

Gliwice, 11.09.2023

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr Anny Mistarz

Tytuł rozprawy: “Reprogramming the tumor microenvironment in ovarian cancer by oncolytic virotherapy targeting CXCL12 chemokine/CXCR4 receptor signaling pathway.”
(Przeprogramowanie mikrośrodowiska guza raka jajnika przy wykorzystaniu wirusoterapii onkolitycznej wycelowanej w oś sygnałową CXCL12/CXCR4.)

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr. Anny Mistarz została wykonana w Zakładzie Immunologii Roswell Park Comprehensive Cancer Center w Buffalo w stanie Nowy Jork, pod kierunkiem prof. Danuty Kozbor oraz prof. dr hab. Hanny Rokity z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Cele pracy można zdefiniować jako porównanie różnic w odpowiedzi przeciwnowotworowej u dzikich, immunokompetentnych myszy oraz w syngenicznym modelu tolerogennym, pod wpływem wirusoterapii onkolitycznej nacelowanej na blokowanie sygnalizacji komórkowej przez oś CXCL12/CXCR4.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska ma postać monografii, liczy 93 strony i zawiera: podziękowania, listę skrótów, listę rycin oraz tabel, streszczenia - w języku angielskim i polskim, wstęp (Introduction), opis metod, wyniki, dyskusję i bibliografię. W pracy nie ma rozdziału zawierającego opis celów, jak również nie ma wniosków czy podsumowania. Na bibliografię składają się 152 pozycje, w mojej opinii właściwie dobrane.

Końcowy rozdział rozprawy to lista publikacji, których Doktorantka jest współautorką. Jest to łącznie pięć artykułów oryginalnych, opublikowanych w latach 2016-2023, sumaryczny współczynnik oddziaływania wynosi ponad 25 pkt; w trzech pracach mgr Mistarz jest pierwszym autorem. Jest to bardzo znaczący dorobek naukowy. Cztery publikacje powstały jako efekt pobytu w Roswell Park; na uwagę zasługuje tu lista współautorów, wśród których jest m.in. prof. Kunle Odunsi, wielkiej klasy specjalista ginekologii onkologicznej i czołowy badacz z zakresu immunoterapii raka jajnika oraz wirusoterapii.

We wstępie Doktorantka omawia krótko zagadnienia związane z rakiem jajnika i z metodami leczenia tego nowotworu. Na stronach 15/16 – pojawia się raczej niestandardowa definicja platyno-wrażliwości/oporności guza. Tutaj mam prośbę o zapoznanie się z literaturą tematu (np. prace o następujących numerach DOI: 10.1200/JCO.1992.10.4.513, 10.20517/cdr.2022.13, 10.20517/cdr.2022.01) i odniesienie się do zagadnienia platyno-wrażliwości/oporności. Jak są definiowane te pojęcia, jak ta definicja ewoluuje w czasie, jakie przyjmuje się czasy do nawrotu dla poszczególnych kategorii, czy jest to zmienna skokowa, jak się ogólnie przyjmuje, czy może jednak ciągła?

W dalszych rozdziałach Doktorantka opisuje wirusa krowianki i jego możliwe zastosowania w terapii onkolitycznej, następnie oś sygnałową CXCR4/CXCL12, komórkowe składniki mikrośrodowiska guza (komórki mieloidalne, w tym makrofagi związane z guzem (TAM)

i limfocyty, a także fibroblasty związane z rakiem (CAF)) oraz zjawisko tolerancji immunologicznej, zarówno w fizjologii jak i patologii, a na koniec sekwencjonowanie transkryptomu pojedynczych komórek (scRNA-seq).

Z obowiązku recenzenta muszę wymienić (nieliczne) drobne błędy edytorskie, które udało mi się wyśledzić w pracy, a także pewne zaskakujące i nieściśle sformułowania (tych jest więcej), przykładowo:

Str. 22. „Myeloid cells are the main cell branches generated during hematopoiesis...” – nieuprawniony skrót myślowy (komórki nie są gałęziami).

Str.29. Proszę o komentarz, co Doktorantka rozumie np. przez takie stwierdzenie: “There are many types of RNA that are essential for cell growth and differentiation”? Rodzaje RNA to zasadniczo mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, lncRNA, itd. Czy któryś rodzaj jest zdaniem Doktorantki szczególnie istotny dla wzrostu i różnicowania? Proszę o wyjaśnienie.

Str 31. W tekście nazwa szczepu mysiego: TgMISIIR-Tag-Low, na rycinie 4 – TgMISIIR-Tag-Low SV40 Tag+

Str 56/57. Ryc. 21 A i B – brak opisu, z jakiego układu eksperymentalnego komórki są tu analizowane metodą klasteryzacji? Czy to jest pula komórek z ascytu ze wszystkich układów eksperymentalnych (WT control, WT treated, Tg control, Tg treated?). Skrót z legendy Ryc. 21 C: NKT – prawdopodobnie natural killer T cells, nie jest wyjaśniony i nie ma go w spisie skrótów.

Str 66 u góry: jest ...on day 9 and 10... - powinno być ...on day 10 and 19...

