

Wrocław, 7 kwietnia 2011

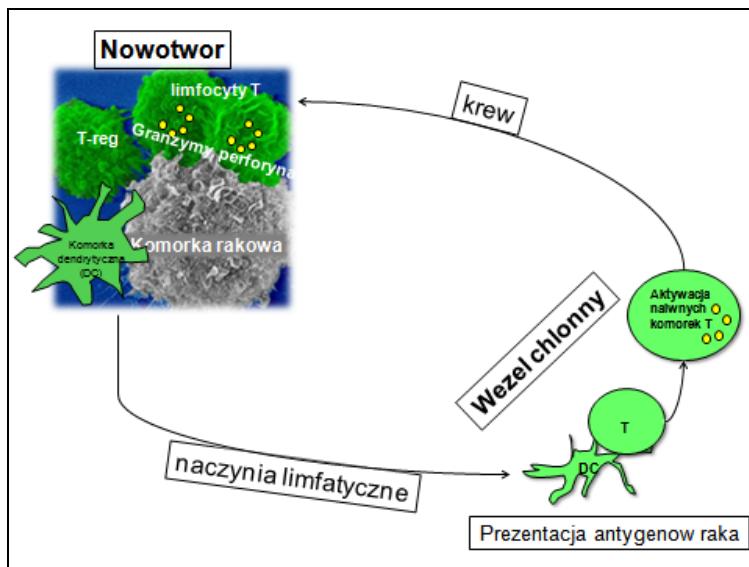
Streszczenie wykładu:

Wizualizacja interakcji immunologicznych w mikrośrodkowisku nowotworów

Dr Tomasz Żal

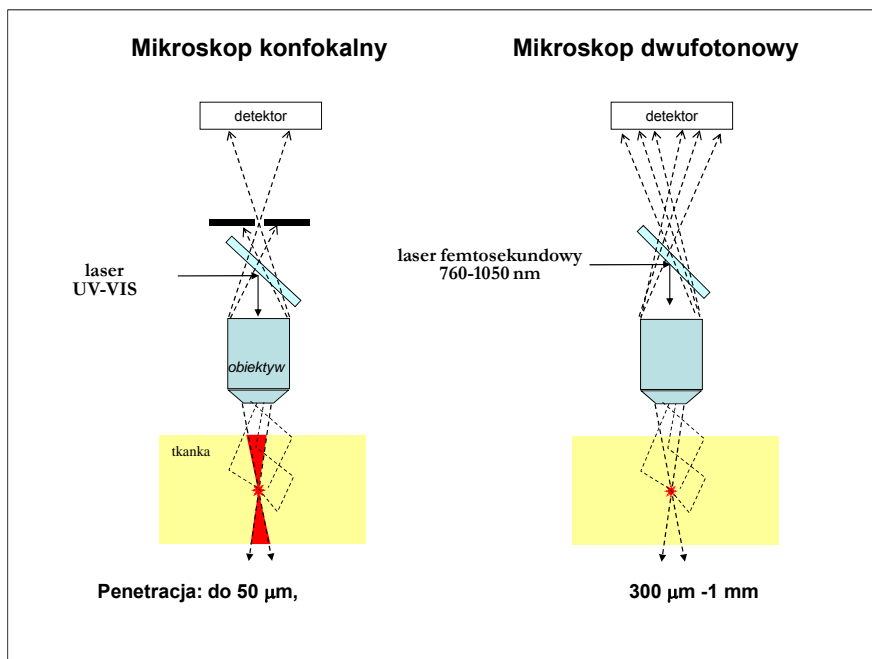
University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

Najczęściej cytowany artykuł prestiżowego czasopisma naukowego "Cell" definiuje sześć krytycznych właściwości nowotworów, które umożliwiają ich wzrost, np. zdolność komórek nowotworowych do nieograniczonych podziałów. Od czasu publikacji tego artykułu w roku 2000, dokonano olbrzymiego postępu w badaniach biologii procesów nowotworzenia, a w szczególności w dziedzinie immunologii nowotworów. Uwzględniając wyniki tych badań, niedawno została opublikowana nowa, zaktualizowana wersja tego artykułu (Hanhan, Weinberg, 4 marca 2011r.), w której autorzy identyfikują zdolność nowotworów do uniknięcia zniszczenia przez układ odpornościowy jako jeden z krytycznych elementów procesu nowotworowego, a zatem jako możliwy cel terapeutyczny.



