

**ΥΠΟΨΗΦΙΟΣ : ΑΝΕΣΤΗΣ ΜΑΚΡΗΣ**

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ  
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
Μ. ΑΣΙΑΣ 115 27, ΑΘΗΝΑ, ΕΛΛΑΔΑ  
(+30) 6979073900  
Email: anestis\_makris@hotmail.com

**Επιβλέπων: Δρ. Αριστείδης Ηλιόπουλος**

**Τριμελής Επιτροπή: Δρ. Αριστείδης Ηλιόπουλος, Δρ. Παναγιώτης Βεργίνης, Δρ. Δημήτριος Μπούμπας**

**Τίτλος: Διερεύνηση της μεταβολικής λειτουργίας των Τ ρυθμιστικών κυττάρων σε στερεούς όγκους**

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θνησιμότητας παγκοσμίως, με 18,1 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις και 9,5 εκατομμύρια θανάτους το 2018 σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ). Θεμελιώδεις επιστημονικές ανακαλύψεις της τελευταίας δεκαετίας έδειξαν ξεκάθαρα ότι το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει ζωτικό ρόλο στην ανάπτυξη των όγκων, οι οποίοι εκμεταλλεύονται τα εξελιγμένα δίκτυα ανοσολογικής ανοχής προκειμένου να αποφευχθεί η αναγνώριση και συνάμα η καταστροφή τους από το ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν την μοναδική ικανότητα να στρατολογούν κύτταρα του ανοσοποιητικού με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες, όπως τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα (Τρυθ.) σε θέσεις όγκου, προκειμένου να αναστείλουν την δράση των αντικαρκινικών λεμφοκυττάρων, επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να ξεφύγουν της ανοσολογικής επιτήρησης [1].

Η πρόοδος στην κατανόηση της ανοσίας του όγκου οδήγησε στην αλλαγή του τρόπου με τον οποίο αντιμετωπίζονται θεραπευτικά κάποιοι όγκοι και την ανάπτυξη της ανοσοθεραπείας, όπου για πρώτη φορά γίνεται θεραπευτική στόχευση των κυττάρων του ανοσοποιητικού έναντι των καρκινικών κυττάρων. Μια πραγματική ανακάλυψη στον τομέα της ανοσοθεραπείας ήρθε με τη χρήση αναστολέων ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου (ICI) (James P. Allison and Tasuku Honjo, Βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής 2018), δηλαδή ανταγωνιστικών αντισωμάτων τα οποία μπλοκάρουν βασικά ανοσορυθμιστικά μόρια (μόρια σημείου ελέγχου), όπως το κυτταροτοξικό αντιγόνο 4 που σχετίζεται με τα Τ-λεμφοκύτταρα (CTL-A4), την προγραμματισμένη πρωτεΐνη θανάτου κυττάρων (PD-1) και τον προσδέτη της PD-L1 που υπό φυσιολογικές συνθήκες καταστέλλει την λειτουργία των Τ δραστικών κυττάρων. Τα ICI απελευθερώνουν τη λειτουργία των Τ δραστικών κυττάρων ενώ ταυτόχρονα περιορίζουν την κατασταλτική δράση των Τρυθ.[2]. Η στόχευση αυτών των σημείων ελέγχου σε ασθενείς που ζουν με προχωρημένες κακοήθειες έχει οδηγήσει σε μακροχρόνιες αποκρίσεις όγκου, **αλλά σε μικρό ποσοστό ασθενών**. Επιπρόσθετα, παρά



την αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητά τους, αυτές οι νέες μέθοδοι θεραπείας ήρθαν με ένα κόστος. Με την διατάραξη του ανοσοποιητικού συστήματος, οι αναστολείς σημείου ελέγχου οδήγησαν σε ένα ευρύ φάσμα σοβαρών αυτοάνοσων εκδηλώσεων που περιγράφεται ως ανεπιθύμητες ενέργειες σχετιζόμενες με το ανοσοποιητικό σύστημα (irAEs) [3-6].

Το γεγονός ότι οι περισσότεροι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στα ICI, υποδηλώνει ότι υπάρχουν μη εκτιμημένοι μηχανισμοί αντίστασης. Ένας θεμελιώδης μηχανισμός αντίστασης για την ανοσοθεραπεία στον καρκίνο είναι και η συσσώρευση των Τρυθ. μέσα στον όγκο [7]. Παρόλο που έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές προσπάθειες για τον καθορισμό των μηχανισμών που επεξεργάζονται οι όγκοι για την προώθηση της διέγερσης, της λειτουργίας και του πολλαπλασιασμού των Τρυθ., τα μοριακά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των Τρυθ. σε ασθενείς με καρκίνο παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστα.

