

# Streszczenie

---

Nowotwory stanowią jedno z największych wyzwań zdrowotnych współczesnego świata i są drugą przyczyną zgonów w Polsce. Pomimo postępów w diagnostyce i leczeniu, rokowanie w wielu nowotworach, w tym w niedrobnokomórkowym raku płuca (NSCLC), raku pęcherza moczowego (BC) i przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL), pozostaje niekorzystne. Jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój i progresję nowotworów jest zdolność komórek nowotworowych do unikania nadzoru immunologicznego, między innymi poprzez zaburzenia ekspresji cząsteczek punktów kontroli immunologicznej (IC, ang. Immune Checkpoints). Cząsteczki te regulują równowagę między aktywacją a tolerancją układu odpornościowego, a zaburzenia w ich ekspresji mogą prowadzić między innymi do immunosupresji w mikrośrodowisku guza.

Klasyczne punkty kontrolne, takie jak PD-1/PD-L1 czy CTLA-4, stanowią podstawę współczesnej immunoterapii, jednak coraz większe znaczenie przypisuje się mniej poznanym cząsteczkom, takim jak BTLA. BTLA jest receptorem hamującym z rodziny immunoglobulino podobnych, obecnym m.in. na limfocytach T, B i NK. Poprzez interakcję z ligandem HVEM, BTLA przekazuje sygnały hamujące odpowiedź immunologiczną. Równowaga osi BTLA/HVEM ma istotne znaczenie dla właściwej regulacji działania układu odpornościowego. Jej zaburzenia mogą prowadzić do przewagi sygnałów hamujących, sprzyjając immunosupresji i umożliwiając komórkom nowotworowym unikanie nadzoru immunologicznego.

Zmienność genetyczna w genach kodujących IC, szczególnie polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP), jest jednym z czynników, które modulując ekspresję bądź funkcję białek, wpływają na odpowiedź immunologiczną, a tym samym mogą być związane z ryzykiem wystąpienia chorób nowotworowych. W zależności od ich lokalizacji, SNP mogą wpływać na ekspresję genu, stabilność RNA, strukturę białka, wiązanie ligandów oraz sygnalizację wewnątrzkomórkową. Wszystkie te zmiany mogą mieć istotny wpływ na funkcjonowanie układu immunologicznego, potencjalnie wzmacniając lub redukując nadzór immunologiczny, a tym samym wpływając na rozwój, progresję nowotworu i odpowiedź na jego leczenie.

Równolegle, rozpuszczalne formy cząsteczek punktów kontroli immunologicznej (soluble IC) są istotnymi regulatorami odpowiedzi immunologicznych obecnymi w osoczu lub surowicy krwi. Rozpuszczalne cząsteczki zachowują zdolność do wiązania swoich odpowiednich ligandów lub receptorów, działając jako rozpuszczalne modulatory odpowiedzi immunologicznej.

Kolejnym istotnym mechanizmem wpływającym na poziom ekspresji cząsteczek IC jest regulacja epigenetyczna z udziałem mikro RNA (miRNA). miRNA stanowią grupę endogennych cząsteczek RNA, które regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym prowadząc do zahamowania translacji białka. Nieprawidłowy wzór ekspresji miRNA został powiązany z szerokim spektrum chorób człowieka, w tym z różnymi typami nowotworów. Deregulacja miRNA odgrywa istotną rolę w patogenezie nowotworów, poprzez modulację ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną, proliferacją i apoptozą.

Ponieważ cząsteczka BTLA stanowi istotny element regulacji odpowiedzi immunologicznej zarówno w nowotworach litych, jak i hematologicznych, wpływając na zdolność komórek nowotworowych do unikania odpowiedzi immunologicznej, budzi ona coraz większe zainteresowanie badaczy.

Celem mojej rozprawy doktorskiej była ocena znaczenia polimorfizmów genu BTLA, mechanizmów epigenetycznych oraz rozpuszczalnej formy tej cząsteczki w patogenezie chorób nowotworowych, co może przyczynić się do identyfikacji nowych markerów diagnostycznych, rokowniczych lub predykcyjnych.

