



ul. Rokietnicka 8
60-806 Poznań
tel. 061 8547635

PAN - Instytut Immunologii	
Wpł. dnia	26-09-2019
l. dz.	329/2019

Poznań, 22.09.2019

O c e n a

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Bożeny Ścirka pt.: „Zróżnicowanie repertuaru receptorów antygenowych limfocytów T (TCR) w przebiegu eksperymentalnej immunoterapii mysiego czerniaka B16 przeciwciałem anti-GTR”

W ostatnich latach immunologia i immunoterapia nowotworów znalazły się w centrum zainteresowania badaczy na całym świecie. Doprowadził do tego gwałtowny rozwój technik biologii molekularnej w tym programów sekwencjonowania ludzkiego genomu czy genomu nowotworów tzw. (*The Cancer Genom Atlas Project*) oraz metod analiz funkcjonalnych poszczególnych elementów układu odpornościowego. Już blisko 150 lat temu amerykański lekarz William Coley, nazywany później ojcem immunoterapii, zaobserwował iż u chorych na różę cofają się różnego typu guzy nowotworowe. Idąc tym śladem wykonał izolaty ze zmian zapalnych i wstrzykiwał je bezpośrednio do guzów u chorych w tym czerniaka. Okazało się, że guzy te znikają. Z czasem uzyskał bakterie ze zmian zapalnych i powstała tzw. „toksyna Coleya”, którą stosowano do 1953 r. Dr Coley podał swoją szczepionkę około 1000 chorych, a szczegółowe retrospektywne analizy wykazały obiektywne odpowiedzi kliniczne co najmniej u 500 z nich. Wraz z rozwojem chemio- i radioterapii zapomniano o tzw. „szczepionkach rakowych Coleya”. Gdy możliwości powyższych terapii osiągnęły plato nastąpił nawrót do terapii biologicznych w tym szczepionek rakowych. Prowadzono tysiące badań klinicznych różnych typów szczepionek, których wyniki badań przedklinicznych były bardzo zachęcające. Niestety w większości rejestracyjnych badaniach klinicznych nie potwierdzono ich efektywności. Obecnie dopuszczone są do obrotu dwie szczepionki terapeutyczne, jedna na raka stercza druga na czerniaka. Okazuje się, że w zasadzie wszystkie testowane szczepionki indukowały odpowiedź immunologiczną, jednak nie były w stanie eliminować

rozrastających się guzów. Opisywano liczne przypadki odpowiedzi klinicznych powyższych szczepionek, jednak nie były one wystarczająco istotne statystycznie.

Dopiero wyniki badań ostatniego 20-lecia, które doprowadziły do odkrycia punktów kontrolnych układu immunologicznego zrewolucjonizowały immunoterapię kliniczną (Nagroda Nobla 2018; J. Allison i T. Honjo). Zaczęliśmy lepiej rozumieć interakcje między nowotworem i chorym co zaowocowało zyskiem klinicznym u pacjentów. Nadal jednak nie są w pełni poznane mechanizmy działania przeciwnowotworowego poszczególnych elementów układu obronnego oraz mechanizmy obronne samego guza.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Bożeny Ścirka dotyczy więc niezwykle istotnych i aktualnych zagadnień związanych z poznaniem mechanizmów indukowanych przez inhibitory punktów kontrolnych układu immunologicznego w modelu immunoterapii czerniaka u myszy.

Rozprawa ma układ klasyczny, zawiera rozdziały typowe dla tego typu opracowań. Obejmuje łącznie 136 stron druku, 27 rycin, 15 tabel oraz 158 pozycji piśmiennictwa.

We wstępie, który stanowi ok. 40% dzieła, Autorka opisuje zagadnienia związane z epidemiologią i biologią czerniaka oraz molekularnymi i komórkowymi podstawami procesów związanych z patogenezą czerniaka, mechanizmami progresji choroby oraz roli lokalnej hipoksji guza. Nawiązuje do immunoterapii czerniaka, szczególnie przy użyciu niektórych typów szczepionek czerniakowych. W kolejnych podrozdziałach Kandydatka omawia podstawowe procesy interakcji między guzem i gospodarzem, szczególnie udziału i roli subpopulacji limfocytów T w montowaniu i regulacji przez komórki T regulatorowe (Treg) swoistej przeciw-nowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Następnie szeroko i szczegółowo omawia tworzenie i zróżnicowanie repertuaru antygenowych receptorów limfocytów T (TCR). W następnych podrozdziałach Autorka powraca do immunoterapii nowotworów ogniskując się na inhibitorach immunologicznych punktów kontrolnych i ponownie roli Treg w immunostymulacji przez szczepionki czerniakowe oparte na komórkach dendrytycznych. Finalnie, Kandydatka przedstawia czytelnikowi cząsteczkę występującą na powierzchni Treg - **Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor (GITR)**, której kostymulacja wraz z TCR prowadzi do zahamowania ich funkcji supresorowej, a ułatwia aktywację, proliferację i wytwarzanie cytokin przez limfocyty efektorowe (Tef). W tej części Autorka opisuje efekty działania

agonistycznego przeciwciała, które stymuluje ekspresję GITR na Treg wraz z perspektywami zastosowania go w immunoterapii czerniaka oraz innych nowotworów. Niestety cytowane we wstępie publikacje pochodzą sprzed 2011 roku, trudno się więc zorientować jaki jest obecnie status zaawansowania badań nad GITR, szczególnie w zakresie badań klinicznych.

