



UNIVERSITY
OF WARSAW

Faculty of Mathematics, Informatics and Mechanics
Institute of Informatics

Warszawa, 14 grudnia 2021

dr hab. Ewa Szczurek

Banacha 2,

02-097 Warszawa, Polska

Phone +48 22 55 44 558

Email szczurek@mimuw.edu.pl

www.mimuw.edu.pl/~szczurek

Recenzja pracy doktorskiej autorstwa mgr Natalii Ochockiej-Lewickiej

Krótkie podsumowanie pracy

W swojej pracy doktorskiej pt. **Deciphering the diversity of glioma-infiltrating myeloid cells with single-cell RNA and protein sequencing** mgr Natalia Ochocka-Lewicka zajmuje się badaniem populacji komórek mieloidalnych w raku mózgu (glioblastoma multiforme).

Celem pracy jest przede wszystkim charakteryzacja różnic pomiędzy głównymi podtypami: mikroglej, monocyty i makrofagi (przy czym makrofagi różnicują z monocytów). Jest to zagadnienie, które oceniam jako spore i ciekawe zagadnienie naukowe i właściwy przedmiot rozprawy doktorskiej.

Główne **metody badawcze** zastosowane w pracy to sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek (scRNA-seq) oraz metoda łącząca scRNA-seq z oznaczeniem panelu białek powierzchniowych (CITE-seq) zastosowane na komórkach pobranych z mysiego modelu glejaka. Widać profesjonalizm w wykonaniu i walidacji zastosowanych metod badawczych.

Rozprawa doktorska opisuje wyniki pracy zbiorowej. Autorka jasno zaznacza wkład współpracowników, którzy przyczynili się do analiz bioinformatycznych. Zakładam, że pozostałe opisane elementy Autorka wykonała sama. Na tej podstawie jej **indywidualny wkład oceniam jako znaczący i wystarczający**, aby być podstawą rozprawy doktorskiej.

Praca stanowi **oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**. Podobne do przeprowadzonych analizy danych scRNA-seq były opublikowane bardzo niedawno (Antunes et al., 2021), ale te badania musiały być prowadzone równolegle w czasie.

Silne strony i zalety pracy

Praca wyróżnia się **szczegółowością i pieczołowitością w analizie wyników** eksperymentów i wynikającymi z tej analizy osiągnięciami. Na duże uznanie zasługują piękne i czytelne ilustracje. **Wyniki** pracy są różnorakie i imponujące. Jako główne osiągnięcia można uznać:

- znalezione markery rozdzielające mikroglej od monocytów/makrofagów, specyficznie ekspresjonowane zarówno na poziomie RNA i białka,
- scharakteryzowane pod-populacje monocytów, makrofagów i komórek przejściowych, a także znalezione różne stany komórek mikrogleju,
- scharakteryzowanie tych podtypów/podstanów pod względem funkcjonalnym,
- a w końcu oznaczenie różnic aktywacji komórek mieloidalnych w mikrośrodkowisku guza pomiędzy płciami.

Część opisująca wyniki jest wyczerpująca, dobrze ułożona, zawiera najpierw wyniki z scRNA-seq, a następnie z CITE-seq, a potem porównanie różnic między płciami. Dzięki scRNA-seq Autorka wyodrębniła klastry komórek wyraźnie odpowiadające podtypom mikrogleju, monocytom i makrofagom, i dzielące ich na podtypy/stany, a następnie określiła markery różnicujące te klastry. CITE-seq pozwolił na doprecyzowanie tych wyników i potwierdzenie, czy znalezione markery są również widoczne na poziomie białek.

Praca ma **charakter badań podstawowych** i choć być może otrzymana charakteryzacja podtypów komórek przyda się kiedyś komuś w badaniach nad immunoterapią glejaków, raczej nie oczekujemy bezpośrednio praktycznych zastosowań tych wyników.

