



Warszawa, 15.01.2022

Prof. dr hab. Przemysław Juszczynski
Z-ca Dyrektora ds. Nauki
Kierownik Zakładu Hematologii Eksperymentalnej
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
Ul. Indiry Gandhi 14
Warszawa 02-776

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Dziedzic

„Charakterystyka molekularnego mechanizmu działania innowacyjnych związków małowcząsteczkowych w immunoterapii nowotworów ”

Jedną z typowych cech definiujących komórki nowotworowe jest ich zdolność do dynamicznego kształtowania/hamowania odpowiedzi immunologicznej (Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.) Zdobyte nauki podstawowych wyjaśniające zasady i mechanizmy interakcji między komórkami nowotworowymi a jego mikrośrodowiskiem i układem immunologicznym stały się podstawą opracowywania skutecznych form terapii dostępnych dziś w leczeniu tej grupy chorób. Z tego względu, immuno-onkologia stanowi niezwykle dynamicznie rozwijającą się i obiecującą dziedzinę nauk medycznych.

Jedną z ważniejszych cech mikrośrodowiska nowotworu, która zaburza lokalną odpowiedź immunologiczną przeciwko komórkom nowotworowym, jest uwalnianie

małocząsteczkowych metabolitów o immunosupresyjnym działaniu. Należy do nich adenozyzna, wiążąca się do receptorów adenozynowych na powierzchni limfocytów i innych komórek układu immunologicznego. Wiązanie tego metabolitu do receptorów wyłącza aktywność przeciwnowotworową tych komórek. Z tego względu, strategia hamowania oddziaływania adenozyzny z jej receptorami w celu przywrócenia immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej jest bardzo intensywnie rozwijanym kierunkiem badań.

W przedstawionej mi do recenzji pracy Doktorantka podejmuje się badań nad działaniem stworzonych w Ryvu Therapeutics antagonistów adenozyzny, blokujących działanie receptorów A_{2A} i A_{2B} . Zważywszy na trendy epidemiologiczne dotyczące zachorowalności na nowotwory i perspektywy/kierunki rozwoju terapii, tak sformułowany temat pracy, zwłaszcza w kontekście zastosowań nowych antagonistów adenozyzny o potencjale klinicznym, jest wyjątkowo potrzebny i aktualny. Celem głównym pracy była pełna charakterystyka antagonisty receptorów adenozynowych A_{2A} i A_{2B} zsyntetyzowanego w ramach projektu "Rozwój innowacyjnej immunoterapii nowotworów litych celującej w immunosupresyjne mikrośrodowisko guza". Pośrednie cele pracy Doktorantka definiuje następująco:

- a) opracowanie modeli badawczych służących do oceny aktywności związków chemicznych w komórkach układu odpornościowego,
- b) określenie poziomu i regulacji receptorów A_{2A} i A_{2B} na powierzchni badanych komórek,
- c) zbadanie aktywności antagonistów w modelach funkcjonalnych na poziomie tkanek,
- d) zweryfikowanie zasadności antagonizowania receptora A_{2B} i tworzenia podwójnych antagonistów receptorów adenozynowych,
- e) badania translacyjne związku umożliwiające inicjację badań klinicznych.

Praca została wykonana w ramach programu Ministerstwa Edukacji i Nauki „Doktorat Wdrożeniowy oraz projektu POIR „Rozwój innowacyjnej immunoterapii nowotworów litych celującej w immunosupresyjne mikrośrodowisko guza”.

Rozprawa przedstawiona mi do oceny posiada konstrukcję typową dla tego typu opracowań i obejmuje wstęp, przedstawienie celów i zakresu pracy, opis materiałów i metod, wyniki, dyskusję oraz wnioski. Rozprawę uzupełniają streszczenie w języku

polskim i angielskim, spis użytych skrótów oraz 277 dobrze dobranych pozycji piśmiennictwa.

We wstępie pracy, zgodnie z jej tytułem, szczególną uwagę Autorka poświęca molekularnym mechanizmom syntezy i oddziaływania adenozyiny. Autorka szczegółowo omawia szlaki syntezy i metabolizmu adenozyiny, mechanizmów jej działania na swoiste receptory, szlaki transdukcji sygnału i biologiczną charakterystykę znaczenia tego związku w kontekście działania układu odpornościowego (ale i w działaniu innych układów). Ta część pracy wskazuje na bardzo głęboką wiedzę autorki, jednak w kontekście tematu pracy brakuje tu rozdziału szerzej omawiającego zjawiska immunologiczne zachodzące w obrębie guza i inne niż adenozyina przyczyny dysfunkcji układu odpornościowego. Autorka we wstępie dokonuje także przeglądu związków firm konkurencyjnych.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka w sposób wyjątkowo szczegółowy – wręcz pedantyczny - przedstawia metodykę wykonanych doświadczeń. Ten fakt , w kontekście celów pracy, obejmujących wypracowanie metod do badań związku-antagonisty, zasługuje na szczególne podkreślenie i uznanie. Metodyka jest nowoczesna i bardzo adekwatna do przedstawionych celów pracy.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawia uzyskane wyniki i dokumentuje je w formie 27 rycin, 20 tabel i rycin uzupełniających. Wyniki prezentowane są w sposób bardzo szczegółowy, w większości przejrzysty i zrozumiały, uwzględniają odpowiednie kontrole, a wnioskowanie i interpretacja na podstawie uzyskanych wyników są rzetelne.