Τα Τρυθ. είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της ανοσοποιητικής ομοιόστασης και της ανοχής [8-9]. Αποτελούν έναν πολύ πλαστικό και ετερογενή πληθυσμό που χαρακτηρίζεται γενικά ως  $CD4^+CD25^+CD127^+Foxp3^+$  κύτταρα στο περιφερικό ανθρώπινο αίμα. Στον καρκίνο, τα Τρυθ. αυξάνονται στο περιφερικό αίμα και κυριαρχούν στο μικροπεριβάλλον του όγκου, αποτελώντας ένα θεμελιώδες εμπόδιο για την επιτυχία της ανοσοθεραπείας του καρκίνου [7, 10-15]. Το μικροπεριβάλλον του όγκου όντας φτωχό σε θρεπτικά συστατικά, υποξικό και όξινο, καθίσταται το ιδανικό περιβάλλον για τον πολλαπλασιασμό και την δράση των Τρυθ. που βασίζονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση για την αποτελεσματική λειτουργία τους [10]. Η παρουσία των Τρυθ. στον όγκο έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση, εξέλιξη όγκου, διηθητικότητα καθώς και μετάσταση [7, 13]. Τα ICI που χρησιμοποιούνται έως σήμερα στοχεύουν επίσης τα Τρυθ. καθώς τα μόρια σημείου ελέγχου εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στην επιφάνειά τους, επομένως είναι εύλογο ότι η ανάπτυξη των irAEs μπορεί να αποδοθεί στην αποσταθεροποίηση των Τρυθ. ή στην πλαστικότητα τους προς προφλεγμονώδη δράση. Προς αυτή την κατεύθυνση: α) τα προκαταρκτικά δεδομένα μας αποκαλύπτουν ότι η αποσταθεροποιημένη μεταβολική λειτουργία των Τρυθ. προωθεί την ανάπτυξη αυτοανοσίας [16], β) η ομάδα μας πρόσφατα απέδειξε ότι το αντι-CTLA-4 διαταράσσει την επικοινωνία μεταξύ  $Foxp3^+$  Τρυθ. και των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων προωθώντας την αυτοανοσία [17] και τέλος γ) τα αρχικά δεδομένα μας δείχνουν έναν έντονο γονιδιακό επαναπρογραμματισμό των κυκλοφορούντων  $CD4^+CD25^+CD127^+$  Τρυθ., στο αίμα των ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα που αναπτύσσουν irAEs μετά από θεραπεία με ICI, προς έναν φαινότυπο που ευνοεί την προφλεγμονώδη δράση και συνοδεύεται από μεταβολικές μεταβολές.



Με βάση όλα τα παραπάνω, η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στα Τρυθ. και προτείνει τη μελέτη της μεταβολικής τους λειτουργίας σε συμπαγείς όγκους για θεραπευτική παρέμβαση. Συγκεκριμένα, οι κύριοι στόχοι μας είναι: α) να διερευνήσουμε το ρόλο του μεταβολισμού των Τρυθ. σε συμπαγείς όγκους, β) να ταυτοποιήσουμε τους μηχανισμούς που υπαγορεύουν τις μεταβολικές μεταβολές τους, και γ) να προσδιορίσουμε τον τρόπο με τον οποίο οι τρέχουσες ανοσοθεραπείες επηρεάζουν το μεταβολισμό των Τρυθ. στον όγκο και να στοχεύσουμε τα μεταβολικά σημεία ελέγχου των Τρυθ. προκειμένου να μειώσουμε την ανάπτυξη του όγκου και την εκδήλωση των irAEs.

**Αναμένεται ότι ο ενδελεχής χαρακτηρισμός των μηχανισμών αυτών των ισχυρών ρυθμιστικών κυττάρων στο πλαίσιο του όγκου θα παράσχει σημαντικές πληροφορίες για το σχεδιασμό νέων ανοσοθεραπειών για την αξιοποίηση της αντικαρκινικής ανοσίας διατηρώντας παράλληλα τον έλεγχο της αυτοάνοσης απόκρισης.**

