

Warszawa, 21.07.2022

Dr hab. Ewa A. Grzybowska, prof. Instytutu
Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Marty Aleksandry Popędy

pt. ..: "Profile transkrypcyjne związane z układem immunologicznym w kontekście rozsiewu raka piersi"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marty Popędy została zrealizowana w Zakładzie Onkologii Translacyjnej Instytutu Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej Uniwersytetu Gdańskiego, a jej promotorką jest profesor Anna Żaczek. Zespół profesor Żaczek od lat zajmuje się badaniem progresji w raku piersi, w tym analizą krążących komórek nowotworowych (ang. *circulating tumor cells, CTC*) i jest ona jednym z największych w Polsce autorytetów w tej dziedzinie. Przedstawiona praca dotyczy analizy transkryptomicznej materiału pozyskanego od pacjentek chorych na raka piersi pod kątem związków z układem immunologicznym i rozsiewem nowotworu. Jest to bardzo nowatorskie ujęcie tematu i dlatego zasługuje na szczególną uwagę.

Udział układu immunologicznego w procesie przerzutowania jest udowodniony, jednak daleki od całkowitego wyjaśnienia, ze względu na ogromną złożoność tego zagadnienia, ilość zaangażowanych typów komórek, trudności natury technicznej zarówno w pozyskaniu jak i analizowaniu materiału i konieczność zaangażowania ogromnych środków. Prace takie jak przedstawiona do oceny powinny przyczynić się do wyjaśnienia wpływu reakcji układu immunologicznego na tworzenie przerzutu. Ważnym zagadnieniem podjętym w tej pracy jest też próba określenia związku zmian w transkryptomie komórek nowotworowych ze zmianami w podścielisku i wzajemnej wymiany sygnałów, co jest kluczowe dla progresji.

Rak piersi należy co prawda do tzw. „zimnych” immunologicznie nowotworów, czyli infiltracja guza przez komórki układu immunologicznego jest niewielka, co sugeruje że potencjalna immunoterapia może nie być skuteczna, ale nie oznacza to, że zagadnienia te nie powinny zostać zbadane, tym bardziej że szuka się rozwiązań skutkujących aktywacją immunologiczną „zimnych” nowotworów.

Przedstawiona praca składa się z czterech części, w każdej z których podstawą jest określenie immuno-transkryptomu guza pierwotnego w kontekście różnych czynników dodatkowych: fenotypu wykrytych krążących komórek nowotworowych (epitelialny vs. mezenchymalny), liczby płytek krwi we krwi obwodowej, obecności lub braku przerzutu do węzłów chłonnych w kontekście statusu EMT oraz badania sparowanych przerzutów do węzłów chłonnych przy rozsiewie drogą limfatyczną.

Narodowy Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie
– Państwowy Instytut Badawczy

ul. W.K. Roentgena 5
02-781 Warszawa

Dyrekcja
Tel.: +48 22 546 22 14
Fax: +48 22 546 31 90

dyrektor@pib-nio.pl
www.pib-nio.pl

Centrala
Tel.: +48 22 546 20 00
Fax: +48 22 546 33 00

NIP: 5250008057
REGON: 000288366

W publikacji 1 (NF-kappa B Signaling-Related Signatures Are Connected with the Mesenchymal Phenotype of Circulating Tumor Cells in Non-Metastatic Breast Cancer. *Cancers*. 2019 Dec 6;11(12):1961. doi: 10.3390/cancers11121961) doktorantka zbadała zmiany w immuno-transkryptomie 35 guzów pierwotnych w stadium nierozsianym, badając ich związek z wcześniej ustalonym przedoperacyjnie statusem krążących komórek nowotworowych we krwi obwodowej. Choć nie stwierdzono powiązania z samą obecnością CTC, analiza statystyczna z wykorzystaniem informacji dotyczących ich fenotypu (epitelialny/mezenchymalny) pozwoliła na ustalenie statystycznie istotnych zmian w ekspresji powiązanych z mezenchymalnym fenotypem CTC. Choć zmiany te dotyczą stosunkowo niewielkiej liczby genów (37) jest to bardzo spójna grupa, związana ze ścieżką sygnalizacyjną NF-kappa B (26 genów), co oczywiście może przekładać się na procesy regulowane przez tę ścieżkę (proliferacja, EMT, tworzenie przerzutów, odporność na leki) oraz na odpowiedź na stres i cytokiny i może modulować reakcję układu immunologicznego na obecność komórek nowotworowych.

