

Proteomiczna charakterystyka odpowiedzi immunologicznej w stanach zapalnych i nowotworach

Msc, Víctor Urbiola-Salvador

Układ odpornościowy jest niezbędny do ochrony organizmu przed patogenami, uszkodzeniami tkanek i komórkami nowotworowymi. Wszelkie zaburzenia równowagi w tej złożonej sieci immunologicznej mogą powodować wiele rodzajów patologii, a w skutek utrzymującego się stanu zapaleniu mogą rozwinąć się przewlekłe procesy zapalne. Rak i przewlekłe choroby zapalne zwiększają swoją częstość występowania i są najczęstszymi przyczynami zgonów. Zapalenie związane z rakiem stało się ważną cechą charakterystyczną raka, szczególnie w przypadku raka jelita grubego (CRC), podczas gdy brak równowagi między prozapalnymi i supresyjnymi komórkami odpornościowymi i białkami przyczynia się do wyżej wymienionych chorób. Pomimo dużych postępów w diagnostyce i leczeniu, takich jak immunoterapie w przypadku raka, większość pacjentów nie wykazuje całkowitej odpowiedzi i rozwija lekooporność za pośrednictwem alternatywnych mechanizmów immunosupresyjnych. Dlatego pilnie potrzebne jest głębsze zrozumienie skomplikowanych sieci odpowiedzi immunologicznych zaangażowanych w choroby. Rozwój proteomiki klinicznej umożliwia wysokoprzepustową kwantyfikację białek. Niniejsza rozprawa koncentruje się na zastosowaniu podejść proteomicznych do scharakteryzowania odpowiedzi immunologicznych w kontekście zapalenia i raka, mając na celu zidentyfikowanie nowych regulatorów odpornościowych i odkrycie potencjalnych biomarkerów. Zakażenie SARS-CoV-2 powoduje ostry stan zapalny, który może rozwinąć się w zaostrzonych odpowiedziach immunologicznych, zwłaszcza u pacjentów z chorobami współistniejącymi, takimi jak przewlekłe choroby zapalne i nowotwory. W pierwszej części pracy zastosowano podejścia proteomiki ortogonalnej, spektrometrii masowej i technologii PEA (proximity extension assay) do badania próbek osocza od pacjentów z COVID-19 cierpiących na wcześniejsze choroby współistniejące jak i bez nich oraz odpowiednich kontroli w celu określenia zmian białek osocza związanych z zakażeniami SARS-CoV-2, czasu zakażenia i specyficznych odpowiedzi anty-SARS-CoV-2. Obie technologie wykazały, że pacjenci z COVID-19 cierpiący na choroby współistniejące mieli wspólną sygnaturę białkową charakteryzującą się zmianami w białkach wrodzonej odporności, w tym układu dopełniacza i białek ostrej fazy, takich jak α -2-antyplazmina, które mogą przyczyniać się do komplikacji procesu krzepnięcia po przebytej chorobie COVID-19. Wykryto kluczowe białka odpornościowe, w tym CD4 wraz z powiązаныmi białkami, takimi jak CD28 i przeciwdrobnoustrojowe BST2. Ponadto białka związane z przebudową i uszkodzenia tkanek, takie jak MATN2 i COL6A3 oraz białka macierzy zewnątrzkomórkowej ECM1 i keratyny K22E, mogą być nowymi biomarkerami wczesnego wykrywania. Kilka z nich nie zostało wcześniej zgłoszonych, w tym podwyższone RBP2 i obniżona ekspresja RNF41 w COVID-19.