Do tej części pracy mam następujące uwagi i pytania:

1. Autorka wybrała pozytywną metodę selekcji limfocytów do badań . Ta metoda, poprzez fakt wiązania receptorów powierzchniowych przez przeciwciała skoniugowane z kulkami, wpływa na charakterystykę badanych komórek. W naszym laboratorium we wszelkich testach funkcjonalnych staramy się wykorzystywać metody selekcji negatywnej. Z jakiego powodu autorka wybrała tę metodę? Autorka sama zauważa (str. 69) , że ten sposób pozyskiwania komórek do badań wiązał się z koniecznością np. pipetowania komórek w celu oddzielenia ich od kulek. Pomijając skuteczność takiego działania, samo

pipetowanie, poprzez generowanie sił ścinających (*shear stress*), może powodować generowanie cAMP.

2. Rycina 9 : jak autorka interpretuje brak RNA ADORA2B w komórkach PC12 i obecność białka dla receptora 2B? Czy Autorka weryfikowała swoistość użytych przeciwciał np. nokautując gen *ADORA2B* ?
3. Rycina 12: mimo bardzo wysokich stężeń fNECA użytych w eksperymentach, nie udało się uzyskać wysycenia wiązania do receptorów powierzchniowych w PBMC. Może to świadczyć o nieswoistym wiązaniu związku do błon. Jak te wyniki interpretuje autorka? Co oznaczają słupki błędów na wykresach?
4. Rycina 16 : w badaniach desensytyzacji receptorów, nie doszukałem się jakiego antagonisty używała autorka.
5. Rycina 20: Praca bardzo zyskałaby, gdyby Autorka przedstawiła wyniki RNA - seq, a nie tylko wybrane geny. Z jakiego powodu tak cenny eksperyment pominięto ? Był przecież wykonany (Dyskusja).
6. W badaniach dotyczących wpływu antagonistów adenozyiny na aktywację komórek T , DC, brak mi badań mechanistycznych. We wstępie autorka omawia potencjalne mechanizmy, w jakich receptory ADO blokują signaling TCR Jeśli jest on zależny od szlaku PKA/CSK/LCK, to jakie znaczenie ma w tym kontekście generowanie cAMP? Jeśli znaczenie ma aktywacja CREB przez cAMP, który z kolei blokuje ekspresję genów NFkB-zależnych, czemu nie poddano analizie ich ekspresji? Te dane były dostępne RNA-seq.
7. W jakim mechanizmie ADO blokuje aktywność komórek NK? Czy antagonistą wpływa na spontaniczną cytotoksyczność czy także na ADCC?
8. Rycina 27 – ten eksperyment jest nieco niedokończony i można z niego było uzyskać znacznie więcej bardzo wartościowych informacji. Jakie komórki efektorowe są kluczowe dla synergii? Były to limfocyty T (które?), NK, makrofagi monocyty? Czy antagonistą adenozyiny wpływał na nacieczenie guza komórkami odpornościowymi (można się tego spodziewać, skoro antagonistą wpływa na syntezę chemokin – Ryc. 20?) Czy zmieniał fenotyp limfocytów (markery aktywacji/wyczerpania?)

W dyskusji Doktorantka omawia uzyskane wyniki, odwołując się do danych firm konkurencyjnych. Dość często Doktorantka w Dyskusji powołuje się na dane, których w Rozprawie nie prezentuje – uważam, że to błąd. Czytelnik nie jest w stanie ocenić danych, których nie może zobaczyć. Zważywszy, na fakt, że nie ma w tego rodzaju rozprawach ograniczeń objętościowych, można je było nawet zamieścić jako dane uzupełniające.

Recenzowaną rozprawę zamykają prawidłowo sformułowane wnioski odpowiadające celom pracy.

Pomimo przedstawionych powyżej uwag, które powinny stanowić przyczynek do dyskusji z Doktorantką w trakcie obrony, uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa stanowi ciekawe, samodzielne, oryginalne, bardzo nowatorskie i szerokie opracowanie naukowe i niesie bardzo dużą wartość poznawczą, wdrożeniową i spełnia ustawowe wymogi stawiane tego rodzaju opracowaniom.

Z pełnym przekonaniem pragnę przeto przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne UJ wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Dziedzic do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie pracy.

Z poważaniem,

