

Warszawa, 21.09.2021

Prof. dr hab. Przemysław Juszczyński
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 Anny Sosnowskiej

„ Zbadanie roli arginaz i mechanizmów przeciwnowotworowego działania inhibitorów arginazy ”

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.) Zdobycze nauk podstawowych wyjaśniające zasady i mechanizmy interakcji między komórkami nowotworowymi a ich 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 metabolizm aminokwasów, w tym L-argininy. Wysoka aktywność arginaz, czyli enzymów degradujących L-Arg, jest typową cechą mikrośrodowiska różnych typów nowotworów

i wiąże się z gorszymi wynikami leczenia i szybszą ich progresją. Wpływ L-Arg na działanie limfocytów T i rola arginaz w hamowaniu antygenowo - swoistej odpowiedzi limfocytów T znana jest od blisko 20 lat. Mechanizmy te wyjaśnili badacze z Louisiana State University w roku 2004 w serii publikacji, m.in. *Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine*. (J Biol Chem, 2002; 277: 21123-9) oraz *Arginase I Production in the Tumor Microenvironment by Mature Myeloid Cells Inhibits T-Cell Receptor Expression and Antigen-Specific T-Cell Responses*. (Cancer Research 2004; 64: 5839–5849). Z uwagi na ten profil aktywności arginaz, strategia hamowania tych enzymów w celu przywrócenia immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej jest bardzo intensywnie rozwijanym kierunkiem badań. Mimo tych wysiłków, do chwili obecnej do badań klinicznych wprowadzono zaledwie jeden związek o aktywności inhibitora arginazy, a żaden nie jest dostępnym klinicznie lekiem.

W przedstawionej mi do recenzji pracy Doktorantka podejmuje się badań nad rolą arginaz w kreowaniu „przyjaznego” dla komórek nowotworowych mikrośrodowiska oraz nad terapeutycznymi konsekwencjami wyłączenia aktywności arginaz swoistymi inhibitorami. Zważywszy na trendy epidemiologiczne dotyczące zachorowalności na nowotwory i obecne perspektywy/kierunki rozwoju metod leczenia w onkologii, tak sformułowany temat pracy, zwłaszcza w kontekście zastosowań nowych inhibitorów arginaz o potencjale klinicznym, jest wyjątkowo potrzebny i aktualny. Szczegółowe cele pracy doktorantka definiuje następująco:

1. *to investigate the effects of ARG1 expression or deficiency in the tumor microenvironment on in vivo tumor growth and the development of antitumor immune response*
2. *to investigate the effects of recombinant ARGs and the treatment with ARG inhibitors on the in vitro T-cells proliferation, CD3 expression and cytokines production*
3. *to compare the in vitro activity of ARG inhibitors in blocking the ARG1 and ARG2 associated with tumor cells*
4. *to evaluate the antitumor efficacy and the mechanism of action of ARG inhibitors in in vivo lung cancer model*

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 rycin, tabel, użytych skrótów oraz 312 pozycje piśmiennictwa (w większości bardzo aktualne). Całość rozprawy napisana jest w języku angielskim, poprawnie pod względem językowym i gramatycznym, z kilkoma niewielkimi błędami lub niezręcznościami w tej warstwie, które udało mi się wychwycić. Nie wpływają one jednak na merytoryczną ocenę pracy i pozwolę sobie je pominąć w niniejszej recenzji. Autorka we wstępie przedstawia biologiczne znaczenie mikrośrodowiska nowotworu, komórek układu immunologicznego w nim obecnych oraz zależności między komórkami nowotworowymi i mikrośrodowiskiem. Zgodnie z tytułem pracy, szczególną uwagę Autorka poświęca metabolizmowi argininy. Brakuje w tej części wyjaśnienia dynamiki kształtowania się zależności między komórkami nowotworowymi a układem immunologicznym, znanymi jako proces immunoedycji. Dalej Autorka porusza temat terapeutycznego zastosowania modulatorów/inhibitorów punktów kontrolnych układu immunologicznego, przedstawiając klinicznie dostępne i stosowane dziś przeciwciała blokujące układ PD-L1/2 - PD1 i CTLA4. Na końcu wstępu Autorka przedstawia krótki przegląd dostępnych inhibitorów arginaz. W tej części zabrakło mi kilku zdań na temat nowoczesnych terapii komórkowych (CAR-T), choćby z tego względu, że dla działania i proliferacji limfocytów z chimerycznym receptorem antygenowym dostępność argininy ma podobne znaczenie jak dla niemodyfikowanych limfocytów (Blood 2020;136:1155-1160).

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka szczegółowo, w sposób pozwalający na replikownie badań, przedstawia metodykę wykonanych doświadczeń.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawia uzyskane wyniki i dokumentuje je w formie 38 rycin. Do tej części pracy mam najwięcej uwag:

1. Znaczna część badań ma charakter odtwórczy. Duża część wykonanych badań replikuje wyniki z wcześniejszych prac, np. Cancer Research 2004; 64: 5839–5849 i nawet metodyka pracy jest miejscami zbliżona. Nie czynię jednakowoż z tego faktu zarzutu dyskwalifikującego rozprawę, ponieważ dla kluczowej części pracy, a więc oceny aktywności inhibitorów arginaz, wypracowanie modeli

zwierzęcych miało kluczowe znaczenie. Należy też podkreślić, że autorka twórczo rozwija i uzupełnia te wcześniejsze badania wykorzystując np. model myszy YARG. Niemniej jednak, wnioski dotyczące wpływu nadekspresji arginazy na wzrost guza, proliferację limfocytów i ekspresję CD3 ζ nie są oryginalne.