Praca jest dobrze napisana, posiada bogaty wstęp, **dobrze dobrane piśmiennictwo**, widać, że autorka wgłębiła się w literaturę i zna wcześniejsze wyniki badań dotyczące badanych typów komórek. **Układ rozprawy doktorskiej** jest ciekawy: praca jest zorganizowana w podobny sposób jak typowy artykuł naukowy (wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusja i konkluzje), co dobrze porządkuje zawartość.

Tematy do dyskusji

Na poziomie ogólnym nie stwierdzam żadnych nieprawidłowości. Jest jedynie kilka punktów, które zwróciły moją uwagę i które warto przedyskutować.

- Analiza skupień (szukanie klastrow) została opisana pobieżnie. Wiadomo jedynie, że zastosowano funkcję FindClusters w Seurat. Ta funkcja ma parametr resolution, który wpływa na liczbę klastrow. Zastanawiające jest w jaki sposób dokładnie została wybrana liczba klastrow? Ta liczba i w ogóle dokonane klastrowanie wydaje się kluczowa dla całych wyników. Na przykład, wyniki obejmują klaster pośredni (Int - intermediate) pomiędzy monocytami i zróżnicowanymi makrofagami. Być może klastrowanie zawierające mniej klastrow pomijałoby klaster Int. Albo moglibyśmy nie mieć Mφ_1 oraz Mφ_2 tylko jeden klaster Mφ.

Dyskusja dotycząca analizy skupień powinna obejmować odpowiedzi na pytania czy inne liczby klastrów i inne ewentualne parametry były również próbowane? Jak różniły się wyniki od tych użytych do całej dalszej analizy, gdy zastosowano inne parametry? Czy to rozwiązanie było w miarę stabilne czy bardzo zależne od tych parametrów? Pytania te nie są dobrze zaadresowane w pracy. Np. na stronie 38 mamy podane jedynie, że klastrowanie zrobiono z parametrem resolution równym 0.6. Dlaczego akurat tyle? Na stronie 43 w sekcji dotyczącej analizy danych CITE-seq jest wzmianka: „the clustree diagram was used for assessment of multiple clustering resolution and Res=1.1 was determined as an optimal value of the resolution.” W jakim sensie ta wartość 1.1. była optymalna? W dalszej części tego paragrafu widzimy, że niektóre klastry zostały sklejone. Jakie kryteria dokładnie zastosowano, aby je sklejać?

- Na wielokrotnie reprodukowanych, tylko z różnymi kolorowaniami, wizualizacjach UMAP dla danych CITE-seq widzimy, że komórki dzielą się na dwa główne podzbiory. Jeden zawiera monocyty i zróżnicowane makrofagi i klaster Int. Drugi, wyraźnie oddzielony, to mikroglej. Klastry takie jak Mo, Int, M ϕ _1, M ϕ _2 nie są na tej wizualizacji dobrze oddzielone od siebie. Pytanie, czy Autorka badała inne wymiary UMAP. Jest możliwe, że na wizualizacji w trzech wymiarach, bądź dwóch wymiarach UMAP 2 versus UMAP 3 te klastry rozdzieliłyby się wzdłuż osi UMAP 3. Czy taka analiza była robiona i czy widać było rozdzielenie?
- W opisie analizy danych CITE-seq podana jest informacja, że zostały usunięte multiplety. Te multiplety zostały wykryte jako takie „komórki”, które na podstawie HTO były przypisane do dwóch lub więcej próbek przy użyciu funkcji HTODemux. Czy jest możliwe wykrycie takich multipletów, które pochodzą z tych samych próbek? W jaki sposób? Jeśli tak, czy zostały one wykryte i usunięte? Czy takie multiplety stanowią duży problem?
- Ważnym wynikiem analizy są zidentyfikowane markery. Te markery różnicują analizowane typy komórek. Pytanie, na ile znalezione markery są specyficzne dla badanego modelu mysiego? Na ile możemy oczekiwać, że te same markery będą dobrze działać gdybyśmy chcieli ich użyć na komórkach ludzkich i analizie ludzkiego glejaka?
- Analiza gene ontology dla genów, które są aktywowane w Monocytach/makrofagach w porównaniu z mikroglejem podtypu Act-MG wykazała proces o nazwie „response to bacterium”. Jak ten wynik wytłumaczyć? Z czym może być on w mikrośrodkowisku glejaka związany?