Diagnostyka CRC bazuje głównie na programie badań przesiewowych, które opierają się na kosztownej i inwazyjnej kolonoskopii, podczas gdy prognoza CRC jest głównie określana poprzez stadium guza w momencie wykrycia przy niskich wskaźnikach przeżycia w zaawansowanych stadiach. Dlatego biomarkery obecne w krwi są obiecującą alternatywą dla poprawy diagnostyki CRC. W drugiej części pracy, wcześniej zoptymalizowane podejścia proteomiczne zostały zastosowane do próbek osocza z wieloosrodkowej kohorty CRC i zdrowych kontroli w celu określenia zmian białkowych zaangażowanych w rozwój CRC, progresję i stan zapalny związany z rakiem. Wykryte na podstawie MS zmiany białkowe u pacjentów z CRC były związane z metabolizmem cholesterolu, w tym APOC2 związanym z postępem CRC, kilkoma członkami rodziny SERPIN i układem dopełniacza, w tym C5, C1QB, a także C4B i C8A, związanymi ze stanem zapalnym związanym z rakiem i postępem CRC. Co ważne, zwiększone stężenie C5 w CRC zostało potwierdzone w dodatkowej kohorcie. Ponadto po raz pierwszy wykryto zwiększone stężenie prozapalnych LBP i SAA4 w CRC, podczas gdy białko ostrej fazy LRG1 i ceruloplazmina były powiązane ze stanem zapalnym związanym z rakiem. Analiza PEA wykazała zmiany białek w osoczu również związane ze stanem zapalnym, takie jak MDK, białka związane z aktywowanymi szlakami sygnałowymi Th17 i onkogennymi na poziomie ogólnoustrojowym. Ponadto, po raz pierwszy wykryto zwiększone stężenie atraktantów limfocytów typu T CXCL9 i CCL23 w osoczu CRC co zostało potwierdzone w dodatkowej kohorcie CRC. IFNG γ , IL17C i IL32 były powiązane z wczesnymi stadiami CRC, podczas gdy ACP6, FLT4 i MANSC1 były powiązane z późnymi stadiami, co czyni je obiecującymi biomarkerami prognostycznymi.

. W ostatniej części, wysokoprzepustowa analiza proteomiczna oparta o MS była wykorzystana do określenia zmian białek komórek odpornościowych w mikrośrodowisku guza (TME) w tkankach CRC i pasujących tkankach niezmiennych nowotworowo wzbogaconych w komórki T CD4 + i inne komórki odpornościowe. Profile ekspresji białek w tkance CRC odzwierciedlały trwające procesy nowotworowe i zaburzenie integralności tkanki w obrębie TME CRC, w tym zaburzenie cyklu komórkowego i innych cech charakterystycznych raka, takie jak angiogeneza, dysregulacja apoptozy, macierzystość komórek rakowych i przebudowa pozakomórkowa. Co ważne, odkryto złożoną sieć zwiększonej ekspresji białek odpornościowych w TME CRC z prozapalnymi białkami wrodzonej odporności S100A12, S100A8 i S100A9, a także mediatorami immunosupresyjnymi, takimi jak CD276, PVR i NT5E. Co więcej, ekspresja białek wskazywała na wysoką heterogeniczność immunologiczną komórek ze współistnieniem wysokiego poziomu fibroblastów związanych z rakiem (CAF) produkujących FGF2 wraz z ekspresją monocytów/makrofagów prezentujących białko odpornościowe punktu kontrolnego ICOSL, z czego oba zostały powiązane z progresją

CRC po raz pierwszy. Ponadto, wyższa zawartość Treg, aktywowanych komórek tucznych i limfocytów typu B, a także redukcja komórek plazmatycznych IgA i komórek NK CD56 została przewidziana w TME CRC. Co ciekawe, zwiększona ekspresja białek kaskady dopełniacza w CRC potwierdziła wyniki analizy osocza CRC, co sugeruje ich właściwości immunosupresyjne w TME. Przewidziana ilość Treg była skorelowana z aktywną prezentacją MHCII z GILT, która może pośredniczyć w odpowiedziach tolerogennych i immunosupresyjnemu przeprogramowaniu metabolicznemu poprzez pozbawienie tryptofanu (KYNU, IDO1, AHR), argininy (ARG1) i tauryny (SLC6A6). Oprócz nowych potencjalnych regulatorów odpornościowych w obrębie CRC TME, MCEMP1 może odgrywać istotną rolę w adhezji i migracji komórek mieloidalnych i limfocytów typu T, zwłaszcza Treg.

Podsumowując, niniejsza praca dyplomowa przyczyniła się do scharakteryzowania białek związanych z odpowiedziami immunologicznymi w stanach zapalnych i nowotworach. Nowe białka osocza związane z zakażeniem SARS-CoV-2 w przypadku przewlekłych stanów zapalnych i w CRC dostarczają nowych spostrzeżeń na temat rozwoju choroby. Dane wygenerowane w ramach niniejszej pracy dyplomowej mogą ułatwić opracowanie nowych biomarkerów klinicznych poprzez dalsze badania walidacyjne w większych i bardziej zróżnicowanych kohortach w celu oceny ich wykonalności w zastosowaniach klinicznych. Szeroka charakterystyka CRC TME z wysoką infiltracją immunologiczną ujawniła wiele białek związanych z komórkami i układem odpornościowym, które mogą być nowymi regulatorami odporności. Dalsze badania funkcjonalne mogą ułatwić określenie podstawowych mechanizmów molekularnych zaangażowanych w odpowiedzi immunologiczne TME CRC.