

Posudek na dizertační práci Mgr. Julie Vackové

„Checkpoint blockade in cancer immunotherapy“

„Blokování inhibičních receptorů při imunoterapii nádorů“

Velmi hezká dizertace vychází ze čtyř publikací „*Abrogation of IFN- γ signalling may not worsen sensitivity to PD-1/PD-L1 blockade*“ publikované v časopise International Journal of Molecular Sciences, „*CD80 expression on tumor cells alters tumor microenvironment and efficacy of cancer immunotherapy by CTLA-4 blockade*“ publikované v časopise Cancers, „*Experimental combined immunotherapy of tumors with major histocompatibility complex class I downregulation*“ publikované v časopise International Journal of Molecular Sciences a „*Establishment and characterization of a mouse tumor cell line with irreversible downregulation of MHC class I molecules*“ publikovaném v časopise Oncology Reports.

V dizertaci je jasně konstatováno, čím se na které publikaci dizertantka podílela. U prvních dvou je první autorkou což dokazuje její zásadní podíl na získaných výsledcích. Cíle práce jsou jasně definované, je jimi a) cíl posoudit zda deaktivace IFN- γ signalizace v nádorových buňkách s reverzibilní downregulací PD-L1 ligandou a MHC-I může být kontraindikací k PD-1/PD-L1 blokádě a současně zjistit jak působí cytokiny na PD-L1 a/nebo MHC-I expresi v nádorových buňkách, b) charakterizace mikroprostředí nádorů s deaktivovanou CD80 kostimulační molekulou a současně zjistit citlivost takových nádorů na blokádu kontrolních bodů imunitní reakce.

Prokázat kdo z potenciálních onkologických pacientů může být úspěšně léčen pomocí moderní blokády kontrolních bodů imunitní reakce je mimořádně důležitý úkol, a to jak z profesního klinického, ale i z teoretického hlediska. Předložená dizertace se tomu s velkou pilí a nasazením věnuje. Je zřejmé, že určit pacienty, kteří mohou z moderní terapie profitovat je naprosto zásadní přístup při onkologické léčbě a to i z prostého ekonomicko-personálního důvodu. Prostě proto že léčba je nejenom nákladná, a náročná na ošetřující personál ale i proto, že řada pacientů na ni adekvátně neodpovídá a ti kteří odpovídají, jsou v nezanedbatelné míře vystaveni i rizikovým vedlejším efektům. U některých pacientů s primární i získanou rezistencí na léčbu inhibitory blokády kontrolních bodů imunitní reakce byly zjištěny defekty v IFN- γ signalizaci a/nebo expresi MHC-I. Proto má smysl ji použít pouze a jenom tam, kde má naději na úspěch. A také rozhodnout blokace kterého, z řady možných kontrolních bodů imunitní reakce, bude pro vybraného pacienta nejvhodnější.

V dizertaci byly použity jak již dostupné tak nově vytvořené kmeny myší jako vhodné experimentální modely pro testování prediktivních znaků využitelných při léčbě nádorů vyvolaných aplikací nádorových buněčných linií pomocí blokace kontrolních bodů imunitní reakce. Byly použity myší modely nádorů s poškozenou IFN- γ signalizací a/nebo CD80 expresí a s reverzibilním a irreverzibilním snížením exprese MHC-I. Jmenovitě se jednalo o původní myší onkogenní linii TC-1 s konstitutivní expresí ligandy PD-L1 a MHC-I, z které byla vytvořena linie TC-1/A9 s reverzibilním potlačením exprese PD-L1 a MHC-I. Práce využívala klony obou buněčných linií s deaktivací signalizace IFN- γ (TC-1/dlfng1) a TC-1/A9/ dlfng1 nebo molekuly

CD80 (TC-1/dCD80-1). Dále byla provedena DNA vakcinace experimentálních myší, a to plasmidem pBSC/PADRE.E7GGG.

Expresi obou sledovaných molekul (PD-L1 a MHC-I) je možné navodit u nádorových buněk s reverzibilně sníženou expresí interferony 1 typu, ale i některými dalšími působky. Za důležité zjištění je třeba považovat fakt, že i po deaktivaci signalizace IFN- γ TC-1/A9 buňkách je možné využít, v kombinaci s DNA vakcinací, blokádu PD-1/PD-L1. Z použitého myšího modelu lze uzavřít, že snížená citlivost nádorových buněk na IFN- γ , jako jednoho z prediktivních znaků není kontraindikací k blokáde PD-1/PD-L1 větve.