Podsumowanie

Oceniam, że rozprawa doktorska prezentuje głęboką ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) oraz załącznika nr. 1 Regulaminu Rady Naukowej z

13.04.2018 r. W związku z ciekawymi wynikami i nowoczesnymi zastosowanymi metodami,
wnioskuję o wyróżnienie ocenianej pracy.



Ewa Szczurek



Agnieszka Bronisz Ph.D.
Head of the Tumor Microenvironment Laboratory
Professor of Mossakowski Medical Research Institute
Polish Academy of Sciences
02-106 Warsaw 5 Pawinskiego Street
abronisz@imdik.pan.pl

RE: Recenzja rozprawy doktorskiej

Warszawa 12/14/2021

Doktorant: mgr. Natalia Ochocka-Lewicka

.....
Tytuł rozprawy doktorskiej: Deciphering the diversity of glioma-infiltrating myeloid cells with single-cell RNA and protein sequencing

.....
Promotor: Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek

.....
Recenzent: dr. hab. n. med. Agnieszka Bronisz

Wartość naukowa rozprawy

Przedłożona do recenzji dysertacja doktorska przygotowana przez doktorantkę - panią mgr. Natalię Ochocką-Lewicką pozytywnie wyróżnia się zaprojektowaniem, przeprowadzeniem i analizą badań. Część pracy przedstawionej w niniejszej rozprawie została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie Nature Communications [1] oraz dyskutowana w dwóch pracach przeglądowych [2, 3]. Charakterystyka komórek układu odpornościowego w mikrośrodku nowotworów, tematyka podjęta przez doktorantkę, to źródło informacji, która tworzy podstawy dzisiejszej immuno-okologii eksperymentalnej.

Doktorantka podjęła się skatalogowania transkryptomu pojedynczych komórek immunologicznych w mysim modelu glejaka wdrażając technologie scRNA-seq i CITE-seq. Odpowiednio dobrane kontrole eksperymentalne oraz analiza danych pozwoliła na zaobserwowanie komórkowych i molekularnych zmian w „ekosystemie” nowotworu mózgu myszy podczas inicjacji i progresji guza. Wyniki te stanowią kolejny ważny dowód, na to, że molekularna i komórkowa kompozycja mikrośrodowiska nowotworu jest istotna dla odpowiedzi terapeutycznej.

Immunoterapia nowotworów to jeden z szybciej rozwijających się trendów w medycynie translacyjnej. Praca Doktorantki wpisuje się w ten trend, inspirując do ponownego spojrzenia na modele testów przedklinicznych.

Wartość merytoryczna rozprawy

Doktorantka wprowadziła w tematykę swojej pracy badawczej odnosząc się do wyselekcjonowanej literatury. Logicznie przeprowadzając czytelnika przez patologie choroby, Doktorantka przedstawiła komórkowy i molekularny obraz mikrośrodowiska glejaka, ze szczególnym uwzględnieniem populacji komórek systemu immunologicznego. Krytyczna charakterystyka przedklinicznego mysiego modelu doświadczalnego dowodzi zrozumienia barier eksperymentalnych przez Doktorantkę. Na uwagę zasługuje uwzględnienie stratyfikacji zwierząt pod względem płci, ważny a rzadko brany pod uwagę czynnik modelownia odpowiedzi terapeutycznej *in vivo*.

Dobór i dostępność technologii wskazują na celowe planowanie projektu przez Doktorantkę, a zasługi tej nie pomniejsza wsparcie od strony Instytutu, Promotora oraz współtwórców projektu. Przeciwnie, wskazuje to na umiejętność współpracy oraz biegłość w zarządzaniu projektem opartym o duże zbiory danych (*ang. Big data*).