Związek badanej grupy genów z przeżyciem został dodatkowo wykazany przez analizę danych klinicznych i transkryptomicznych zgromadzonych w ogólnie dostępnej bazie The Cancer Genome Atlas (TCGA). Wykazano, że zmiany w ekspresji genów wytypowanych w analizie guzów rozsiewających CTC o fenotypie mezenchymalnym są powiązane z czasem przeżycia całkowitego i wolnego od choroby, co sugeruje istotność zmian w tej ścieżce sygnałowej dla mechanizmu tworzenia przerzutu. Co więcej, wśród genów niezwiązanych ze ścieżką NF-kappa B znaleziono markery aktywacji płytek krwi, co wiąże się z drugą z prezentowanych publikacji.

W publikacji 2 (Higher platelet counts correlate to tumour progression and can be induced by intratumoural stroma in non-metastatic breast carcinomas *Br J Cancer*. 2022 Feb;126(3):464-471. doi: 10.1038/s41416-021-01647-9) doktorantka analizuje związek liczebności płytek krwi ze zmianami w immuno-transkryptomie guza pierwotnego w powiązaniu z reakcją podścieliska. Analiza czynników kliniczno-patologicznych wykazała związek wysokiej liczebności płytek krwi (górną kwartyl zakresu normy) ze stopniem złośliwości, mezenchymalnym fenotypem CTC, zajęciem węzłów chłonnych i czasem całkowitego przeżycia. Profilowanie poziomu cytokin w osoczu wykazało istotną zależność liczby płytek krwi z podwyższonym poziomem 8 cytokin.

W przypadku raka piersi należy założyć, że główną część analizowanych komórek guza pierwotnego stanowią komórki nowotworowe, ale ponieważ jest to analiza typu „bulk”, będzie tam również komponenta innych typów komórek. Z tego powodu doktorantka przeanalizowała skład guza posługując się algorytmem cytometrii cyfrowej CIBERSORT, pozwalającym na określenie frakcji określonego typu komórek na podstawie porównania profilu ekspresji otrzymanego z analizy guza ze specyficzną sygnaturą ekspresyjną charakterystyczną dla określonego typu leukocytów. Pozwoliło to na zaobserwowanie wzbogacenia w CD8-dodatnie limfocyty T oraz komórki tuczne, korelującego z wysokim poziomem płytek krwi - może to wynikać z faktu, że komórki infiltrujące nasilają produkcję cytokin, stymulując trombopoezę.

Należy podkreślić, że otrzymane dane zostały wykorzystane w maksymalny sposób z uzyskaniem wszystkich zawartych w nich informacji. Jednocześnie można jednak zasugerować, że pełna weryfikacja otrzymanych wyników i płynących z nich wniosków będzie możliwa przy zastosowaniu technik analizy pojedynczych komórek - wyniki takie pokażą np. rzeczywistą frakcję komórek układu immunologicznego czy fibroblastów i pozwolą na precyzyjniejsze określenie zmian w immuno-transkryptomie komórek guza po oddzieleniu komponenty związanej z ekspresją w infiltrujących leukocytach.

