

1. Raziskovalna organizacija:

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

2. Ime in priimek mentorja:

Prof. Dr. Borut Štrukelj

3. Področje znanosti iz šifranta ARRS:

Biokemija in molekularna biologija

4. Kontaktni e-naslov mentorja:

Borut.strukelj@ffa.uni-lj.si

5. Kratak opis dela in nalog:

Na primeru človeškega raka jajčnikov bo mladi raziskovalec v okviru predlaganega projekta razvijal nove poti zdravljenja malignih bolezni s preučevanjem/popravljanjem z rakom-povezanih imunskih odzivov, kot nov porajajoč pristop tumorske terapije. Cilj projekta bo določiti in vzpostaviti nov pristop za premagovanje z rakom-povezanih imunskih nepravilnosti.

V človeških ex vivo eksperimentih bo mladi raziskovalec analiziral biološke osnove z rakom-povezanih imunskih nepravilnosti, t.j. mehanizme, ki nastopajo pri privabljanju in indukciji imunosupresivnih MDSC in Treg celic, celic Th17, kot tudi pri zaviranju tumoricidnih funkcij infiltriranih efektorskih celic, ter na osnovi pridobljenih rezultatov določil strategije za nasprotovanje tovrstnim fenomenom. Hkrati bo ovrednotil mehanizme, ki spremljajo TCR-odvisno/neodvisno prepoznavanje in uničevanje rakavih celic in določil optimalne pogoje za indukcijo z dendritičnimi celicami (DC)-aktivirane efektorske celice. Primarni cilji dela mladega raziskovalca bodo:

1) Ovrednotenje lastnosti in funkcionalnosti tumor-infiltriranih supresorskih celic (MDSC/Treg), Th17 celic in efektorskih celic (CTL/Th1/NK) celic, ter citokinov in kemokinov, ki so udeleženi pri njihovem razvoju in zadrževanju pri rakavih bolnikih.

2) Analiza mehanizmov:

- a) regulacije privlačenja supresorskih celic v primerjavi z efekorskimi celicami,
- b) de novo indukcije mieloidnih supresorskih celic (MDSC), regulatornih celic T (Treg) in celic Th17,
- c) vpliva celic Th17 na funkcije efektorskih/supresorskih celic,
- d) zaviranja ubijalskih funkcij citotoksičnih limfocitov T (CTL) in naravnih celic ubijalk (NK) v/iz tumorskem/ega okolju/a ter razvoj učinkovitih protitumorov. .

3) Ovrednotenje mehanizmov posameznih bioloških dejavnikov vključenih v regulacijo tumorskega mikrookolja. Identifikacija koristnih in neželenih dejavnikov, pomen aktivacije/inhibicije teh dejavnikov za optimalen protitumorski učinek.

4) Razvoj optimiziranih metod pridobivanja in antigenske obdelave zrelih DC z namenom maksimalne indukcije CTL in Th1 protitumorskih odzivov.

Identifikacija ključnih mehanizmov prepoznavanja in uničevanja tumorskih celic bo omogočila načrtovanje novih strategij, potrebnih za uspešno zdravljenje rakavih bolnikov. Pričakujemo, da bodo te novo postavljene strategije omogočile i) odstranitev rakavih celic, ii) uspešno nasprotovanje imunski supresiji, ki jo posredujejo MDSC in Treg, iii) vzpostaviti lokalni imunski nadzor ter iv) zakasnit ali preprečiti ponovitev bolezni.

Epitelijski rak jajčnikov (ki predstavlja 90% raka jajčnikov) je najbolj smrtna oblika ginekoloških rakov in je sedmi najpogostejši vzrok smrti rakavih obolenj pri ženskah. Zaradi nespecifičnih kliničnih simptomov in težavne diagnostike pri 70% bolnicah bolezni ni diagnosticirana dokler rak ne metastazira in doseže stopnjo III ali IV. Kljub significantnim kirurškim napredkom ter kemoterapiji, je v primeru 70% bolnic večja verjetnost ponovitve bolezni, pri čemer bolnice prestanejo več obdobjev ponovitev bolezni in izboljšanja, ki so vedno krajša v času, predno postane tumor rezistenten na

kemoterapijo (rezistenca je prevladujoča v večini primerov). Visok delež kliničnih odzivov po primarni terapiji ter kasnejši visok delež ponovitev bolezni pri bolnicah z rakom jajčnikov kaže na dejstvo, da je pri velikem številu žensk bolezni subklinično prisotna po končani terapiji. Smatra se, da so ravno te bolnice z minimalno rezidualno boleznijo, ki so klinično v fazi izboljšanja, idealne kandidatke za imunoterapijo. Vendar pa za bolnice z rakom jajčnikov ne obstaja uveljavljenih strategij imunske terapije. Zato so študije, kakršna je trenutno predstavljena, ki se osredotočajo na izboljšanje možnosti zdravljenja bolnic, ključne za nadzorovanje bolezni.