Cel pracy Doktorantka przedstawiała mniej jasno. Autorka pisze „*This study aimed to decipher the heterogeneity of myeloid cells in the microenvironment of the experimental murine gliomas, provide functional characteristics of a given cell type and identify surface protein markers for reliable separation of microglia and macrophages in the glioma microenvironment*”. Ma się wrażenie że <Celem jest rozszyfrowanie X w celu rozróżnienia Y od Z> bez implikacji celu nadrzędnego, czyli, dlaczego potrzebujemy nauczyć się odróżnia Y od Z. Problem, który zapoczątkował idee projektu a którego rozwiązaniem zajęła się Doktorantka mógłby być lepiej wyjaśniony w paragrafie 4.

Sposób w jaki Doktorantka przeszła drogę od standaryzacji do uzyskania „proof of concept” zasługuje na wysoką ocenę. Wyniki pracy Doktorantki przy użyciu wysokiej klasy technologii są interesujące i świadczą o wysokim poziomie wiedzy i znajomości metod. Molekularną „sygnaturę” komórek immunologicznych w modelu doświadczalnym doktorantka użyła do preselekcje potencjalnych celów terapeutycznych oraz markerów odpowiedzi immunologicznej w modelu glejaka. Natomiast połączenie wyników modelu eksperymentalnego z danymi klinicznymi pacjentów to ważny krok we wdrożeniu wyników doktorantki do udoskonalenia modelu przedklinicznego.

Omawiana praca doktorska ma przejrzystą kompozycję i styl. Również od strony językowej i formalnej recenzowana dysertacja zasługuje na wysoką ocenę. Jak w każdym tego typu opracowaniu, również i w pracy przedstawionej przez mgr Natalie Ochocka-Lewicka można znaleźć pewne niezręczności językowe. Z mojego doświadczenia wynika jednak, że usterki takie zdarzają się nawet w prestiżowych wydawnictwach po korekcie wydawniczej i autorskiej, stąd nie należy w moim osądzie przywiązywać do nich dużej wagi. Podsumowując, pracę oceniam wysoko pod względem redakcyjnym i lingwistycznym (praca jest napisana w języku angielskim) oraz w zakresie stosowania poprawnych zasad bibliograficznych.

Wnioski i konkluzja końcowa

Wymienione powyżej sugestie i uwagi krytyczne nie zmieniają mojej pozytywnej opinii o zrealizowanym przez Doktorantkę projekcie. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim jest pogłębienie wiedzy o odpowiedzi immunologicznej w modelu glejaka. Doktorantka połączyła wiedzę onkologiczną z technologią sekwencjonowania, a umiejętności te wykorzystwała do wyjaśnienia roli subpopulacji komórek immunologicznych infiltrujących nowotwór. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę są cennym wkładem w modelowanie 3-wymiarowej mapy nowotworów, dzięki której wiemy więcej o genezie i progresji tej choroby nowotworowej.

Do istotnych walorów recenzowanej pracy zaliczam:

- aktualność tematyczną, w tym pionierskie wprowadzenie metody sekwencjonowania na poziomie pojedynczej komórki
- pogłębioną analizę problemu badawczego i naukowego popartą nowoczesnym warsztatem metodologicznym
- rzetelne i skrupulatne przedstawienie metodologii i dokumentacji procesu eksperymentalnego

Reasumując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr. Natalii Ochockiej-Lewickiej pt. "**Deciphering the diversity of glioma-infiltrating myeloid cells with single-cell RNA and protein sequencing**" spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) oraz załącznika nr. 1 Regulaminu Rady Naukowej z 13.04.2018 r."

Uważam, że całość wyводу naukowego, jak i jakość przeprowadzonych przez Doktorantkę badań eksperymentalnych są w skali Polski pionierskie i oryginalne. Zastosowanie wyników może mieć wpływ na naukę i wkład w rozwój nowych technologii obrazowania mikrośrodowiska nowotworów. W mojej opinii przedstawiona **praca jest wyróżniająca**.

Agnieszka Bronisz, Ph.D.