#### Βιβλιογραφία

1. Hatzioannou, A., T. Alissafi, and P. Verginis, *Myeloid-derived suppressor cells and T regulatory cells in tumors: unraveling the dark side of the force*. J Leukoc Biol, 2017. 102(2): p. 407-421.
2. Chen, D.S. and I. Mellman, *Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point*. Nature, 2017. 541(7637): p. 321-330.
3. Freeman-Keller, M., et al., *Nivolumab in Resected and Unresectable Metastatic Melanoma: Characteristics of Immune-Related Adverse Events and Association with Outcomes*. Clin Cancer Res, 2016. 22(4): p. 886-94.
4. Amos, S.M., et al., *Autoimmunity associated with immunotherapy of cancer*. Blood, 2011. 118(3): p. 499-509.
5. Michot, J.M., et al., *Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review*. Eur J Cancer, 2016. 54: p. 139-148.
6. Weber, J.S., et al., *Toxicities of Immunotherapy for the Practitioner*. J Clin Oncol, 2015. 33(18): p. 2092-9.
7. Tanaka, A. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in cancer immunotherapy*. Cell Res, 2017. 27(1): p. 109-118.
8. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. 27(1): p. 20-1.
9. Littman, D.R. and A.Y. Rudensky, *Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation*. Cell, 2010. 140(6): p. 845-58.
10. Wahl, D.R., et al., *Distinct metabolic programs in activated T cells: opportunities for selective immunomodulation*. Immunol Rev, 2012. 249(1): p. 104-15.
11. Tang, Y., et al., *An increased abundance of tumor-infiltrating regulatory T cells is correlated with the progression and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. PLoS One, 2014. 9(3): p. e91551.
12. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. 10(9): p. 942-9.
13. Leffers, N., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2009. 58(3): p. 449-59.
14. Sharma, A., et al., *Anti-CTLA-4 immunotherapy does not deplete FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) in human cancers*. Clin Cancer Res, 2018.

15. Sharma, P. and J.P. Allison, *Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential*. Cell, 2015. 161(2): p. 205-14.
16. Alissafi T., et al., *Mitochondrial Oxidative Damage Underlies Regulatory T Cell Defects in Autoimmunity*. Cell Metabolism 2020.
17. Alissafi, T., et al., *Tregs restrain dendritic cell autophagy to ameliorate autoimmunity*. J Clin Invest, 2017. **127**(7): p. 2789-2804



**Candidate: Anestis Makris**

MEDICAL SCHOOL OF ATHENS  
NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS  
M.ASIAS 115 27, ATHENS, GREECE  
(+30) 6979073900  
Email: anestis\_makris@hotmail.com

**Supervisor:** Prof. Aristides Eliopoulos,

**Committee:** Prof. Aristides Eliopoulos, Dr. Panayotis Verginis, Prof. Dimitrios Boumpas

**PhD Title:** Unraveling Regulatory T cell metabolic function in solid tumors

Cancer is among the leading causes of death worldwide, with 18.1 million new cases and 9.5 million cancer-related deaths worldwide in 2018 according to World Health Organization (WHO). Fundamental discoveries made over the last decade have unequivocally shown that the immune system plays a vital role in tumor development with tumors exploiting sophisticated immune tolerance networks to avoid immune recognition and destruction. Specifically, cancer cells have the unique ability to recruit immune cells with endowed immunosuppressive properties such as regulatory T cells (Tregs) into tumor sites, to form a highly tolerogenic tumor microenvironment (TME) [1], that inhibits antitumor lymphocytes, allowing cancer cells to escape immune surveillance.

Advances in our understanding of tumor immunity have prompted a paradigm shift in oncology, with the emergence of immunotherapy, where therapeutic agents are used to target immune cells rather than cancer cells. A real breakthrough in the field of immunotherapy came with the use of immune checkpoint inhibitors (ICI) (James P. Allison and Tasuku Honjo, Nobel Award in Physiology or Medicine 2018), namely antagonistic antibodies that block key immune regulatory molecules (checkpoint molecules), such as cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4), programmed cell death protein (PD-1) and its ligand PD-L1, that under physiologic conditions suppress T effector cell function. ICI mediate their effects by unleashing T effector cell function while simultaneously restraining Tregs [2]. Targeting these checkpoints in patients living with advanced malignancies has led to long-lasting tumor responses **yet only in a small proportion of patients**. Moreover, despite the proven effectiveness, these new treatment modalities came with a price. **By unbalancing the immune system, checkpoint inhibitors gave rise to a wide spectrum of severe autoimmune manifestations, described as immune-related adverse events (irAEs) [3-6].**

The fact that most patients remain unresponsive to ICI, suggests that unappreciated mechanisms of resistance exist. Mounting evidence suggests that intratumoral accumulation of Tregs, is a fundamental obstacle for the success of cancer immunotherapy [7]. Although major efforts have been placed to delineate the mechanisms that tumors elaborate to promote Treg induction, function and expansion, the molecular and functional characteristics of Tregs in cancer patients remain largely unknown.