Cel ogólny pracy przedstawiono poprawnie i przejrzysto. Cele szczegółowe Autorka przedstawiła w formie zadań badawczych.

W rozdziale Materiał i Metody Autorka opisuje warsztat badawczy. Bardzo szczegółowo opisuje wykorzystane odczynniki, sekwencje starterów, czy zestawów tagów do tworzenia bibliotek regionów CDR3. Charakteryzuje materiał biologiczny (linie komórkowe, przeciwciała), zwierzęta transgeniczne. Imponująca jest ilość i jakość zastosowanych procedur badawczych, co świadczy o doskonałym przygotowaniu merytorycznym kandydatki. Wykorzystano najnowocześniejsze technologie biologii komórki i biologii molekularnej z sekwencjonowaniem przy użyciu platformy Ion Torrent włącznie. Kandydatka opisuje podstawy technologiczne poszczególnych technik i przebieg prowadzonych badań, co umożliwi ewentualne wykorzystanie warsztatu przez innych badaczy. W celu analizy wyników opracowano specjalistyczne programy informatyczne (DNA seq i DNA baza).

Wyniki przedstawiono jasno w formie opisowej wzbogaconej przez bardzo liczne ryciny i zestawienia tabularyczne. Rozdział zawiera imponującą ilość danych.

Dyskusja jest prowadzona poprawnie. Autorka prezentuje uzyskane wyniki na tle dotychczasowej wiedzy. Logicznie i konsekwentnie omawia istotę oraz znaczenie przeprowadzonych badań. Przedstawia również potencjał praktycznego zastosowania agonistycznego przeciwciała GITR w immunoterapii czerniaka, zwracając jednocześnie uwagę na możliwą odpowiedź autoimmunologiczną i związane z nią zdarzenia niepożądane.

Wnioski przedstawiono jasno. Niestety sformułowanie niektórych z nich brzmi raczej jak wyniki badań, a nie wnioski z nich wypływające.

Streszczenie wygląda jakby składało się z jednej części, która obejmuje wprowadzenie do badań i cel pracy. Brakuje opisu wyników i przedstawienia wniosków. Jednym słowem streszczenie nie jest kompletne.

W tekście autorka zamiennie używa nazwy węzeł wartowniczy i węzeł strażniczy. W polskiej nomenklaturze medycznej poprawnie jest węzeł wartowniczy.

Nie wszystkie cytowane prace znajdują się w spisie publikacji np. (Kuczma et al. 2010). Powyższe szczegóły nie wpływają na wartość dyzertacji.

Przedstawiona rozprawa doktorska jest na bardzo wysokim poziomie merytorycznym. Badania przeprowadzono na unikatowym modelu myszy transgenicznym. Założenia jak i realizacja pomimo pewnych trudności technologicznych (np. uzyskanie odpowiedniej do analizy liczby komórek) są oryginalne i wnoszą nowe informacje związane z mechanizmami regulującymi odpowiedź immunologiczną indukowaną przez receptor GITR.

Autorka wykazała, że już jednokrotne podanie agonistycznego przeciwciała DTA-1 hamuje wzrost guzów eksperymentalnych u myszy na drodze wzmocnienia odpowiedzi efektorowej limfocytów T przy jednoczesnej redukcji akumulacji Treg w guzie. Dominujące klonu Teff swoiste dla nowotworu występują zarówno u myszy leczonych jak i nieleczonych z podobną częstością. DTA-1 powoduje immunoedycję TCR Treg zarówno obwodowych jak i w guzie polegającą na deplecji klonów dominujących i pojawieniem się bardziej zróżnicowanych klonów o niskiej częstotliwości, które współdzielą TCR z Teff. Ponadto, DTA-1 eliminuje aktywowane Treg w guzie oraz faworyzuje proliferację i rekrutację obwodowych Treg (tzw. drugiej fali), które później naciekają nowotwór, i konkurują z Teff w rozpoznaniu tych samych antygenów. Może to utrudnić eliminację guzów.

Podsumowując uważam, że jest to rozprawa poświęcona ważnej i aktualnej tematyce, a oryginalne wyniki w niej zaprezentowane przybliżają nam znaczenie zróżnicowania repertuaru TCR w montowaniu przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Przedstawioną rozprawę doktorską mgr inż. Bożeny Ścirka oceniam wysoce pozytywnie. W związku z powyższym występuję z wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Bożeny Ścirka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. Andrzej Mackiewicz