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Pracownia Mikrośrodowiska Nowotworów
KIEROWNIK

dr hab. Agnieszka Bronisz

-
1. Ochocka, N., et al., Single-cell RNA sequencing reveals functional heterogeneity of glioma-associated brain macrophages. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 1151.
 2. Kaminska, B., N. Ochocka, and P. Segit, Single-Cell Omics in Dissecting Immune Microenvironment of Malignant Gliomas- Challenges and Perspectives. Cells, 2021. **10**(9).
 3. Ochocka, N. and B. Kaminska, Microglia Diversity in Healthy and Diseased Brain: Insights from Single-Cell Omics. Int J Mol Sci, 2021. **22**(6).



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

Zakład Immunologii Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny

ul. Nowogrodzka 59
02-006 Warszawa
tel. : (22) 502 14 72, 502 12 60
faks: (22) 502 21 59
NIP: 525-00-05-828
REGON: 000288917

Warszawa, 20 grudnia 2021

dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon
Zakład Immunologii Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Nowogrodzka 59
02-006 Warszawa
Email: radoslaw.zagozdzon@wum.edu.pl

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Tytuł: Deciphering the diversity of glioma-infiltrating myeloid cells with single-cell RNA and protein sequencing

Autor: mgr Natalia Ochocka-Lewicka

Promotor: Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek

Rada Naukowa: Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk

Tematyka Badawcza Rozprawy

Tematyka recenzowanej rozprawy doktorskiej odnosi się do znaczenia mikrośrodowiska guza w patofizjologii glejaków złośliwych, a w szczególności roli komórek tego mikrośrodowiska wywodzących się z linii mieloidalnej. Opisane przez Doktorantkę badania przeprowadzono głównie w oparciu o model ortotopowej implantacji linii nowotworowej glejaka mysiego w układzie syngenicznym. W przedstawianym projekcie użyto nowoczesnych technik laboratoryjnych opartych na sekwencjonowaniu transkryptomu pojedynczych komórek wraz z oceną wybranych białek błonowych za pomocą cytometrii masowej oraz zaawansowanych analiz bioinformatycznych, z dodatkowym wsparciem w postaci analizy danych pochodzących z materiału klinicznego.

Poruszany w rozprawie temat badawczy jest niezmiernie istotny z punktu widzenia onkologii doświadczalnej, jak również może znaleźć przełożenie na praktykę medyczną, gdyż prawidłowe zrozumienie roli poszczególnych składowych komórkowych i molekularnych mikrośrodowiska glejaków złośliwych w procesie nowotworzenia i oporności na terapię może przyczynić się do rozwoju nowych skuteczniejszych testów diagnostycznych lub metod leczniczych. Ponadto, opisane w ocenianej rozprawie doktorskiej wyniki badań nad składem komórkowym i molekularnym zdrowego mikrogleju mogą mieć znaczące implikacje w rozumieniu fizjologii ośrodkowego układu nerwowego. Podnosi to dodatkowo wartość merytoryczną rozprawy.

Prezentowane w rozprawie wyniki badań powstały w oparciu o finansowanie z Narodowego Centrum Nauki oraz Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej. Na uwagę zasługuje fakt, że część z prezentowanych wyników została opublikowana w trzech pracach w czasopiśmie fachowym o międzynarodowym zasięgu, w tym prestiżowym *Nature Communications*, w której to publikacji Doktorantka jest pierwszym autorem. Uwydatnia to wysoką jakość przedstawionego projektu badawczego.