Zmiany w immuno-transkryptomie komórek raka piersi sugerują wymianę sygnałów pomiędzy komórkami nowotworowymi, a komórkami mikrośrodowiska, tzw. reaktywnego zrębu, zawierającego komórki układu immunologicznego a także fibroblasty. Fenotyp tych komórek ulega zmianie na pro-nowotworowy, wspomagający propagację komórek guza. Przedstawiona praca jest krokiem w kierunku analizy tej wymiany sygnałów. Tutaj również można zauważyć, że przeanalizowanie całego materiału guza pierwotnego z zastosowaniem techniki sekwencjonowania pojedynczych komórek dałoby głębszy wgląd we wzajemne oddziaływania różnych typów komórek i zakres reaktywności immunologicznej.

W publikacji 3 (Activation of epithelial-mesenchymal transition process during breast cancer progression –the impact of molecular subtype and stromal composition. Acta Biochim Pol. 2021 Aug 25;68(3):385-392. doi: 10.18388/abp.2020_5719) kontynuowany jest wątek badania związku pomiędzy zmianami w immuno-transkryptomie i mikrośrodowiskiem guza a aktywacją programu EMT w zależności od stopnia rozsiania nowotworu (przerzuty do węzłów). W badaniu tym analizowano nie tylko materiał z guza pierwotnego, ale także materiał pochodzący z przerzutu do węzła, co pozwala na monitorowanie progresji i obserwacje zmian fenotypowych. Zgodnie z przewidywaniami, guzy w nowotworach luminalnych niewykazujących przerzutu do węzłów wykazały najniższą aktywację EMT, zaś w guzach z nowotworów potrójnie ujemnych aktywacja EMT była częsta, ale większą korelację z obecnością przerzutu i plastycznością fenotypową wykazały nowotwory luminalne z przerzutem do węzła. Dodatkowo, analiza funkcjonalna wyników transkryptomicznych wykazała, że guzy bez przerzutu do węzła o fenotypie mezenchymalnym mają obniżoną ekspresję genów związanych z odpowiedzią zapalną, zaś guzy w przypadku których stwierdzono przerzut mają większą obecność komponenty stromalnej, co stwierdzono za pomocą analizy immunohistochemicznej. Z tej pracy można wyciągnąć ciekawy, choć w zasadzie spodziewany wniosek, że sposób oddziaływania mikrośrodowiska na komórki nowotworowe zależy od stopnia rozsiewu nowotworu.

Publikacja 4 (Reduced expression of innate immunity-related genes in lymph node metastases of luminal breast cancer patients. Sci Rep. 2021 Mar 3;11(1):5097. doi: 10.1038/s41598-021-84568-0) pogłębia analizę zmian w immuno-transkryptomie podczas progresji, ponieważ tym razem guzy pierwotne analizowane są w zestawieniu ze sparowanymi przerzutami do węzłów chłonnych. Fizjologiczne różnice między porównywanymi tkankami powodują konieczność korekty otrzymanych współczynników z uwzględnieniem różnic tkankowych. Współczynniki ekspresji w tkankach prawidłowych wyliczono na podstawie danych zawartych w GeneCards database i użyto do normalizacji danych eksperymentalnych. Odmienność metod (Nano-String i RNA-seq) spowodowała zawężenie analizy do 360 genów (w poprzednich doświadczeniach 730) z powodu konieczności uwzględnienia genów obecnych w obydwu analizach. Grupa analizowana techniką Nano-String była też dość niewielka (n=11). Można rozważać czy ilość niezbędnych korekt nie obniża wiarygodności wyników i czy nie lepsze byłoby przeprowadzenie dodatkowej analizy materiału prawidłowego tą samą metodą, tym bardziej że przy wykorzystaniu baz danych mogą pojawiać się różnice populacyjne. Należy jednak zauważyć, że taka dodatkowa analiza byłaby logistycznie trudna i kosztowna.

Wyniki analizy zmian w immuno-transkryptomie w ognisku przerzutowym w stosunku do ogniska pierwotnego wskazują na redukcję ekspresji genów związanych z układem dopełniacza, co jest nową obserwacją i dość intrygującą, ponieważ białka te produkowane są na ogół przez hepatocyty. Czy oznacza to, że zmiany w lokalnej ekspresji układu dopełniacza przez komórki guza mogą być istotnym czynnikiem chroniącym te komórki w węzle chłonnym?