Podsumowując ocenę formalną pracy, Doktorantka musiała się zmierzyć się z trudnym zadaniem opisu bardzo złożonego układu eksperymentalnego i w mojej subiektywnej opinii opis ten nie zawsze jest jasny i czytelny, a raczej dość hermetyczny, zrozumiały głównie dla osób zaangażowanych w projekt badawczy. Warto, być może, wziąć to pod uwagę w przyszłych opracowaniach. Również dodanie rozdziałów opisujących cele projektu i konkluzje wpłynęłoby pozytywnie na czytelność pracy.

Układ eksperymentalny

W pracy wykorzystano syngeniczny myszy model ortotopowego raka jajnika. Wykorzystano myszy szczepu C57BL/6 – dzikie (WT) oraz transgeniczne (TgMISIIRR-TAg-Low, otrzymane od dr Dennise Connoly), z ekspresją dużego antygeny T wirusa SV40 (TAg SV40) pod kontrolą promotora genu MISIIR (Müllerian inhibiting substance type II receptor), tkankowo-swoistego dla nabłonka powierzchniowego jajnika i nabłonka jajowodu. Szczep TgMISIIRR-TAg-Low charakteryzuje się niską ekspresją TAg SV40, nie powodującą widocznych patologii (np. spontanicznego tworzenia guzów jajnika/jajowodu). Do tworzenia ortotopowych guzów jajnika używano linii komórkowej MOVCAR 5009, wyprowadzonej przez dr Dennise Connoly od syngenicznych myszy transgenicznych (TgMISIIRR-TAg-SV40-Tag+) z wysoką ekspresją TAg SV40 w nabłonku jajników i jajowodów, czego efektem był szybki rozwój guzów i wysięku otrzewnowego. Jest to model odpowiadający niskozróżnicowanemu rakowi surowiczemu jajnika (HG-SOC) u człowieka, czyli najczęstszemu i najgroźniejszemu typowi histologicznemu raka jajnika. Linia MOVCAR 5009 charakteryzuje się ekspresją TAg SV40; myszy dzikie (WT) są antygenowo-naiwne w odniesieniu do TAg SV40, a myszy transgeniczne TgMISIIRR-TAg-Low są gospodarzem tolerogennym. Ten elegancki i złożony model umożliwia badanie odpowiedzi układu odpornościowego na obecność komórek nowotworowych oraz na leczenie przeciwnowotworowe u gospodarza immunokompetentnego i w modelu tolerogennym.

Myszy dzikie i transgeniczne obarczone nowotworem z komórek MOVCAR 5009 leczono za pomocą wirusoterapii onkolitycznej. W tym celu wykorzystywano dwie modyfikacje wirusa krowianki: OV-EGFP (z ekspresją białka reporterowego EGFP) oraz OV-CXCR4-A – z ekspresją antagonisty receptora CXCR4. Konstrukty OV-EGFP służył do oceny właściwości

terapeutycznych samego wirusa krowianki, zaś OV-CXCR4-A – został zaprojektowany w taki sposób, żeby wzmacniać efekt terapeutyczny wirusa poprzez hamowanie sygnalizacji cytokinowej na osi CXCL12/CXCR4. Ten szlak sygnalizacyjny jest wykorzystywany przez immunosupresyjne komórki CAF (cancer associated fibroblasts), a jego zablokowanie może prowadzić do nasilenia odpowiedzi przeciwnowotworowej ze strony limfocytów T CD8+ i eliminacji komórek guza.

W obu modelach mysich (WT i Tg) Doktorantka oceniała tumorogenność komórek MOVCAR 5009 i progresję guzów u myszy nieleczonych oraz odpowiedź na leczenie i status immunologiczny mikrośrodowiska nowotworowego (jako mikrośrodowisko traktowano płyn wysiękowy z jamy otrzewnej, ascyt). Analizie podlegały komórki makrofagów związanych z guzem (TAM), fibroblastów związanych z rakiem (CAF) i limfocytów związanych z guzem (TAL). Do detekcji i charakteryzowania poszczególnych populacji stosowano cytometrię przepływową (FACS) z użyciem swoistych przeciwciał i analizę transkrytomu.

Aby ocenić rolę limfocytów T4 i T8 w odpowiedzi przeciwnowotworowej wykonano eksperyment z eliminacją limfocytów (T-cell depletion study). W ten sposób wykazano kluczową rolę komórek CD8+ w odpowiedzi przeciwko guzom MOVCAR 5009.

Wykonano także adopcyjny transfer komórek (adoptive cell transfer) TAM i CAF z ascytu myszy Tg obciążonych nowotworem, do myszy dzikich z guzami z komórek MOVCAR 5009. Wpływ TAM i CAF na wzrost guzów monitorowano za pomocą bioluminescencji, wykazując ich immunosupresyjne działanie (manifestujące się jako szybszy wzrost guza) w porównaniu do TAM i CAF pochodzących z myszy dzikich.

Cytotoksyczność komórek CD8+ pochodzących od kontrolnych i leczonych OV-CXCR4-A myszy, zarówno dzikich jak i Tg, oceniano in vitro względem komórek MOVCAR5009.

