

Streszczenie pracy doktorskiej mgr Katarzyny Kaczmarek

Promotor: dr hab. Jarosław Baran, prof. UJ

Temat pracy doktorskiej: „Opracowanie modelu immunoterapii raka jelita grubego u myszy z wykorzystaniem zmodyfikowanych genetycznie bakterii *Lactococcus lactis*” – monografia

Rak jelita grubego (RJG) to jeden z najczęstszych nowotworów złośliwych człowieka. Obecne strategie terapeutyczne oparte są w pierwszej kolejności na chirurgicznym usunięciu guza i nieselektywnie działających lekach cytostatycznych, których stosowanie prowadzi do silnych skutków ubocznych i często związane jest z nabyciem oporności komórek nowotworowych na dalszą taką terapię. W przypadku pacjentów o ściśle wyselekcjonowanym, odpowiednim profilu genetycznym, może zostać włączona immunoterapia lub terapia celowana molekularnie. Istnieje zatem potrzeba poszukiwania nowego podejścia terapeutycznego, wykazującego selektywność wobec komórek nowotworowych i charakteryzującego się skutecznością nie tylko dla wybranych grup pacjentów, ale także umożliwiające całkowite wyleczenie pacjentów w zaawansowanych stadiach RJG.

Ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę (ang. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) jest białkiem indukującym apoptozę komórek nowotworowych, nieuszkodzającym większości komórek prawidłowych. Preparat Dulanermin, stanowiący rekombinowaną komercyjną formę TRAIL, podawany dożylnie pacjentom onkologicznym, w tym pacjentom z RJG, okazał się nieskuteczny ze względu na krótki okres biologicznego półtrwania w organizmie. Aby ocenić przydatność TRAIL w terapii RJG, potrzeba zatem opracowania nowej formy jego dostarczania, zapewniającej jego aktywność bezpośrednio w mikrośrodowisku guza.

Głównym celem niniejszej pracy było sprawdzenie, czy niepatogenne bakterie kwasu mlekowego *Lactococcus lactis* NZ9000, zmodyfikowane genetycznie do wydajnej sekrecji ludzkiego rozpuszczalnego białka TRAIL (ang. human soluble TRAIL, hsTRAIL), mogą stanowić bezpieczny oraz skuteczny nośnik tego białka i prowadzić do eliminacji ludzkich komórek RJG in vivo w organizmie myszy.

W pierwszej części pracy, wykorzystując nizynowy system ekspresyjny NICE (ang. NIsin Controlled gene Expression system), uzyskano zmodyfikowane genetycznie bakterie *L.lactis*(hsTRAIL+) zdolne do indukowalnej ekspresji hsTRAIL oraz określono warunki do optymalnej ekspresji i najbardziej wydajnej sekrecji hsTRAIL na zewnątrz komórki bakteryjnej. Przeprowadzone badania in vitro potwierdziły aktywność biologiczną produkowanego przez bakterie hsTRAIL i jego zdolność do selektywnej eliminacji komórek ludzkich linii RJG na drodze apoptozy. Wykazano również, iż hsTRAIL wykazuje synergistyczny efekt przeciwnowotworowy z wybranymi terapeutykami, w tym cytostatykami powszechnie stosowanymi w terapii RJG, umożliwiając zmniejszenie ich efektywnego stężenia

oraz ograniczając skutki uboczne takiej, potencjalnie przyszłej terapii. Na podstawie tych wyników, do dalszych badań in vivo wyselekcjonowano metforminę, która choć nie jest cytostatykiem i nie jest stosowana w leczeniu RJG, wykazała najbardziej obiecujący profil współdziałania z hsTRAIL na etapie badań in vitro.

W drugiej części pracy wykazano zdolność bakterii *L.lactis*(hsTRAIL+) do lokalnej produkcji hsTRAIL w środowisku RJG in vivo. Przeprowadzone na dwóch mysich modelach transplantacyjnych ludzkiego RJG badania wykazały, iż aktywność hsTRAIL wobec komórek nowotworowych jest różna w zależności od użytego modelu. I tak, doustne podawanie bakterii *L.lactis*(hsTRAIL+) w formie monoterapii oraz terapii łączonej z metforminą, myszom NOD-SCID z podskórnymi guzami ludzkiego RJG, doprowadziło do znacznego spowolnienia wzrostu nowotworu w porównaniu do zwierząt grupy kontrolnej oraz wykazało współdziałanie tak dostarczanego hsTRAIL i metforminy. W bardziej adekwatnym modelu ortotopowym RJG u myszy SCID, terapia za pomocą bakterii *L.lactis*(hsTRAIL+), podawanych drogą pokarmową, spowodowała rozwój choroby nowotworowej. W tym wypadku, lokalna produkcja hsTRAIL w jelicie grubym indukowała aktywację szlaku niekanonicznego hsTRAIL i infiltrację guza przez makrofagi typu M2 o potencjale pronowotworowym.