Podsumowując, w przedstawionej pracy dokonano gruntownej analizy immunotranskryptomu w raku piersi, wykazując związki specyficznych zmian w profilu ekspresji z obecnością CTC o fenotypie mezenchymalnym i liczbą płytek krwi, zbadano także zmiany zachodzące podczas progresji, konfrontując materiał pochodzący z guza pierwotnego z materiałem z węzłów chłonnych. Uzyskane dane wskazują na potencjalne znaczenie szlaku sygnałowego NF-kappa-B i układu dopełniacza jako punktów istotnych dla przebiegu rozsiewu, wskazują też na różnice w aktywacji EMT i związku z mikrośrodowiskiem. Na pochwałę zasługuje nowoczesne sformułowanie zagadnień badawczych i ambicja przeprowadzenia analizy uwzględniającej wszelkie możliwe aspekty.

Oceniana rozprawa doktorska została napisana w formie tzw. „zszywki” czyli stanowi zbiór czterech oryginalnych, opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych w dwóch z których doktorantka jest pierwszą autorką. Rozprawa ma poprawną strukturę, składa się ze streszczenia, wykazu skrótów i krótkiego opisu złożonego ze wprowadzenia, określenia celów pracy, omówienia publikacji wchodzących w skład rozprawy, podsumowania i dyskusji, zawiera adekwatną bibliografię i załączniki, czyli publikacje stanowiące podstawę pracy, oświadczenia współautorów i materiały uzupełniające. W spisie treści podana jest pozycja „Wykaz osiągnięć” która powinna znajdować się na stronie 124, a której nie ma, przynajmniej w mojej kopii pracy, ale nie jest to brak szczególnie dotkliwy. Być może rozdział „Podsumowanie i dyskusja” mógłby trochę bardziej stanowić syntezę wniosków na tle znanej literatury, a mniej rekapitulację wyników, ale z drugiej strony wyniki są na tyle nowe, że tej literatury jest mało, a autorka przeprowadza ich poprawną dyskusję.

Ilość metod używanych bezpośrednio przez doktorantkę nie jest duża (analiza transkryptomyczna i immunohistochemia), ale należy podkreślić zastosowanie nowoczesnych metod badawczych, czyli określenie zmian w transkryptomie za pomocą technologii nCounter (Nano-String), która umożliwia wiarygodne określenie zmian w profilu ekspresji mRNA w wysoko zdegradowanym materiale FFPE. Zwraca też uwagę biegłość doktorantki w analizie danych i wykorzystanie różnego typu algorytmów w celu maksymalizacji ilości informacji, które można z tych danych uzyskać.

Moja ocena pracy jest wysoka. Autorka ma nowoczesne podejście do zadań badawczych, zarówno na płaszczyźnie merytorycznej jak i metodycznej i postawiła sobie bardzo ambitne cele. Staje się coraz bardziej jasne, że badanie przerzutu nowotworowego musi obejmować szereg aspektów i aktywność układu immunologicznego, plastyczność fenotypowa oraz udział podścieliska są nieodłącznymi elementami tych badań. Uzyskane nowe i wartościowe wyniki pozwoliły na ustalenie punktów potencjalnie kluczowych dla procesu rozsiewu i stanowią punkt wyjścia dla opracowania nowych terapii.

Zarówno zawartość merytoryczna rozprawy jak i sposób przedstawienia wyników świadczą o zdolności doktorantki do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, co w pełni uzasadnia ubieganie się o stopień doktora. Stwierdzam, że przedstawiona praca w pełni spełnia warunki określone w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust.1 z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Marty Popędy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Pracowni Biologii Molekularnej
i Obrazowania Komórek Nowotworowych
Zakładu Onkologii Molekularnej i Translacyjnej
dr hab. n. med. Ewa Grzybowska
prof. Instytutu