii leczenia, takie jak operacyjne usunięcie guza i chemioterapia często są nieskuteczne. Niepomyślne rokowanie i wysoki wskaźnik śmiertelności u pacjentów w zaawansowanym etapie nowotworzenia mogą być związane z rozległymi przerzutami wewnątrztrzewnowymi i opornością na chemioterapię. Dostępne obecnie leczenie może wydłużyć przeżycie wolne od progresji, ale nie wpływa na ogólną przeżywalność, co wskazuje, że są potrzebne nowe, ulepszone strategie terapeutyczne. Skuteczność leczenia metodą immunoterapii jest bezpośrednio uzależniona od odpowiedzi immunologicznej na słabo immunogenne antygeny nowotworowe, zarówno własne jak i neoantygeny. W tej pracy zbadalam wpływ onkolitycznej wirusoterapii, z wykorzystaniem rekombinowanego wirusa krowianki wykazującego ekspresję antagonisty receptora CXCR4, na nabytą i wrodzoną odpowiedź układu odpornościowego, co w efekcie doprowadziło do kontroli wzrostu guza. Badania przeprowadziłam używając ortotopowo rosnące komórki raka jajnika wykazujące ekspresję dużego antygeny T SV40 w tolerogennych i dzikich myszach. Mysie modele, takie jak antygenowo-naiwne myszy dzikiego typu i transgeniczne myszy TgMISIIR-TAg-Low wykazujące ekspresję antygeny T SV40 w komórkach nabłonka wyścielającego jajowody pod kontrolą promotora genu receptora typu II czynnika hamującego rozwój przewodów Müllera jako własny, są odpowiednie do badań mających na celu zwiększenie zrozumienia biologii limfocytów T w kontekście toleroennego mikrośrodowiska nowotworowego.

Przy użyciu techniki barwienia immunologicznego oraz sekwencjonowania RNA na poziomie pojedynczej komórki porównałam zmiany fenotypowe i transkryptomiczne w otrzewnowym mikrośrodowisku nowotworowym nieleczonych guzów u tolerogennych myszy TgMISIIR-TAg-Low. Równolegle te same analizy zostały wykonane u myszy dzikiego typu dla których antygen T SV40 pełnił funkcję neoantygeny. Badania wykazały różnice w tumorogenności komórek raka jajnika MOVCAR 5009, które wykazują ekspresję

antygeny T SV40, pomiędzy dwoma modelami myszy. Myszy transgeniczne *TgMISIIR-TAg-Low* charakteryzowały się słabą aktywacją immunologiczną i obecnością związanych z nowotworem makrofagów (TAM) spolaryzowanych w kierunku typu M2 oraz fibroblastów związanych z nowotworem (CAF) wykazujących właściwości immunosupresyjne. Natomiast analizy przeprowadzone na myszach dzikiego typu, niepoddanych żadnej terapii, wykazały obecność limfocytów T CD8⁺ skierowanych przeciwko antygenowi T SV40, zrównoważoną M1/M2 transkryptomiczną sygnaturę makrofagów oraz obecność fibroblastów o właściwościach immunostymulujących.

Dodatkowo wykazałam, że dootrzewnowe podanie rekombinowanego wirusa krowianki wykazującego ekspresję antagonisty receptora CXCR4 prowadzi do indukcji limfocytów T CD8⁺ skierowanych przeciwko antygenowi T SV40 w obu modelach myszy, ale ich skuteczność terapeutyczna i stan aktywacji jest odmienny. W mikrośrodowisku guza u myszy dzikiego typu poddanych wirusoterapii OV-CXCR4-A, limfocyty T CD8⁺ wykazywały podwyższoną ekspresję genów ważnych dla regulacji rozwoju, różnicowania i przeżycia limfocytów T, regulacji ich homeostazy, aktywacji i utrzymania komórek efektorowych oraz funkcji efektorowych limfocytów T cytotoksycznych. Jednakże limfocyty T CD8⁺ u myszy *TgMISIIR-TAg-Low*, mimo że zachowały częściowo ekspresję genów komórek efektorowych, wykazywały cechy dysfunkcyjnych limfocytów skierowanych przeciwko komórkom nowotworowym. Miały one zwiększoną ekspresję genów związanych z „wyczerpaniem” indukowanym przez guza oraz mniejsze wiązanie tetrameru TCR_{Tag-1} w porównaniu z limfocytami T CD8⁺ pochodzącymi od myszy typu dzikiego. Ponadto zmiany w sygnaturze transkryptomicznej limfocytów T CD8⁺ odpowiadały ich zmienionym właściwościom funkcjonalnym. Testy funkcjonalne wykazały, że limfocyty T CD8⁺ były mniej skuteczne w hamowaniu wzrostu guza u myszy *TgMISIIR-TAg-Low* i wykazywały zmniejszoną aktywność cytotoksyczną po terapii OV-CXCR4-A w porównaniu z ich odpowiednikami u myszy typu dzikiego. Dalsze badania polegające na usunięciu limfocytów T CD8⁺ lub CD4⁺ wykazały, że to limfocyty T CD8⁺ były głównie odpowiedzialne za terapeutyczny wpływ zastosowanej wirusowej terapii onkologicznej. Rozprzestrzenianie się antygenów powodowane wirusoterpią OV-CXCR4-A oraz aktywacja antygeny T SV40 mogą przeprogramować niewrażliwe limfocyty T CD8⁺ skierowane przeciwko komórkom nowotworowym u myszy *TgMISIIR-TAg-Low*. Ponadto zastosowana terapia wirusowa

doprowadziła do niemal całkowitej eliminacji fibroblastów oraz polaryzacji makrofagów w kierunku typu M1 u myszy transgeniczných.

Moje obserwacje podkreślają potencjał modelu mysiego *TgMISIR-TAg-Low* w przedklinicznej ocenie leków w terapii onkologicznej raka jajnika. Uzyskane wyniki pokazały, że u immunokompetentnych myszy obarczonych rakiem jajnika, terapia oparta na rekombinowanym wirusie krowianki wykazującym ekspresję antagonisty receptora CXCR4, poprzez celowanie w immunosupresyjne interakcje pomiędzy makrofagami a fibroblastami, wywołuje odpowiedzi CD8⁺ limfocytów T, które uczestniczą w kontroli wzrostu guza jajnika. Ta metoda znacznie zwiększa skuteczność terapeutyczną i może prowadzić do nowych, skutecznych interwencji immunoterapeutycznych.