Ker je imunski nadzor pomemben element gostiteljevega protitumorskega odziva, bo mladi raziskovalec v okviru svojega dela preučeval načine izboljšanja tumorske terapije s popravljanjem s tumorjem-povezanih imunskih nepravilnosti na primeru raka jajčnikov. Ta vrsta raka ima značilni immunosupresivni značaj, ki igra pomembno vlogo za agresivni značaj te oblike raka, in je zato primeren model za predlagano preučevanje s tumorjem-povezanih imunskih nepravilnosti. Ko stopnja raka napreduje pacientke izkazujejo progresivno poslabšanje imunskih odzivov, kar nakazuje na dejstvo, da je tumor razvil mehanizme, ki spreobrnejo imunske odzive in zavirajo imunski nadzor. Pomen imunskega sistema pri nadzoru in eliminaciji raka jajčnikov je razviden iz opažanj, da preživetje bolnic z rakom jajčnikov sovпада s prisotnostjo tumor-infiltriranih limfocitov (TIL) in zavisi od same vrste tumor-infiltrirajočih imunskih celic. Poleg tega je za napredovanje raka jajčnikov in napredovale stopnje te bolezni, ki so povezane s povečanimi imunskimi nepravilnostmi, značilen pogost nastanek ascitesa, ki ga zlahka pridobimo, saj ga je ob kirurškem posegu potrebno odstraniti. Ascites nameravamo pridobiti v sodelovanju z Ginekološko kliniko v Ljubljani. Uporaba ascitesa za namene predlaganega projekta je odobrena s strani Komisije za medicinsko etiko: KME 21k/08/11.

Rezultati dela mladega raziskovalca bodo pripomogli k postavitvi novih vodil imunske terapije raka jajčnikov z:

1. razvojem pristopov za premagovanje številnih mehanizmov, ki jih tumor razvije za uspešen izogib pred imunskim nadzorom, kot tudi
2. načrtovanjem strategij za indukcijo imunskega odziva, ki bo sposoben odstranitve tumorja ter preprečitve ponovitve bolezni.

Ad 1. Nepravilnosti s tumorjem-povezanega imunskega odziva

Identifikacija pomembnih subpopulacij levkocitov v tumorskem okolju raka jajčnikov bo omogočila preučevanje mehanizmov njihovega nastanka/supresije, neustrezne funkcije ter možnih imunomodulatornih učinkov protitumorske terapije.

A. Dendritične celice (DC), supresivni makrofagi in mieloidne supresorske celice (MDSC) Molekularne mehanizmi, ki so vključeni v negativno uravnavanje funkcij DC, ostajajo pretežno nepojasneni. Nedefiniranost osnovnih zahtev za nastanek MDSC ter navidez multi-faktorski način indukcije funkcionalnih MDSC ustvarja očitne ovire za razvoj učinkovitih ukrepov za zaviranje ali promocijo nastanka MDSC v terapevtske namene. Vzpostavitev pozitivne povratne zanke med prostaglandinom E_2 (PGE_2) in COX2, ključnim regulatorjem sinteze PGE_2 , predstavlja odločujoč dejavnik pri preusmeritvi nastanka $CD1a^+$ DC v $CD14^+CD33^+CD34^+$ monocitnih MDSC. Vendar natančen mehanizem povečanega izražanja COX2 v tumor-infiltriranih $CD11b^+$ celicah ostaja nepojasnen. Med številnimi mehanizmi indukcije COX2 izražanja, bo mladi raziskovalec preučeval vlogo nekaterih nedavno predlaganih poti, vključno s hipoksijo (HIF-1), TLR signalizacijo, vnetnimi citokini in celično aktivacijo preko adhezije na zunajcelični matriks, pri nastanku MDSC.

B. Efektorske celice, t.j. $CD8^+$ celice T, Tregs, celice Th17, Th2 vs. celicam Th1 V oziru limfocitnih odzivov se bo mladi raziskovalec posvetil interakciji mieloidnih supresorskih celic z efektorskimi celicami- $CD8^+$ in $CD4^+$ celicami T, predvsem immunosupresivnimi celicami Treg ter njihovimi vnetnimi T celičnimi analogi, IL-17-producirajočimi Th celicami (Th17), pri protitumorskem odzivu. V tem oziru bo raziskoval pomembno, s Th odzivi povezano tematiko, in sicer plastičnost celic Th17/Treg. Poleg tega bomo v okviru projekta preučevali vlogo celic Th17, za katere je znano, da promovirajo vnetje, bodisi pri tumorski rasti in/ali tumorski regresiji.

