

Streszczenie

Układ odpornościowy człowieka składa się z różnorodnych cząsteczek, komórek odpornościowych oraz tkanek i ma jeden główny cel – ochrona gospodarza. Niezależnie od tego, czy jest to skuteczne usuwanie infekcji, naprawa tkanek czy eliminacja komórek nowotworowych, układ odpornościowy jest niezbędnym elementem tego procesu. W stanie homeostazy składniki odporności wrodzonej i nabytej działają wspólnie, jednak rozregulowanie któregośkolwiek z nich prowadzi do stanów patologicznych, takich jak przewlekłe zapalenie albo nowotwór. Ludzkie jelita są bardzo narażone na potencjalnie szkodliwe czynniki zewnętrzne, jednocześnie będąc gospodarzem komensalnego mikrobiomu. Dlatego ludzkie jelita są bogate w komórki odpornościowe gotowe do przeprowadzenia reakcji w razie potrzeby, jednocześnie wykazując tolerancję na naturalną mikroflorę. Uważa się, że 70% układu odpornościowego znajduje się w tkance limfatycznej związanej z jelitami (GALT - *ang.* gut-associated lymphoid tissue). W związku z tym tkanka śluzowej jelit zawiera dużą liczbę limfocytów typu T. Limfocyty typu T odgrywają znaczącą rolę w rozwoju choroby zapalnej jelit (IBD - *ang.* inflammatory bowel disease) i raka jelita grubego (CRC - *ang.* colorectal cancer). W szczególności limfocyty T pomocnicze 17 (Th17) i limfocyty T regulatorowe (Treg) w ostatnich latach zwróciły uwagę w kontekście IBD i CRC. Th17 stanowią podgrupę prozapalną, która wywołuje stan zapalny prowadzący do IBD, podczas gdy główną rolą Treg jest regulacja odpowiedzi immunologicznej. Jednakże wzmożony naciek Treg prowadzi do powstania środowiska immunosupresyjnego i sprzyja wzrostowi nowotworów. Co więcej, IBD jest uważana za jeden z czynników ryzyka rozwoju CRC. Dlatego zrozumienie odpowiedzi immunologicznej, a zwłaszcza odpowiedzi immunologicznej za pośrednictwem Th17 i Treg, ma kluczowe znaczenie dla rozwoju efektywnego leczenia.

W związku z tym pierwsza część tej rozprawy skupia się na identyfikacji jaki wpływ mają różne warunki hodowli na mikroflorę jelitową i późniejszy rozwój zapalenia jelita grubego w modelach myszy z adopcynnym transferem komórek T indukującym zapaleniem jelita grubego. Wykazano, że szczepy *Helicobacter* i *Klebsiella oxytoca* korelują ze zwiększoną liczbą limfocytów T CD4+ IFN- γ i limfocytów T CD4+ IL-17+, podczas gdy *Akkermansia muciniphila* wykazywała ujemną korelację z rozwojem zapalenia jelita grubego. Następnie, osobny myszy model zapalenia jelita grubego wywołany działaniem siarczanu sodu dekstranu (DSS) został użyty w celu zbadania roli proteazy USP28 w rozwoju limfocytów typu T. Knock-out USP28 doprowadził do zwiększonej aktywności supresyjnej Treg i dodatkowo stwierdzono udział USP28 w sygnalizacji IL-22/STAT5. Łącznie badania te ujawniły dodatkowe aspekty kontroli Th17 i Treg.