W świetle uzyskanych wyników, w celu dokładnego poznania mechanizmów działania hsTRAIL, dostarczanego przez zmodyfikowane genetycznie bakterie *L.lactis* na komórki nowotworowe RJG in vivo, niezbędne są jednak dalsze badania, wykorzystujące również mysie w pełni immunokompetentne modele. Biorąc pod uwagę wykazaną w pracy przeżywalność bakterii *L.lactis* w jelicie grubym po ich podaniu drogą pokarmową, ich zdolność do lokalnej (jelito grube) produkcji aktywnego biologicznie białka, a także brak efektów toksycznych takiej formy terapii, sprawia, że *L. lactis* jest obiecującym nośnikiem i producentem białek terapeutycznych dla przyszłych, alternatywnych strategii leczenia nowotworów jelita grubego.

Streszczenie pracy w języku angielskim

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies in men. Current therapeutic strategies are based primarily on surgical removal of the tumor and non selective cytostatic drugs, the use of which leads to strong side effects and acquired resistance of tumor cells to this form of therapy. For patients with a carefully selected, relevant genetic profile, immunotherapy or molecular targeted therapy might be included in the treatment. Therefore, there is an urgent necessity to look for a new therapeutic approach, which will be effective not only for the carefully selected patient subgroups, but also for patients with advanced stages of CRC, acting selectively against cancer cells.

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a protein that has been shown to eliminate cancer cells, while sparing normal ones. "Dulanermin", the recombinant commercial form of TRAIL, proven to be ineffective when administered intravenously to oncological patients, including patients with CRC, because of its short biological half-life. However, to fully assess the relevance of TRAIL in the therapy of CRC, there is a need for development of new forms of its delivery to the CRC microenvironment.

The main goal of this study was the verification whether the non-pathogenic *Lactococcus lactis* NZ9000 bacteria, genetically modified for an efficient secretion of the human soluble TRAIL protein (hsTRAIL), could serve as a safe and effective TRAIL delivery system, leading to the selective elimination of CRC cells in vivo in tumor-bearing mice.

During the first stage of the project, using the NICE (NIsin Controlled gene Expression system) expression system genetically modified *L.lactis* bacteria with an induced expression of hsTRAIL were developed (*L.lactis*(hsTRAIL+), and the induction conditions leading to the most efficient secretion of hsTRAIL were characterized. The in vitro studies confirmed the biological activity of the bacteria produced hsTRAIL and its ability for selective elimination of human CRC cells through apoptosis. Moreover, hsTRAIL shows synergistic antitumor activity with selected therapeutics, including some cytostatic agents commonly used in the treatment of CRC, enabling a reduction of the therapeutic doses of these drugs and side effects of such a potential future therapy. Based on the obtained in vitro data showing metformin to have the most promising anti-tumor interaction profile with hsTRAIL, it was selected for further in vivo studies, although being neither a cytostatic drug nor used in the treatment of CRC.

In the second stage of this work, the ability of *L.lactis* (hsTRAIL +) bacteria to local production of hsTRAIL in the CRC environment, was demonstrated in vivo. The in vivo studies performed on two mouse transplant models of human CRC revealed that biological activity of hsTRAIL largely depends on the model used. Thus, intratumoral administration of *L.lactis*(hsTRAIL+)

in monotherapy and combination with metformin, to NOD-SCID mice with subcutaneous CRC tumors, retarded the tumor growth, comparing to the control group of animals and demonstrated synergistic effect of hsTRAIL and metformin in vivo. In a more adequate, orthotopic model of CRC, therapy with L.lactis(hsTRAIL +) resulted in colon cancer progression in SCID mice. In this case, a local production of hsTRAIL in the colon by genetically modified bacteria induced the activation of the non-canonical pathway of hsTRAIL and infiltration of primary tumor by M2 type macrophages with tumorigenic potential. This indicates activity influenced by the specific tumor microenvironment in the studied orthotopic CRC model.

In the light of the obtained results, to fully understand the mechanisms of action of TRAIL delivered by genetically modified L.lactis bacteria, towards colon cancer cells in vivo, a further research, including immunocompetent mouse models of CRC, is necessary. However, already proven survival of L.lactis in a gut after oral administration of bacteria and their ability to local (colon) production of biologically active human protein, as well as the lack of toxicity of such a therapy, makes L.lactis a promising carrier and producer of therapeutic proteins for future, alternative CRC treatment strategies.