Wstępem do niniejszej rozprawy jest publikacja przeglądowa (Andrzejczak i wsp. Biomarker Research, 2024) która przedstawia kompleksowy obraz biologii BTLA, w tym mechanizmy jego sygnalizacji, rolę w regulacji układu odpornościowego oraz potencjał terapeutyczny w onkologii.

Rozprawa składa się z dwóch głównych części badawczych. Pierwsza część obejmuje trzy prace oryginalne. Dwie z nich koncentrują się na analizie zmienności polimorficznej genów IC w kontekście patogenezy oraz ryzyka rozwoju NSCLC i BC. Trzecia praca dotyczy analizy poziomów rozpuszczalnych form cząsteczek IC w surowicy, których stężenie może stanowić potencjalny biomarker diagnostyczny lub prognostyczny w BC. Na potrzeby niniejszej rozprawy doktorskiej, której głównym przedmiotem badań

jest cząsteczka BTLA, poniżej streszczono wyniki odnoszące się wyłącznie bezpośrednio do genu BTLA lub rozpuszczalnej formy tego białka i nie omówiono wyników dotyczących pozostałych cząsteczek punktów kontroli immunologicznej.

Pierwsza z prac (Andrzejczak i wsp., *Frontiers in Immunology*, 2023) koncentruje się na określeniu występowania siedmiu polimorfizmów genu BTLA oraz analizie ich związku z ryzykiem zachorowania, progresją choroby i przeżyciem całkowitym (OS) u 383 pacjentów oraz 474 osób z grupy kontrolnej.

W analizie przeprowadzonej w całej badanej populacji chorych i zdrowych wykazano tendencję do częstszego występowania nosicieli allelu G rs1982809 (AG+GG) w porównaniu do osób zdrowych (45.29% vs. 38.82%), co wskazuje, że obecność allelu G zwiększa ryzyko zachorowania na NSCLC (OR 1.3). Analiza rozkładu alleli dodatkowo potwierdziła, że allel G rs1982809 jest istotnie związany z ryzykiem rozwoju NSCLC (OR 1.25). W przypadku pozostałych badanych SNP nie zaobserwowano istotnych różnic.

W analizie uwzględniającej czynnik środowiskowy, jakim jest palenie tytoniu, zaobserwowano, że w grupie pacjentów nigdy niepalących rozkład genotypów rs1982809 różnił się istotnie w porównaniu z grupą kontrolną. Obecność allelu A (AA+AG) wiązała się około trzykrotnym obniżeniem ryzyka rozwoju NSCLC, co wskazuje na jego potencjalną rolę ochronną. Natomiast w grupie pacjentów palących nie zaobserwowano istotnych różnic w zakresie częstości alleli i genotypów rs1982809.

Analiza uwzględniająca płeć w badanych grupach wykazała, że rozkład genotypów rs9288953 różnił się istotnie między pacjentkami a zdrowymi kobietami. Obecność allelu T (CT+TT) zwiększała ryzyko NSCLC u kobiet ponad 2-krotnie. Ponadto podobnie jak w całej grupie pacjentów zaobserwowano tendencję do podwyższonego ryzyka NSCLC u nosicieli allelu G rs1982809 (AG+GG). Natomiast u mężczyzn nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie analizowanych polimorfizmów.

Analiza uwzględniająca typ histologiczny NSCLC nie ujawniła istotnych różnic w rozkładzie genotypów. Niemniej jednak wśród pacjentów z gruczolakorakiem odnotowano nieistotnie statystycznie częstsze występowanie nosicieli allelu G rs1982809 (AG+GG) oraz allelu C rs2705511 (AC+CC) w porównaniu do grupy kontrolnej (46.85% vs. 38.82% oraz 50.45% vs. 42.19%, odpowiednio). Uwzględniając w analizie stadium zaawansowania choroby, stwierdzono w poszczególnych stadiach odpowiednio nadreprezentację allelu G rs1982809 i allelu C rs2705511 w stadium II oraz nosicieli allelu G rs1982809 (AG+GG), allelu C rs2705511 (AC+CC) oraz allelu T rs9288953 (CT+TT) w stadium III. Nie zaobserwowano natomiast istotnego związku badanych polimorfizmów ze stadium IV choroby.