2. Sposób opisywania wyników nie pozwala zrozumieć jak wykonany był dany eksperyment, a sam tekst miejscami bywa nieco chaotyczny. Domyślam się, że autorka chciała uniknąć powtarzania szczegółowego opisu metod dostępnego w sekcji „Materials and Methods”, ale czytając wyniki chciałbym wiedzieć, jak wykonany był eksperyment, bez wracania za każdym razem do „Metod”. Autorka natomiast w większości dość dobrze opisuje ryciny w legendach, więc ten zarzut można uznać za techniczny i potraktować go jako sugestię, by przy pisaniu manuskryptu miała na uwadze, że recenzenci mogą oczekiwać bardziej precyzyjnego przedstawienia wyników, bez konieczności długiego poszukiwania czym na przykład w danym eksperymencie była kontrola negatywna, a czym pozytywna.
3. Niektóre z przedstawionych rycin są kompletnie nieczytelne z uwagi na użyty rozmiar czcionki i nie pozwalają na ich merytoryczną ocenę. Dotyczy to zwłaszcza tytułów osi scatterplotów badań cytometrycznych (np. strategia bramkowania przedstawiona na rycinie 11).
4. Rycina 13: Zgadzam się z wnioskiem, iż proliferacja limfocytów OT-I w guzach zaawansowanych jest słabsza niż w guzach wczesnych. Niemniej jednak, proliferacja limfocytów oraz ekspresja CD3 ζ w guzach wczesnych jest wyższa niż w kontroli pozytywnej. Jak autorka interpretuje te wyniki? Czy autorka badała jak obecność ARG na różnych etapach rozwoju nowotworu wpływa np. na wewnątrzkomórkowy signaling wapniowy i fosforylacje mediatorów (pERK itp.)?
5. Rycina 15: różnice statystyczne są przedstawione tylko dla dnia 17, pominięto dzień 19 i 21. Dla przejrzystości warto te dane było przedstawić, nawet jeśli nie są statystycznie istotne z uwagi na zwiększające się odchylenia standardowe.
6. Rycina 15 i 18: wydaje się, że wpływ „total KO” ARG na wzrost nowotworu jest większy niż „myelo KO”. Czy Autorka mogłaby się odnieść do tej hipotezy podczas obrony w trakcie dyskusji?

7. Rycina 20 przedstawia histogramy odpowiadające ekspresji ARG1 w różnych liniach komórkowych. Domyślam się zatem, że jest to barwienie z jednym przeciwciałem/fluorochromem – czym jest zatem kontrola FMO (Fluorescence minus one), stosowana przy ocenach multiparametrycznych? Czy chodziło o „unstained control”?
8. Rycina 26 i następne : rycina wskazuje na zastosowanie stężeń rekombinowanej arginazy rzędu ng/mL, tekst mówi o µg/mL. Co jest wartością prawidłową?
9. W eksperymentach z rARG oraz w eksperymentach przedstawionych na ryc. 22-24 warto było wprowadzić kontrolę z enzymatycznie nieaktywną ARG. Strukturę białka i centrum aktywnego autorka opisuje we wstępie – można zatem było wprowadzić mutację. Wykorzystanie takiej kontroli wykluczyłoby inne mechanizmy niż enzymatyczne i byłoby bardziej adekwatne niż „pusty wektor”.
10. Ryciny 33-36. Czy dla innych inhibitorów niż OAT-1746 oceniano proliferację limfocytów CD8? Jeśli nie – dlaczego?
11. Rycina 41- szkoda, że autorka nie pokusiła się o dodanie grupy kontrolnej w myszach RAG2^{-/-}. Spodziewam się braku efektu inhibitora w takim modelu, eksperyment wykluczyłby działania off-target badanych inhibitorów.
12. W nawiązaniu do poprzedniego punktu - w pracy brakuje prostego eksperymentu in vitro oceniającego wpływ inhibitorów OAT-1746 i OAT-1617 na proliferację /żywołność badanych komórek nowotworowych.
13. Głównym kompetytorem Autorki jest CB-1158. Szkoda, że nie porównano go ze związkami OAT-1746 i OAT-1617.

Recenzowaną rozprawę zamykają następujące wnioski:

1. *The impaired antigen-specific local immune response is dependent on ARG activity as ARG expression in the tumor microenvironment increases, while L-arginine plasma concentration decreases with tumor progression*
2. *ARG1 deficiency delays, whereas ARG1 overexpression accelerates LLC tumor progression in a lymphocyte-dependent manner*

3. *Both recombinant ARG1 and ARG2 suppress T-cells cultured in vitro. However, ARG inhibitors restore the T-cells proliferation, CD3 expression and cytokines production*
4. *OAT-1746 better than OAT-1617 and ABH inhibits the activity of tumor-associated and secreted ARG1 and ARG2, exhibiting the highest potential*
5. *ARG inhibition by OAT-1746 delays the LLC tumors progression by modulating T-cells response in the tumor microenvironment*
6. *ARG is a relevant target in cancer immunotherapy and inhibition of ARG represents a promising approach among other antitumor therapies.*

Analizując te wnioski ściśle i wyłącznie w kontekście wykonanych doświadczeń, wydaje się że wniosek nr 5 jest sformułowany na wyrost. W ocenie recenzenta, sformułowanie takiego wniosku wymagałoby albo deplecji limfocytów w układzie *in vivo*, albo wykorzystania modelu RAG2^{-/-} (doświadczenia z ryciny 45).

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

Z pełnym przekonaniem pragnę przeto przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosku o dopuszczenie mgr Anny Sosnowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

