

Stała aktywacja czynników transkrypcyjnych (cz.t.) NFκB jest cechą charakterystyczną niektórych chłoniaków B-komórkowych, w tym chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (DLBCL) i klasycznego chłoniaka Hodgkina (cHL). Aktywność NFκB stymuluje proliferację i chroni przed śmiercią komórki nowotworowe DLBCL, cHL ale także komórki niektórych nowotworów litych. Dlatego strategie wycelowane w cz.t. NFκB są wysoce pożądane i intensywnie poszukiwane. Niestety, podobnie jak w przypadku innych cz.t., strategie bezpośrednio wycelowane w białka NFκB nie okazały się skuteczne i do obecnej chwili nie opracowano ich bezpośrednich i klinicznie użytecznych inhibitorów. Podobnie jak w przypadku innych nowotworów, na tkankę chłoniaków składają się zarówno komórki nowotworowe jak i nienowotworowe, tworzące mikrośrodowisko nowotworu. W cHL, komórki mikrośrodowiska są liczniejsze od komórek tego chłoniaka (k. Reed-Sternberga, RS) oraz pełnią istotną rolę w ich podtrzymaniu i immunologicznym uprzywilejowaniu. Zwiększona liczebność makrofagów związanych z nowotworem (TAM) w tkance cHL jest czynnikiem niekorzystnego rokowania, wskazując na ich kluczową rolę w patogenezie choroby. Komórki RS rekrutują aktywnie komórki nienowotworowe (włącznie z makrofagami) do mikrośrodowiska i powodują ich „przeprogramowanie”. Tak zmienione, dostarczają one czynników wspierających przeżywalność komórek RS oraz produkują białka immunomodulacyjne, które hamują przeciwnowotworową odpowiedź układu immunologicznego. W komórkach RS, cz.t. NFκB odpowiadają za ekspresję białek antyapoptotycznych, cytokin/chemokin oraz białek immunomodulujących zaangażowanych w komunikację komórek RS z ich mikrośrodowiskiem. W naszych trwających badaniach zaobserwowaliśmy, że komórki RS indukują aktywację NFκB oraz pro-nowotworowy fenotyp w makrofagach, co sugeruje iż aktywność NFκB odgrywa kluczową rolę w biologii choroby, zarówno w komórkach RS jak i TAM. Obserwacje te wskazują także, że identyfikacja wspólnego celu regulującego aktywność NFκB w komórkach RS i TAM może przyczynić się do opracowania nowej strategii terapeutycznej. Aktywność cz.t. NFκB kontrolowana jest poprzez zależną od kinaz fosforylację niektórych cz.t. NFκB. Wśród znanych, fosforylacje p65-S276/536 oraz cRel-S267 wywierają silny wpływ na aktywność transkrypcyjną NFκB. Rola tych modyfikacji w komórkach chłoniaków B-komórkowych jest jednak mało poznana. Wyniki naszych wstępnych badań wskazują, iż zahamowanie fosforylacji p65-S276 hamuje NFκB-zależną transkrypcję w komórkach DLBCL, cHL oraz w TAM. Zidentyfikowaliśmy PIM1 jako kinazę dla p65-S276, ulegającą ekspresji zarówno w komórkach tych chłoniaków jak i TAM, oraz określiliśmy wstępnie konsekwencje zahamowania PIM w tych komórkach, obejmujące obniżoną ekspresję genów NFκB-zależnych. Pomimo tych obiecujących danych, wiele zagadnień oraz pytań pozostaje niewyjaśnionych. W szczególności: (i) czy fosforylacja cRel odgrywa istotną rolę w aktywności transkrypcyjnej NFκB?; (ii) jakie są szczegółowe transkrypcyjne i biologiczne konsekwencje zahamowania fosforylacji p65 w komórkach chłoniaków i TAM?; (iii) czy poza kinazami PIM istnieją inne kinazy mogące modulować p65?; (iv) czy fosforylacja p65 S276 może mieć wpływ na immunosupresyjny fenotyp TAM?