Analiza polimorfizmów z całkowitym przeżyciem pacjentów wykazała, że dwa warianty istotnie modyfikowały OS pacjentów. Nosiciele allelu C rs2705511 (CC+CA) oraz nosiciele allelu G rs1982809 (GG+AG), żyli dłużej o około sześć miesięcy w porównaniu z homozygotami AA dla obu SNP. Dla rs9288952 odnotowano tendencję do krótszego OS wśród nosicieli allelu G, natomiast homozygotyczność CC w rs11921669 wiązała się z dłuższym OS w stosunku do pacjentów posiadających allel T.

W nieopublikowanym manuskrypcie, złożonym do redakcji *Polish Archives of Internal Medicine*, przeanalizowano cztery polimorfizmy genu BTLA w grupie 314 pacjentów oraz u ponad 520 osób zdrowych, aby ocenić ich wpływ na podatność na zachorowanie na BC oraz przebieg kliniczny choroby.

Wykazano, że niektóre z badanych polimorfizmów mogą wpływać na podatność na rozwój BC. Dla rs2705511 stwierdzono odmienny rozkład genotypów u pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną, przy czym heterozygoty AC były wyraźnie nadreprezentowane (43.31% vs. 36.87%), co sugeruje zwiększone ryzyko zachorowania dla posiadaczy tego genotypu (OR 2.5). Podobny wzorec nadreprezentacji heterozygot AG odnotowano dla rs1982809 (42.04% vs. 34.83%), natomiast w przypadku rs9288953 zaobserwowano jedynie tendencję do większej częstości genotypu CT (53.72% vs. 46.61%) w grupie pacjentów w stosunku do osób zdrowych.

Analiza uwzględniająca płeć wykazała, że polimorfizm rs1982809 był związany z podatnością na rozwój BC u kobiet. Dla rs1982809 stwierdzono istotne różnice w rozkładzie genotypów pomiędzy pacjentkami a kobietami z grupy kontrolnej, a obecność allelu G i genotypu AG wiązała się z 2-krotnie zwiększonym ryzykiem choroby. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że polimorfizm rs1844089 był istotnie związany z wyższym stopniem złośliwości histologicznej guza. Obecność allelu A korelowała z 5-krotnie większym ryzykiem występowania guzów o wysokim stopniu złośliwości.

W kolejnej pracy przyjętej do recenzji w Biomarker Research, przeprowadzono analizę poziomów rozpuszczalnej formy cząsteczki BTLA (sBTLA) w surowicy 48 pacjentów z BC oraz 27 osób zdrowych. Wykazano, że stężenie sBTLA było ponad dwukrotnie wyższe u chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Zwiększone stężenie sBTLA obserwowano we wszystkich stadiach zaawansowania klinicznego i stopniach złośliwości nowotworu, bez istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi podgrupami. Analiza korelacji stężenia sBTLA z innymi przebadanymi IC w tej pracy wykazała, umiarkowaną dodatnią korelację z sGal-9 oraz słabszą, lecz statystycznie istotną korelację z sTIM-3, co wskazuje na powiązanie sBTLA z innymi kluczowymi mediatorami immunoregulacji.

Druga część rozprawy obejmuje dwie kolejne prace oryginalne poświęcone roli BTLA w CLL. Pierwsza z nich dotyczy epigenetycznej regulacji ekspresji BTLA oraz wpływu BTLA na proliferację komórek B i produkcję IL-4, natomiast druga praca analizuje zasadność celowania w interakcję BTLA mRNA-miR-155-5p jako potencjalnego kierunku immunoterapii. W niniejszej rozprawie omówiono wyniki odnoszące się bezpośrednio do regulacji epigenetycznej ekspresji cząsteczki BTLA z udziałem miR-155-5p w kontekście patogenezy CLL, nie odniesiono się do badania wpływu zaburzonej ekspresji BTLA na proliferację i funkcjonalność komórek T, gdyż były to prace realizowane przez inny zespół.