Ryc.1. Schemat komunikacji i ruchu komórek pomiędzy mikrośrodowiskiem nowotworu i węzłem chłonny.

Układ odpornościowy składa się z wielu rodzajów komórek, które znajdują się w stanie ciągłego ruchu krążąc poprzez narządy limfatyczne, krew i tkanki. Dzięki tej migracji i wzajemnym oddziaływaniom, komórki układu immunologicznego są w stanie wykryć i zniszczyć źródła infekcji. Jedno z kluczowych oddziaływań umożliwiających odróżnienie patogenów od własnych komórek zachodzi pomiędzy receptorem limfocytów T (TCR) i komórkami prezentującymi antygeny w kontekście białek MHC. Na skutek mutacji, komórki rakowe mogą nabywać właściwości antygenowych i stać się celem ataku cytotoksycznych limfocytów T typu CD8 posiadających odpowiednie receptory TCR. Na tej podstawie opiera się wiele eksperymentalnych terapii, których celem jest pobudzenie endogennej reakcji przeciwnowotworowej u pacjenta lub wprowadzenie antygenowo-swoistych limfocytów T CD8 z zewnątrz w celu doprowadzenia do immunologicznego odrzucenia nowotworu.



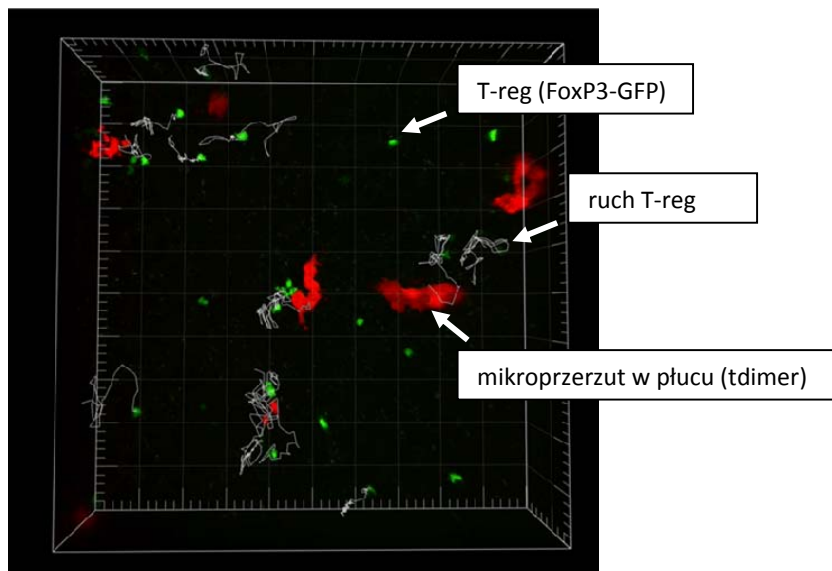
Ryc. 2. Porównanie mikroskopu konfokalnego i dwufotonowego.

Niestety, mimo tego że limfocyty cytotoksyczne przenikają do wielu nowotworów, zdolność tych limfocytów do zabijania komórek raka jest drastycznie hamowana przez mikrośrodowisko nowotworu. W ciągu ostatnich lat, znaczący krok w kierunku zrozumienia mechanizmu immunosupresji nowotworowej został dokonany dzięki odkryciu nowej populacji limfocytów T typu CD4, które wyróżniają się ekspresją czynnika transkrypcyjnego FoxP3 i posiadają zdolność do hamowania odpowiedzi immunologicznej w kontakcie z innymi limfocytami. Limfocyty te, znane pod nazwą

limfocytów regulatorowych (T-reg), gromadzą się w nowotworach i ich obecność wpływa na obniżenie aktywności limfocytów CD8 i na agresywność nowotworu.

W czołowych ośrodkach medycznych trwają w tej chwili próby kliniczne nowych metod immunoterapii przeciwnowotworowych, polegających na usunięciu albo zahamowaniu aktywacji komórek T-reg. Mimo, że wyniki są obiecujące, ciągle nie wiadomo, dlaczego komórki T-reg gromadzą się w nowotworach i w jaki sposób oddziałują tam z limfocytami cytotoksycznymi. Co więcej, nie jest jasne jak terapie immunomodulujące wpływają na limfocyty T-reg w mikrośrodkowisku nowotworu.