Druga część rozprawy obejmowała badania wykonane na skrawkach tkanek CRC z blochków parafinowych (FFPE – *ang.* formalin-fixed paraffin embeded) w celu zbadania zmian molekularnych związanych z infiltracją komórek odpornościowych. Analiza transkryptomiki przestrzennej mikrośrodowiska guza (TME - *ang.* tumor microenvironment) ujawniła wyjątkową zwiększoną ekspresję genów, takich jak TP53 lub CD276 w skupiskach komórek nowotworowych, a także ujawniła gradienty ekspresji genów wzdłuż trajektorii inwazyjnej ze zidentyfikowanymi interakcjami Treg z makrofagami i komórkami CRC w TME. Ponadto stwierdzono, że SIT1, negatywny regulator aktywacji limfocytów T, charakteryzuje się zróżnicowaną ekspresją w trzeciorzędowych strukturach limfatycznych (TLS – *ang.* tertiary lymphoid structure) w tkance nowotworowej jako potencjalny nowy wskaźnik upośledzenia funkcji limfocytów typu T w CRC. Następnie, analiza proteomiczna tkanek CRC wzbogaconych w CD4+ oparta o spektrometrię mas ujawniła złożone wzorce ekspresji białek związanych z unikaniem odpowiedzi immunologicznych, takich jak NPM3, i jednoczesną ekspresję prozapalnych białek S100A8 lub S100A9 w tkankach CRC. Jednocześnie stwierdzono, że przewidziane frakcje Treg w tkankach korelują z ekspresjąIDO1 i ARG1, białek związanych z immunosupresją w TME. Poza tym zidentyfikowano selektywną ekspresję MCEMP1 w próbkach CRC w porównaniu z normalną tkanką, podczas gdy w zbiorze danych walidacyjnych,

komórki T CD4+ wyizolowane z próbek CRC wykazują wyższą ekspresję MCEMP1, co może wskazywać na potencjalną rolę regulacyjną tego białka w limfocytach T w CRC TME. Badania CRC FFPE dostarczyły nowych aspektów bieżącej regulacji genów i białek regulujących krajobraz odpowiedzi immunologicznej w TME.

Ostatnia część rozprawy obejmuje dwa badania proteomiczne, w których badano zmiany ekspresji białek w surowicy pacjentów z CRC oraz zdrowych osób z grupy kontrolnej. Badanie przeprowadzone za pomocą PEA (PEA - *ang.* proximity extension assay) wykazało specyficzną zwiększoną ekspresję białek, takich jak chemoatraktant limfocytów typu T CXCL9 i CCL23 oraz IL-6 wraz z onkogennym SCRIN1 z jednoczesną zmniejszoną ekspresją supresorowego białka RET w próbkach surowicy pacjentów z CRC w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Jednocześnie poziomy CSF3, IL12RB1 i CD276 były specyficznie podwyższone w próbkach surowicy pacjentów ze stwierdzonym stanem zapalnym, w porównaniu z pacjentami bez stwierdzonego zapalenia. Dodatkowo stwierdzono, że zwiększenie poziomu IFN- γ , IL-32, IL-17 i ACP6 koreluje odpowiednio z wczesnym i późnym stadium choroby. Zwiększenie poziomu ekspresji CSF3, IFN- γ , IL6, CXCL9, CCL23 i ACP6 potwierdzono w oddzielnej kohorcie. Badanie to dostarczyło kilku nowych potencjalnych biomarkerów diagnostycznych CRC. Jednocześnie badanie LC-MS/MS białek surowicy pacjentów z CRC po raz pierwszy wykazało podwyższone poziomy LBP i SAA4 związane z kancerogenezą CRC. Jednocześnie białka układ dopełniacza, mianowicie C5, C1QB, C4A, C8A, uległy zwiększeniu w warunkach CRC, przy czym zwiększone poziomy C4A i C8A powiązано z późniejszymi stadiami choroby. Dodatkowo potwierdzono ekspresję C5 w oddzielnej kohorcie, co wskazuje na jej potencjalną rolę jako biomarkera.

Podsumowując, niniejsza rozprawa przedstawia serię badań mających na celu rozszyfrowanie heterogeniczności odpowiedzi immunologicznych powiązanych z funkcjami komórek T, zwłaszcza Th17 i Treg, oraz powiązanymi zmianami w ekspresji białek i genów na tle nowotworu i stanu zapalnego.