Bardzo ciekawą częścią pracy jest analiza transkryptomu komórek ascytu od myszy dzikich i Tg, obciążonych guzami MOVCAR5009, kontrolnymi i leczonymi OV-CXCR4-A za pomocą wyrafinowanej techniki (scRNA-seq). Dane analizowano nienadzorowaną metodą klasteryzacji; analiza ekspresji głównych genów definiujących klastry pozwoliła scharakteryzować je pod kątem populacji komórkowych, które poszczególne klastry reprezentują. Obrazy klasteryzacji (Ryc. 21 i 24) bardzo czytelnie ilustrują zmiany populacji komórek mikrośrodowiska pod wpływem terapii onkolitycznej u obydwu typach gospodarza (immunokompetentnego i tolerogennego), zaś analiza profilu ekspresji genów i analiza szlaków sygnałowych pokazuje kluczowe geny i mechanizmy sygnalizacyjne zaangażowane w proces immunosupresji vs. odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Odnosnie tego elementu pracy (Ryc. 21 A i B), interesuje mnie czy w ascycie nie wykrywano w ogóle sygnatury typowej dla komórek mezotelialnych/międzybłonek? One powinny być obecne w ascycie. Czy był problem z detekcją takiej sygnatury, czy nie zwrócono na nią uwagi? Drugie moje pytanie do tej części pracy dotyczy problemu ograniczonej skuteczności terapii raków jajnika za pomocą inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych. Czy w analizie uzyskanych danych transkryptomicznych można próbować analizować (raczej nie wprost, bo struktura eksperymentu nie jest nakierowana na taki cel) to zagadnienie?

Odnosnie terapii onkolitycznej, brakuje mi trochę pogłębionej analizy dla porównania odpowiedzi na terapię OV-EGFP vs. OV-CXCR4-A, w szczególności odpowiedzi na pytanie, czy rzeczywiście w profilu ekspresji genów widać efekt zablokowania sygnalizacji na osi CXCL12/CXCR4? Czy korzystne efekty terapii konstruktem OV-CXCR4-A rzeczywiście wynikają z blokowania tej osi sygnałowej?

Ocena pracy doktorskiej

Praca doktorska mgr Mistarz obejmuje obszerny cykl doświadczeń z wykorzystaniem bardzo eleganckiego i złożonego modelu badawczego oraz szerokiego wachlarza zaawansowanych technik eksperymentalnych. Szczególnie atrakcyjna jest analiza metodą sekwencjonowania

transkryptomu pojedynczych komórek. Projekt pozwolił na systematyczną i uporządkowaną analizę szeregu zagadnień związanych z odpowiedzią przeciwnowotworową u myszy immunokompetentnych i tolerogennych.

Główne wnioski:

U myszy dzikich (immunokompetentnych), w odpowiedzi na rozwój guza z komórek MOVCAR 5009 obserwowano obecność komórek T CD8+ skierowanych przeciwko neoantygenowi TAg SV40, obecność fibroblastów o właściwościach immunostymulujących i zrównoważoną populację makrofagów M1/M2.

U myszy transgenicznych (tolerogennych) komórki MOVCAR 5009 były bardziej tumorogenne, a mikrośrodowisko guza miało cechy immunosupresyjne (obecność komórek CAF, przewaga makrofagów M2, niski poziom komórek T CD8+ przeciwko TAg SV40)

Terapia onkolityczna powoduje specyficzną dla TAg SV40 odpowiedź komórek T; odpowiedź ta jest silniej wyrażona u myszy immunokompetentnych w porównaniu do tolerogennych, a także w przypadku terapii wirusem OV-CXCR4-A, w porównaniu z dzikim (OV-EGFP).

Odpowiedź przeciwnowotworowa jest zależna głównie od limfocytów T CD8+, które u myszy dzikich są w pełni funkcjonalne, zaś u myszy Tg mają cechy dysfunkcji (exhausted phenotype). Jest to widoczne zarówno w testach funkcjonalnych in vitro (obniżona cytotoksyczność) jak i w profilu ekspresji genów (scRNA-seq).

Terapia OV-CXCR4-A częściowo przewycięża stan immunosupresji u myszy Tg – znacząco zmniejsza się liczba komórek CAF oraz następuje częściowa polaryzacja makrofagów M2 do fenotypu M1.

Podsumowując, Doktorantka wykazała, że terapia wirusem onkolitycznym uzbrojonym w antagonistę receptora CXCR4 wydajnie zwiększa odpowiedź przeciwnowotworową, nawet w przypadku tolerogenicznego gospodarza, a także szczegółowo scharakteryzowała mechanizm tego zjawiska. Jest to bardzo elegancki i kompletny zestaw badań o dużym potencjale przedklinicznym.

W mojej opinii, praca spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2023 r. poz. 742, 1088 i 1234; ogłoszone dnia 30 kwietnia 2023 r.), dlatego wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Anny Mistarz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką jakość badań wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz fakt opublikowania wyników w artykułach, w których Doktorantka jest pierwszym autorem – wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. Katarzyna Lisowska

Narodowy Instytut Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie PIB, Oddział w Gliwicach