Forma Rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została napisana w języku angielskim, co jest jej atutem, gdyż znacząco zwiększa zasięg przekazu wyników rozprawy wśród społeczności naukowej. Rozprawa liczy łącznie 138 stron. Praca została napisana przejrzysto i z dbałością o estetykę edytorską w standardowym układzie rozpraw doktorskich związanych z dziedziną biotechnologii. Recenzowana praca doktorska zawiera 8 rozdziałów zasadniczych, wliczając streszczenia w języku angielskim i polskim, oraz sekcje pomocnicze: Spis skrótów i symboli, Piśmiennictwo (193 pozycje publikacyjne), Spis tabel, Ryciny uzupełniające i Materiały uzupełniające. Tekst pracy wsparty jest graficznie za pomocą 8 tabel w części głównej i 2 tabel w części uzupełniającej oraz łącznie 30 rycin w części głównej i 9 w części uzupełniającej, zawierających informacje pomocnicze do wstępu teoretycznego, przedstawiających metodykę badawczą lub prezentujących wyniki oryginalne prac doświadczalnych lub też przeprowadzonych przez Doktorantkę analiz.

Zakres merytoryczny rozprawy

Oceniana rozprawa obejmuje swoim zakresem szereg zagadnień związanych z fenotypem i rolą komórek mieloidalnych w mikrośrodku guza w modelu mysiego glejaka złośliwego. Omówienie tych zagadnień podzielone jest pomiędzy poszczególne rozdziały rozprawy:

Introduction. Przedstawiona jest w przystępny sposób klasyfikacja, epidemiologia i charakterystyka molekularna glejaków, ze szczególnym uwzględnieniem ich klasyfikacji na podstawie różnic molekularnych, takich jak obecność mutacji genów dehydrogenaz izocytrynianowych (IDH) oraz pozostałych znanych markerów molekularnych. Następnie Doktorantka odnosi się do zjawiska znacznej immunosupresji stwierdzanej w mikrośrodku glejaków złośliwych i związanej z tym oporności tych guzów na próby nowoczesnej immunoterapii. Jest to bardzo istotna część wstępu, gdyż uzasadnia potrzebę ustalenia mechanizmów odpowiedzialnych za immunosupresyjny charakter mikrośrodowiska glejaków. Doktorantka w swoim dalszym opisie zwraca uwagę na rolę, jaką w procesie immunosupresji mogą pełnić komórki mieloidalne, takie jak komórki mikrogleju lub makrofagi wywodzące się z monocytów krwi obwodowej, z jednoczesnym zaznaczeniem heterogenności, a także odrębnej lokalizacji tkankowej i programów transkrypcyjnych poszczególnych populacji mieloidalnych w glejakach. Ten złożony fragment wstępu wsparty jest ryciną, która w czytelny sposób prezentuje wizualnie omawiane zagadnienia. Przedstawiony jest również problem badawczy związany z dotychczasowymi niedoskonałościami w rozróżnieniu obu form komórek mieloidalnych na poziomie markerów molekularnych. Odniesienie doświadczalne do tego problemu przy użyciu nowoczesnych metod sekwencjonowania pojedynczych komórek jest jednym z ważnych aspektów ocenianej rozprawy doktorskiej. Ciekawym dodatkowym zagadnieniem omawianym we wstępie jest zależność częstości i przebiegu klinicznego glejaków złośliwych od płci. Jest to znane zjawisko pod względem epidemiologicznym, jednak jego podstawy fizjologiczne i/lub molekularne nie zostały dotychczas wyjaśnione. Na zakończenie wstępu Doktorantka przedstawia w skrócie dwie z zastosowanych technik badawczych – model śródczaszkowej implantacji mysiego glejaka GL261 oraz podstawy technologiczne sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek. Zwłaszcza omówienie tego drugiego typu zagadnień jest bardzo korzystne dla czytelnika, gdyż ułatwia zrozumienie szczegółowych technicznych opisów metod sekwencjonowania w rozdziałach dotyczących metodologii i wyników prezentowanej rozprawy. Należy również wspomnieć, że opisując model mysiego glejaka GL261 Doktorantka zaznacza, że istnieją również