C. Citokini, kemokini in drugi s tumorjem-povezani immunosupresivni dejavniki V okviru predlagane tematike bo mladi raziskovalec testiral zmožnost različnih dejavnikov prisotnih v okolju raka jajčnikov, da neposredno zavirajo funkcije protitumorskih efektorskih celic. Preliminarni

rezultati kažejo, da rak jajčnikov selektivno zavira citolitično funkcijo CD8⁺ celic T, pri tem pa ne vpliva na njihovo ekspanzijo. Nefunkcionalnost CTL lahko inducira PGE₂, prisoten v okolju raka jajčnikov. Poleg PGE₂ lahko pomembno vlogo za nefunkcionalnost CD8⁺ celic T igrajo ostali s tumorjem-povezani dejavniki. Na osnovi analize zastopanosti različnih citokinov v ascitesu raka jajčnikov in potencialni korelaciji njihovih vrednosti z infiltracijo specifičnih limfocitnih populacij, bo preučeval vlogo teh posameznih s tumorjem-poveznih dejavnikov pri nastanku in perzistenci raka. Poleg citokinov bo preučeval tudi vlogo s tumorjem-povezanih imunosupresivnih dejavnikov, zlasti inducibilno sintazo dušikovega oksida (NOS2), dušikov oksid (NO) in PGE₂, v primerjavi/nasprotju z vlogo znanih in dobro preučevanih dejavnikov, kot so TGF-β1, VEGF in IDO1. Poleg pospešenega nastanka imunosupresivnih celic v tumorskem okolju, velika sposobnost mikookolja raka jajčnikov, da privablja številne vrste supresivnih celic, kaže na dejstvo, da je prevlada različnih imunosupresivnih celic lahko posledica njihovega povečanega privabljanja in/ali zadrževanja. Mladi raziskovalec bo določal mehanizme/uravnavanje rekrutiranja in zadrževanja imunskih celic v mikookolju raka jajčnikov ter identificirali potencialne kemokine/kemokinske receptorje, ki so udeleženi v teh procesih.

Na osnovi pridobljenih rezultatov o mehanizmih, ki so vključeni v spreobračanje proti-tumorskega imunskega odziva, bodo pomemben del dela predstavljale raziskave, pri katerih bo mladi raziskovalec razvijal protiukrepe, s katerimi bo mogoče premagati s tumorjem-povezane imunske nepravilnosti: v okviru raziskav bo preučeval tako inhibicijo tumor-supresorskih mehanizmov, kot tudi povečanje protitumorskih efektorskih funkcij. Preliminarni rezultati kažejo, da supresiji CTL-efektorskih funkcij lahko nasprotujemo z eksogenim IL-12.

Ad 2. Imunska terapija na osnovi dendritičnih celic

Imunske pomankljivosti ter dokumentirana nefunkcionalnost endogenih dendritičnih celic (DC) pri rakavih bolnikih, so botrovale uporabi *ex-vivo* pridobljenih DC kot terapevtskih cepiv. Ker DC obdelane s tumorskim lizat/proteinskim ekstraktom/sintetičnimi peptidi antigenskih epitopov lahko generirajo varovalni imunski odziv ob kasnejši izpostavitvi tumorju, bo mladi raziskovalec v okviru predlaganega projekta uporabil DC za indukcijo protitumorskega imunskega odziva, ki bo sposoben učinkovite odstranitve tumorja. Trenutne raziskave imunske terapije na osnovi DC vključujejo preučevanje izbora vrste DC, zoritvenega statusa ob imunizaciji, adjuvantne terapije (citokini, inhibitorji, ..), načina antigenske obdelave ter načina in pogostnosti administracije cepiva. Primarni cilj naših raziskav bo določitev optimalne metode *ex-vivo* pridobivanja učinkovitih protitumorskih imunostimulativnih DC, ki bodo zadoščale za odstranitev tumorja ali preprečile ponovitev bolezni. Specifični cilj bo doseči ustrezno kombinacijo močne stimulatorne aktivnosti in visoke odzivnosti na kemokine, prisotne v bezgavkah, sočasno z visoko sposobnostjo produkcije IL-12p70. Predlagano raziskovalno delo je osnovano signifikantno nad zgolj osnovnimi bazičnimi raziskavami, saj ni omejeno na samo identifikacijo ter pojasnjevanje mehanizmov vključenih v optimizacijo diferenciacije in zorenja DC, vendar tudi v samo ocenjevanje izboljšanih lastnosti in funkcij DC, za indukcijo ter izboljšanje odzivov protitumorskih CD4⁺ in CD8⁺ TIL, izoliranih iz bolnic z rakom jajčnikov. V tem oziru bo v okviru predvidenega dela mladi raziskovalec določil možnost popravljanja nepravilnosti CTL z *ex-vivo* pridobljenimi DC, v primerjavi s standardnimi DC ter s tem pokazal uporabnost novo razvitih DC za terapevtsko izboljšanje imunosupresivnih učinkov raka jajčnikov. Perspektiva predlaganega raziskovalnega dela so translacijske raziskave, usmerjene v nova odkritja, ki bodo generirala optimizirane strategije cepiv, metode spremljanja imunskega odziva, in definirale mehanizme neuspešnega protitumorskega imunskega odziva. Te principi bodo omogočili izvedbo kliničnih preizkušanj imunske terapije raka jajčnikov, ki bo najverjetneje generirala obetavne rezultate.