Do pewnego stopnia, badania tych oddziaływań są możliwe dzięki użyciu konglomeratów komórkowych *in vitro*, ale wyniki nie są w stanie dostarczyć informacji na temat dynamiki *in vivo* typowej dla żywej, ukrwionej tkanki. Jedną z niewielu technik eksperymentalnych pozwalających na obrazowanie żywych tkanek *in vivo* jest mikroskopia dwufotonowa. Technika ta jest odmianą mikroskopii konfokalnej z zastosowaniem lasera działającego w podczerwieni. Mimo że fotony światła podczerwonego posiadają niską energię, dwa takie fotony mogą wzbudzić fluorescencję fluoroforu, jeśli się spotkają w punkcie ogniskowania obiektywu mikroskopu. Efekt ten, w połączeniu z łatwą penetracją tkanki przez światło podczerwone, pozwala na punktowe skanowanie fluorescencji w tkance do głębokości 1 mm, czyli znacznie głębiej niż na to pozwala konwencjonalna technika konfokalna.



Ryc. 3. Ruch limfocytów T-reg wokół mikroprzerzutów w płucu myszy.

Szereg grup badawczych, włącznie z naszym laboratorium w MD Anderson Cancer Center (Houston, USA), zajmuje się bezpośrednią wizualizacją oddziaływań komórkowych *in vivo* za pomocą mikroskopii dwufotonowej i konfokalnej. Stosujemy te

techniki aby zrozumieć w jaki sposób limfocyty T-reg oddziałują z nowotworowymi i innymi komórkami w różnych modelach raka płuc. Nowotwory te indukujemy u myszy z użyciem fluoryzujących linii nowotworowych, np. mięsaka, lub czerniaka. W celu rozróżnienia populacji limfocytów *in vivo*, używamy odpowiednich szczepów myszy, w których różne warianty białka fluorescencyjnego GFP są wytwarzane pod kontrolą transgenicznym promotorów białek charakterystycznych dla analizowanych rodzajów komórek T. Przykładowo, limfocyty T-reg fluoryzują na zielono w myszach z wbudowanym transgenem FoxP3-GFP. Krzyżując te myszy ze szczepem, w którym czerwono fluoryzujące białko RFP jest kontrolowane przez promotor białka CD2, uzyskujemy myszy, w których wszystkie komórki T fluoryzują na czerwono, a część z nich - limfocyty T-reg, dodatkowo na zielono. Dzięki użyciu jeszcze innych transgenów, można uwidocznić pozostałe ważne populacje komórek układu immunologicznego, takie jak komórki dendrytyczne i makrofagi, lub też można monitorować stan aktywacji tych komórek.

Nasze badania ujawniają niezwykle dynamiczny obraz rozwoju mikrośrodowiska nowotworu, począwszy od przerzutów pojedynczych komórek nowotworowych a skończywszy na stanach terminalnych. Jedną z nieoczekiwanych obserwacji to niezwykle szybkie gromadzenie się limfocytów T-reg we wczesnych mikroprzerzutach w ciągu 2-4 dni, co ochrania wczesne zmiany nowotworowe przed niszczeniem. Komórki T-reg wchodzi w szereg bezpośrednich interakcji z innymi limfocytami T, włącznie z limfocytami cytotoksycznymi CD8. Co więcej, stosując różne eksperymenty polegające na usuwaniu poszczególnych populacji komórek, obserwujemy, że napływ i zatrzymanie limfocytów T-reg w otoczenie nowotworu zależy od komórek dendrytycznych, które cechują się wchłanianiem i przetwarzaniem antygenów w celu ich prezentacji limfocytom T. Poprzez identyfikację komórek dendrytycznych jako mediatorów gromadzenia się limfocytów T-reg w nowo powstających przerzutach, nasze wyniki mają duże znaczenie w racjonalnym opracowaniu nowych metod terapeutycznych nakierowanych na obniżenie liczby i aktywności limfocytów T-reg w środowisku nowotworów, a przez to ułatwiających immunologiczne odrzucenie nowotworu.