V dalším se autorka a spolupracovníci věnovali anti-CTLA-4 blokáde kontrolních bodů imunitní reakce a tomu, jak CD80 exprese na nádorových buňkách může měnit nádorové mikroprostředí a ovlivňovat citlivost k anti-CTLA-4 blokáde. Určitě je zajímavé pozorování, že TC-1 onkogenní linie s deaktivovanou CD80 je více imunogenní, protože k vytvoření *in vivo* nádoru bylo potřeba dát až desetkrát více buněk. Jinými slovy, deaktivace CD80 vede k snížení možné tvorby nádoru, což je zřejmě mimo jiné způsobeno i množstvím a charakterem lymfoidních a myeloidních buněk které nádor infiltrují. Deaktivace CD80 mění pro-onkogenní povahu makrofágů na anti-onkogenní a zvyšuje se NK-mediovaná kontrola nádorového růstu. Léčbu podporuje CD4+ deplece, zatím co přítomnost CD8+ buněk je pro úspěšnost CTLA-4 blokády zásadní. Důležitým závěrem je fakt, že CD80 deaktivace v nádorových buňkách podporuje infiltraci lymfoidních i myeloidních imunitních buněk do nádoru, inhibuje jeho imunosupresivní mikroprostředí a zvyšuje citlivost nádorů na CTLA-4 blokádu.

Experimentální imunoterapie kombinovaná s DNA vakcinací proti HPV viru zvyšovala frekvenci imunokompetentních buněk v nádorech a to zejména CD8+ T lymfocytů a polarizovala makrofágy směrem k M1 fenotypu. To ukázalo, že v kombinované imunoterapii by pro léčbu nádorů byla vhodná současná aktivace jak vrozené, tak adaptivní imunitní reakce. Platilo to ale pouze u experimentálního modelu s reverzibilním snížením MHC-I exprese, zatím co irreverzibilní snížení exprese MHC-I protinádorovou schopnost CD8+ T buněk narušuje a tudíž redukuje účinnost nádorové terapie.

Vytvořit systém prediktivních bioznaků který by byl použit k tvorbě „nádorových imunogramů“, využitelných pro výběr pacientů nejenom vhodných pro terapii blokádou kontrolních bodů imunitní reakce ale i k výběru nejvhodnější dosud využívané blokády je jistě mimořádně vhodná vědecká aktivita.

Předložená, velmi kvalitně a pečlivě sepsaná práce je jedním z mnoha způsobů, jak takového cíle lze dosáhnout. K autorce mám několik dotazů. 1) Jaké je asi procento onkologických pacientů, u kterých se uvažuje použít při léčbě PD-1/PD-L1 blokádu (v současné době snad častěji používaná) nebo CTLA-4 blokádu imunitní reakce? V současné době se zdá, že je častěji používaná PD-1/PD-L1 blokáde. Z čeho se v současné vychází při rozhodnutí, která terapie bude pro určitého pacienta použita? 2) Pět myší na experimentální skupinu mi nepřijde jako dostatečně vysoký počet pro získání kvalitních výsledků? Jaký je názor autorky? 3) Tim-3 je další ze známějších kontrolních bodů imunitní reakce a tak je pochopitelné, že se na něj také soustředila pozornost. Možnosti léčby pomocí inhibice monoklonálními protilátkami jsou studovány již i u pacientů. Ačkoliv Tim-3 byl exprimován na nádorovém mikroprostředí, jeho

blokace měla jen slabý efekt na nádorový růst a imunitní reakci proti nádoru při kombinované imunoterapii. Proč? 4) Jak si autorka vysvětluje, že deaktivace CD80 zvyšuje imunogenicitu nádoru? Je to dáno jenom zvýšenou infiltrací lymfoidních a myeloidních buněk do nádoru nebo se podílejí i jiné mechanismy? Jaké?

Závěr: Dizertace Mgr. Julie Vackové je velmi kvalitní a splňuje všechny nároky na ní kladené. Nemám pochyb o tom, že kandidátka je talentovanou vědeckou pracovnící se schopností samostatně řešit tvůrčí vědecké otázky. Doporučuji proto práci k obhajobě a k udělení vědeckého titulu Ph.D.