Celem proponowanych badań jest określenie funkcji fosforylacji p65/cRel oraz identyfikacja kinaz odpowiedzialnych za te modyfikacje w chłoniakach B-komórkowych oraz TAM. Zagadnienia te nie były dotychczas podejmowane przez badaczy.

Dla osiągnięcia stawianych przez nas celów podejmiemy różnorodne działania. W celu określenia roli modyfikacji p65/cRel dla NFκB-zależnej transkrypcji, wygenerujemy zmodyfikowane genetycznie linie komórkowe, w których ekspresji ulegać będą zmutowane białka p65 i cRel, w taki sposób by odpowiadały one stale defosforylowanym (nieaktywnym) czynnikom. W komórkach tych, przy użyciu techniki globalnego sekwencjonowania RNA (RNA-seq) zidentyfikujemy geny, których ekspresja ulega zmianie w zależności od specyficznych dla tych cz.t. fosforylacji, oraz szczegółowo zbadamy powiązane z tymi zmianami mechanizmy. W tym celu, w badaniach proteomicznych zidentyfikujemy zależne od specyficznych fosforylacji kofaktory dla p65/cRel i ocenimy wpływ zablokowania fosforylacji na formowanie się kompleksów cz.t. NFκB z kofaktorami metodą immunoprecypitacji chromatyny i sekwencjonowania DNA (ChIP-seq). Spodziewamy się że wyniki analiz RNA-seq i ChIP-seq pozwolą nam zrozumieć w jaki sposób fosforylacje p65/cRel wpływają na ekspresję genów w komórkach DLBCL, RS oraz TAM. Zidentyfikowaliśmy już PIM1 jako kinazę dla p65-S276 w komórkach DLBCL, RS oraz TAM. Nie wiemy jednak czy jest to jedyna funkcjonalna kinaza dla tego czynnika oraz nie znamy kinaz dla cRel w tych komórkach. W badaniach proteomicznych zidentyfikujemy kinazy specyficzne dla p65-S276/S536 oraz cRel-S267, a następnie ocenimy wpływ ich genetycznego zahamowania dla specyficznych fosforylacji p65/cRel, ekspresji genów NFκB-zależnych oraz przeżywalności komórek DLBCL i RS. W planowanych analizach danych transkrypcyjnych komórek z nadekspresją mutantów p65/cRel oraz komórek z wyciszoną ekspresją kinaz spodziewamy się zidentyfikować grupy genów o spójnie obniżonej ekspresji i odgrywających kluczową rolę dla przeżywalności komórek nowotworowych i kształtowania pro-nowotworowego fenotypu TAM. Powyższe obserwacje zostaną zweryfikowane przy użyciu małowcząsteczkowych inhibitorów dla zidentyfikowanych kinaz. Dla najbardziej obiecujących związków ocenimy ich przydatność terapeutyczną oraz potencjał do synergistycznej aktywności ze znanymi inhibitorami białek proksymalnie modulujących szlak NFκB *in vitro*, w komórkach DLBCL oraz RS. Interakcje związków synergistycznie hamujących wzrost komórek chłoniaków zostaną zbadane następnie w mysim modelu z przeszczepem komórek od chorych z DLBCL.

Realizacja celów założonych w projekcie pozwoli zrozumieć funkcje fosforylacji p65/cRel w komórkach chłoniaków B-komórkowych i TAM, oraz identyfikację kinaz odpowiedzialnych za te modyfikacje. Na podstawie wyników naszych wstępnych badań zakładamy, iż inhibicja tych kinaz spowoduje zahamowanie NFκB-zależnej ekspresji genów, osłabi przeżywalność i wzrost komórek nowotworowych oraz upośledzi immunosupresyjne właściwości TAM. W związku z tym, wyniki zaplanowanych badań mogą przyczynić się do identyfikacji nowych strategii terapeutycznych wycelowanych jednocześnie w komórki nowotworowe oraz ich immunosupresyjne mikrośrodowisko.