Tregs, are essential for the maintenance of immune homeostasis and self-tolerance [8-9]. They comprise a highly plastic and heterogenic population characterized generally as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells in peripheral human blood. In cancer, Tregs are elevated in the peripheral blood and dominate the tumor microenvironment (TME), representing a fundamental impediment for the success of cancer immunotherapy [7, 10-15]. The TME is unique in that it is nutrient poor, hypoxic, and acidic, making it an ideal environment for proliferation and function of Tregs that rely on oxidative phosphorylation [10]. Treg presence



in the TME has been often correlated with poor prognosis, tumor progression, invasiveness as well as metastasis [7, 13]. Currently used ICI can also target Tregs, as checkpoint molecules are highly expressed on their surface, thus it is plausible that development of irAEs can be attributed to Treg de-stabilization or plasticity towards a pro-inflammatory nature. In support: a) our preliminary data reveal that de-stabilized Treg metabolic fitness dictates development of autoimmunity [16], b) our group recently demonstrated that anti-CTLA4 disrupts the crosstalk between Foxp3<sup>+</sup> Tregs and antigen-presenting cells to promote autoimmunity [17] and importantly c) **our initial data demonstrate an intense re-programming of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Tregs in blood of advanced melanoma patients developing irAEs following ICI therapy, towards a pro-inflammatory-favoring phenotype accompanied by enriched metabolic alterations.**

Based on all the above, the present thesis focuses on Tregs and proposes to study their metabolic function in solid tumors for therapeutic intervention. Specifically, our main objectives are: a) to explore the role of Treg metabolism in solid tumors, b) to identify the mechanisms dictating their metabolic alterations, and c) to unravel how current immunotherapies modulate Treg metabolism in the TME and whether targeting Treg metabolic checkpoints can affect tumor growth and development of irAEs.

**It is expected that the thorough characterization of the mechanisms of these powerful regulatory cells in the context of tumor will provide important insights towards the design of novel immunotherapies to harness the anti-tumor immunity while keeping in check the autoimmune response.**

#### Selected Bibliography

---

1. Hatzioannou, A., T. Alissafi, and P. Verginis, *Myeloid-derived suppressor cells and T regulatory cells in tumors: unraveling the dark side of the force*. J Leukoc Biol, 2017. 102(2): p. 407-421.
2. Chen, D.S. and I. Mellman, *Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point*. Nature, 2017. 541(7637): p. 321-330.
3. Freeman-Keller, M., et al., *Nivolumab in Resected and Unresectable Metastatic Melanoma: Characteristics of Immune-Related Adverse Events and Association with Outcomes*. Clin Cancer Res, 2016. 22(4): p. 886-94.
4. Amos, S.M., et al., *Autoimmunity associated with immunotherapy of cancer*. Blood, 2011. 118(3): p. 499-509.
5. Michot, J.M., et al., *Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review*. Eur J Cancer, 2016. 54: p. 139-148.
6. Weber, J.S., et al., *Toxicities of Immunotherapy for the Practitioner*. J Clin Oncol, 2015. 33(18): p. 2092-9.
7. Tanaka, A. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in cancer immunotherapy*. Cell Res, 2017. 27(1): p. 109-118.
8. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. 27(1): p. 20-1.
9. Littman, D.R. and A.Y. Rudensky, *Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation*. Cell, 2010. 140(6): p. 845-58.
10. Wahl, D.R., et al., *Distinct metabolic programs in activated T cells: opportunities for selective immunomodulation*. Immunol Rev, 2012. 249(1): p. 104-15.
11. Tang, Y., et al., *An increased abundance of tumor-infiltrating regulatory T cells is correlated with the progression and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. PLoS One, 2014. 9(3): p. e91551.

12. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. 10(9): p. 942-9.
13. Leffers, N., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2009. 58(3): p. 449-59.
14. Sharma, A., et al., *Anti-CTLA-4 immunotherapy does not deplete FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) in human cancers*. Clin Cancer Res, 2018.
15. Sharma, P. and J.P. Allison, *Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential*. Cell, 2015. 161(2): p. 205-14.
16. Alissafi T., et al., *Mitochondrial Oxidative Damage Underlies Regulatory T Cell Defects in Autoimmunity*. Cell Metabolism 2020.
17. Alissafi, T., et al., *Tregs restrain dendritic cell autophagy to ameliorate autoimmunity*. J Clin Invest, 2017. 127(7): p. 2789-2804