

## **Funkcjonalne następstwa utraty chromosomu Y (LOY) w komórkach układu immunologicznego w kontekście chorób nowotworowych - badania ex-vivo oraz in vitro z wykorzystaniem komórek ludzkich**

Rak jest jedną z głównych przyczyn zgonów we współczesnych społeczeństwach. Płeć męska stanowi czynnik ryzyka dla wielu powszechnych typów raka. Dodatkowo guzy złośliwe u mężczyzn rozwijają się wcześniej i charakteryzują się wyższą śmiertelnością. Utrata chromosomu Y (ang. Loss of Chromosome Y, LOY) w leukocytach krwi obwodowej jest najczęściej występującą mutacją post-zygotyczną w grupie starzejących się mężczyzn. Liczne badania epidemiologiczne wykazały asocjację pomiędzy LOY w krążących komórkach odpornościowych a zwiększonym ryzykiem zachorowania na różne choroby związane z wiekiem, w tym nowotwory hematologiczne i niehematologiczne. Wykazano również, że LOY w leukocytach powoduje deregulację wielu genów autosomalnych, w tym genów istotnych dla prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego. Niemniej jednak, brak szeroko zakrojonych badań analizujących funkcjonalny wpływ LOY w komórkach odpornościowych na rozwój guzów złośliwych u ludzi stanowi poważną lukę w naszym zrozumieniu procesu nowotworzenia. Główna hipoteza niniejszego projektu zakłada, że LOY w komórkach odpornościowych zaburza proces nadzoru immunologicznego, który jest niezbędny do usuwania komórek rakowych. Naszym głównym celem jest zbadanie wpływu LOY w leukocytach na proces rozwoju raka na poziomie molekularnym i komórkowym. Proponujemy przeprowadzenie szeregu eksperymentów wykorzystujących zarówno ludzkie leukocyty pobrane *ex-vivo* od pacjentów z rakiem oraz zdrowych kontroli, jak i model *in vitro* utraty chromosomu Y w leukocytach ludzkich. Nasze dotychczasowe badania wykazały, że LOY występuje preferencyjnie w limfocytach T CD4<sup>+</sup> wyizolowanych z krwi pacjentów z rakiem prostaty (ang. Prostate Cancer, PC), co może wskazywać, że komórki te mają wpływ na rozwój raka jeśli pojawi się w nich LOY. Dalsze badania wykazały, że komórki CD4<sup>+</sup> T regulatorowe (Tregs) charakteryzują się najwyższym poziomem LOY spośród wszystkich typów leukocytów u pacjentów z rakiem jelita grubego (ang. Colorectal Cancer, CRC) oraz, że komórki Treg z LOY wykazują wyższą ekspresję genów immunosupresyjnych. Wyższa aktywność immunosupresyjna komórek Treg związana jest z bardziej korzystnym mikrośrodowiskiem dla rozwoju i progresji nowotworu. W niniejszym projekcie chcielibyśmy zbadać funkcjonalne konsekwencje LOY poprzez różnicową analizę ekspresji genów w różnych typach leukocytów wyizolowanych za pomocą aktywowanego fluorescencją sortera komórek (ang. Fluorescent Activated Cell Sorter, FACS) z pełnej krwi 60 pacjentów z CRC, 60 pacjentów z PC oraz 60 dobranych wiekowo zdrowych kontroli, ze specjalnym uwzględnieniem komórek CD4<sup>+</sup> T pomocniczych (ang. T helpers, Ths), Tregs, CD8<sup>+</sup> T cytotoksycznych (ang. cytotoxic T lymphocytes, CTLs) oraz komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego (ang. myeloid derived suppressor cells, MDSCs). MDSCs to komórki, których obecność jest powiązana z rozwojem raka i przypuszczamy, że może w nich występować preferencyjna utrata chromosomu Y. Dodatkowo wykazano, że Tregs i MDSCc wzajemnie regulują swoją aktywność w mikrośrodowisku guza (ang. Tumor Microenvironment, TME). Aby przeprowadzić dokładniejszą analizę wpływu LOY w komórkach odpornościowych na proces nowotworzenia planujemy wyizolować i zbadać leukocyty pochodzące z mikrośrodowiska guza. Ponieważ nawet u 50% pacjentów z CRC rozwijają się przerzuty do wątroby, planujemy przeprowadzić dysocjacje 5-10 guzów przerzutowych i zastosowanie FACS do izolacji infiltrujących guza komórek Th, Treg oraz CTL. Dodatkowo przeanalizujemy ekspresję genów w każdym typie wysortowanych leukocytów u pacjentów z LOY oraz bez LOY z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania RNA – SMARTer RNAseq. Aby zbadać wpływ LOY na immunosupresyjną aktywność Tregs stworzymy model *in vitro* komórek Treg z LOY z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9. Planujemy przetestować immunosupresyjną aktywność Tregs z LOY poprzez analizę spektrum produkcji cytokin. Dodatkowo stworzymy hodowle 2D oraz 3D komórek Treg z LOY oraz bez LOY w obecności komórek efektorowych (np. CTLs) oraz linii komórkowych raka jelita grubego i prostaty, a także sferoid rakowych. Wyniki naszych badań mogą przyczynić się do rozwoju nowych immunoterapii przeciwnowotworowych. Obecnie wielu pacjentów nie reaguje odpowiednio na terapie immunologiczne, co może mieć związek z wynikającym z LOY silnie immunosupresyjnym fenotypem leukocytów w mikrośrodowisku guza.