

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. L. HIRSZFELDA
POLSKA AKADEMIA NAUK



Bożena Ścirka

„Zróżnicowanie repertuaru receptorów antygenowych limfocytów T (TCR) w przebiegu eksperymentalnej immunoterapii mysiego czerniaka B16 przeciwciałem anti-GITR.”

„Diversity of the repertoire of T-cell antigen receptors (TCR) in the course of experimental immunotherapy of B16 melanoma with anti-GITR antibody.”

Promotor:

dr hab. Arkadiusz Miązek

Wrocław 2019

STRESZCZENIE

Limfocyty T (T reg) są subpopulacją limfocytów T, która hamuje odpowiedź immunologiczną i indukuje tolerancję wobec własnych antygenów. Hamowanie odpowiedzi immunologicznej może również prowadzić do osłabienia odpowiedzi przeciwnowotworowej. Szereg badań naukowych potwierdza, że nagromadzenie tych komórek w obrębie nowotworu promuje jego wzrost. Dlatego też, istotnym celem immunoterapii przeciwnowotworowej jest wybiórcze osłabienie aktywności supresorowej limfocytów T regulatorowych i jednocześnie promowanie aktywności limfocytów T efektorowych, specyficznych wobec antygenów nowotworowych. Obiecującą strategią immunoterapii testowanej na mysim modelu doświadczalnym jest stymulacja receptora GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein - CD357) agonistycznym przeciwciałem monoklonalnym DTA-1. Częsteczka GITR jest transbłonowym białkiem typu I o długości 228 aa, należącym do rodziny TNF. Występuje w dużej gęstości na powierzchni T reg i aktywowanych T ef. Badania *in vitro* i *in vivo* wskazują, że równoczesna stymulacja cząsteczek GITR i receptorów dla antygeny (TCR) powoduje zahamowanie funkcji supresorowej T reg i wpływa na aktywację komórek efektorowych. Podjęte w pracy badania mają na celu zidentyfikowanie jak wiązanie GITR, przez przeciwciało DTA-1, wpływa na klonalną różnorodność i funkcje komórek T, swoistych dla antygenów nowotworowych.

Badania oparto na unikalnym modelu myszy $TCR^{mini}Foxp3^{GFP}$, których różnorodność receptorów TCR została ograniczona w celu umożliwienia monitorowania zmian w ich repertuarze na poziomie pojedynczych, funkcjonalnie odrębnych klonów, swoistych dla antygenów nowotworowych. Dzięki temu możliwa jest pełna charakterystyka repertuarów receptorów TCR na różnych subpopulacjach limfocytów zaangażowanych w odpowiedź przeciwnowotworową. U myszy TCR^{mini} , których wszystkie receptory posiadają ten sam transgeniczny łańcuch $TCR\beta$ ($V\beta 14D\beta 2J\beta 2.6$), różnorodność łańcuchów $TCR\alpha$ ogranicza rearanżujący mini locus złożony z pojedynczego segmentu $V\alpha 2.9$ oraz 2 segmentów $J\alpha$ ($J\alpha 26$ i $J\alpha 2$). Myszy te rozwijają normalnie funkcjonujące subpopulacje limfocytów T o zredukowanym, poliklonalnym repertuarze receptorów $TCR\alpha\beta$. Dodatkowo myszy $TCR^{mini}FoxP3^{GFP}$ posiadają genetyczny znacznik limfocytów T reg ($FoxP3^+$), w postaci ekspresji zielonego białka fluorescencyjnego (GFP). Część wstępnych doświadczeń wykonano na myszach

transgenicznych FoxP3^{GFP}. Posiadają one wyżej opisany znacznik komórek regulatorowych w kontekście niezawężonego repertuaru TCR myszy, szczepu C57Bl/6 (B6).

Jako nowotwór modelowy wykorzystano myszą linię czerniaka B16, zmodyfikowaną genetycznie do ekspresji neo-antygeny (peptyd Ep63K). Ten neo-antygen jest prezentowany na powierzchni komórek czerniaka B16 w kontekście MHC klasy II-A^b, (II-A^bEp63K). We wcześniejszych pracach wykazano, że tak zmieniona linia czerniaka B16, po podskórnym wszczepieniu myszom transgenicznym TCR^{mini}FoxP3^{GFP}, aktywuje co najmniej 20 różnych receptorów TCR komórek T CD4⁺ efektorowych. Częstość występowania i obecność wśród różnych populacji limfocytów T wspomnianych receptorów, daje możliwość wglądu w przebieg odpowiedzi przeciwnowotworowej i jej modulacji na skutek podania przeciwciała DTA-1. W trakcie realizacji projektu założono ocenę:

- wpływu immunoterapii anty-GITR na zahamowanie kinetyki wzrostu guza nowotworowego,
- wpływu immunoterapii anty-GITR na zmiany w populacjach komórek T reg i T ef podczas rozwoju nowotworu,
- analizę wrażliwości komórek T ef na supresyjne działanie T reg izolowanych z guzów i węzłów chłonnych drenujących, podczas rozwoju choroby i terapii przeciwciałem DTA-1,
- wpływu immunoterapii anty-GITR na repertuar receptorów TCR komórek T reg i T ef w odpowiedzi na nowotwór.