W pracy Karabon i wsp. (Cells, 2021) zbadano wpływ miR-155-5p na epigenetyczną regulację ekspresji białka BTLA w ludzkich komórkach białaczkowych B, opierając się na hipotezie zaproponowanej przez zespół prof. Karabon na podstawie wcześniejszych wyników badań zespołu. Analiza ekspresji w badanych grupach pokazała, że poziom miR-155-5p był średnio 3-krotnie wyższy, natomiast poziom BTLA mRNA 6-krotnie wyższy u pacjentów z CLL w porównaniu z grupą kontrolną. Podobny trend nadekspresji BTLA mRNA, jak i miR-155-5p zaobserwowano w linii komórkowej MEC-1, będącej modelem CLL.

Następnie przeprowadzono eksperyment weryfikujący hipotezę zakładającą epigenetyczną regulację ekspresji BTLA przez miR-155-5p. Komórki PBMC pacjentów z CLL, osób zdrowych oraz linia MEC-1 zostały transfekowane inhibitorem miR-155-5p (siRNA). Po 24 godzinach oceniono poziomy miR-155-5p, BTLA mRNA i białka BTLA. Transfekcja inhibitorem spowodowała 10-krotne obniżenie poziomu miR-155-5p, bez istotnych zmian w ilości BTLA mRNA. Zaobserwowano natomiast niewielki, lecz istotny wzrost poziomu białka BTLA o 5% w komórkach B CLL i 10% w linii MEC-1, przy braku efektu w komórkach osób zdrowych. W ten sposób pośredni pokazano, że poziom BTLA jest regulowany przez miR-155-5p.

Badania te kontynuowano w pracy Kosmaczewska i wsp. Biomolecules, 2025, gdzie wykazano bezpośrednie oddziaływanie miR-155-5p z mRNA BTLA. Przeprowadzona analiza *in silico* ujawniła obecność w regionie 3'UTR genu BTLA kanonicznego motywu 7mer-A1, rozpoznawanego przez miR-155-5p. Analiza ta została zweryfikowana za pomocą testu lucyferazowego. W testach funkcjonalnych wykorzystano konstrukty zawierające pełną lub skróconą sekwencję 3'UTR BTLA w wersji dzikiej (WT) i zmutowanej (MUT). Ko-transfekcja komórek HEK293 miR-155-5p oraz konstruktyw WT spowodowała spadek aktywności lucyferazy o 20% dla pełnej sekwencji oraz około 40% dla sekwencji skróconej 3'UTR BTLA, podczas gdy efekt ten nie był obserwowany dla konstruktyw MUT oraz kontrolnego siRNA.

Drugim aspektem pracy była ocena roli miR-155-5p w epigenetycznej regulacji poziomów cząsteczki BTLA w komórkach T pacjentów z CLL w kontekście potencjalnego zastosowania immunoterapii opartej na blokowaniu miR-155-5p w CLL. Wykazano, że transfekcja komórek PBMC inhibitorem miR-155-5p nie spowodowała żadnych istotnych różnic w poziomie ekspresji białka BTLA w komórkach T po wyciszeniu miR-155-5p w żadnej z badanych grup.

Wyniki przedstawione w sześciu pracach składających się na niniejszą rozprawę doktorską wskazują na kluczowy udział polimorfizmów genu BTLA, rozpuszczalnej formy białka BTLA (sBTLA) oraz epigenetycznej regulacji jego ekspresji przez miRNA w modulacji odpowiedzi immunologicznej w mikrosrodowisku nowotworu. Obecność określonych wariantów genetycznych genu BTLA wiąże się z rozwojem i przebiegiem NSCLC oraz BC. Ponadto rozpuszczalna forma BTLA może stanowić potencjalny marker diagnostyczny w BC. Z kolei badania nad epigenetyczną regulacją ekspresji BTLA wykazały, że nadekspresja miR-155-5p w komórkach B pacjentów z CLL prowadzi do obniżenia poziomu białka BTLA, co może przyczyniać się do deregulacji szlaków kontrolujących odpowiedź immunologiczną w przebiegu tej choroby. Obniżenie miR-155-5p pozwoliło na częściowe przywrócenie ekspresji BTLA w komórkach nowotworowych, przy jednoczesnym braku wpływu na prawidłowe limfocyty T, co wskazuje na potencjał tej strategii jako bezpiecznego i ukierunkowanego podejścia terapeutycznego w CLL.