inne modele zwierzące przeznaczone do badań nad glejakami, porównując w skrócie cechy charakterystyczne poszczególnych modeli doświadczalnych. Opis cech charakterystycznych modelu implantacji doczaszkowej glejaka GL261 mógłby jednak zostać wzbogacony poprzez odniesienie się do faktu, że model ten w swoim założeniu wiąże się z mechanicznym uszkodzeniem tkanki. Z tego powodu nie można wykluczyć, że część z obserwowanych w tym modelu zmian na poziomie tkankowym, komórkowym i/lub molekularnym związanych jest z procesem gojenia się i ewentualnie bliznowacenia uszkodzonej tkanki. Jest to szczególnie istotne, gdy rozpatrywane są komórki mieloidalne, o których wiadomo, że pełnią znaczącą rolę w procesie naprawy tkanki po uszkodzeniu mechanicznym. Oznacza to, że w przypadku modeli związanych z implantacją mechaniczną zasadne jest niekiedy użycie dodatkowej grupy kontrolnej poddawanej takiemu samemu zabiegowi, jednak bez komponenty komórkowej, czyli na przykład z iniekcją PBS (tzw. „sham procedure/surgery”). W prezentowanej rozprawie doktorskiej zabrakło odniesienia się do tego aspektu.

Aims of the study. Na podstawie wiedzy literaturowej przedstawionej we Wstępie dotyczącej heterogenności populacji komórek mieloidalnych w mikrośrodowisku glejaków złośliwych, Doktorantka podejmuje się w badaniach opisanych w swojej rozprawie oceny tego zjawiska w modelu syngenicznym mysiego glejaka GL261 przy użyciu dwóch nowoczesnych technik sekwencjonowania pojedynczych komórek (scRNA-seq i CITE-seq). Doktorantka prezentuje również sześć szczegółowych celów badawczych układających się konsekwentny i dobrze zaplanowany projekt naukowy.

Materials and Methods. W tej części rozprawy znajduje się klarowny opis zastosowanych technik badawczych. Należy przyznać, że zarówno liczba, jak też różnorodność i nowoczesność używanych metod laboratoryjnych jest znaczna. Część opisu dotyczy standardowej metodologii biotechnologicznej in vitro, takiej jak hodowle komórkowe oraz wyprowadzenie stabilnych transfektantów linii GL261, a także procedur in vivo związanych z implantacją komórek nowotworowych i pomiarami wzrostu guza za pomocą obrazowania optycznego oraz ex vivo - dysocjacji tkanki i technik opartych na barwieniu materiału biologicznego metodą immunohistochemii lub florescencyjną z następczym zastosowaniem i cytometrii przepływowej. Dodatkowo zaprezentowane są opisane są nowoczesne i zaawansowane techniki laboratoryjne, z których warto wymienić metodę scRNA-Seq, CITE-seq wraz z cytometrią masową, a także wysokiej klasy metody bioinformatyczne analizy danych i wizualizacji uzyskanych wyników. Na uwagę zasługuje również wykorzystanie danych pochodzących z pierwotnego materiału klinicznego. Opis metodologii wsparty jest tabelami z wyszczególnieniem przeciwciał i sekwencji nukleotydowych użytych w poszczególnych procedurach, co dodatkowo zwiększa przejrzystość prezentacji metod zastosowanych w projekcie. Drobnym niedociągnięciem jest niepodanie ani w opisie metodologicznym, ani w opisie wyników (Rycina 6.1) liczby n myszy (całkowitej lub z podziałem na płcie), którym implantowano komórki glejaka GL261. Należy przy tym zaznaczyć, że w pozostałych opisach wyników badań, liczby te są prawidłowo podane na odpowiednich rycinach.

Results. Wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowane są w kolejności pozwalającej w pełni docenić progresywny charakter projektu, w którym kolejne doświadczenia logicznie wynikają z osiągnięć badawczych lub metodologicznych uzyskanych na wcześniejszych etapach. Na uwagę zasługuje również fakt, że jeśli zachodzi taka potrzeba, w opisie danego doświadczenia prezentowane są skrócone opisy metodologii i/lub uzyskane wyniki są adekwatnie interpretowane z odniesieniem do istniejącej literatury fachowej. Dzięki temu czytelnik może odpowiednio zrozumieć opis danego doświadczenia i jego wyników, bez ciągłej potrzeby odnoszenia się do rozdziału Materiałów i Metod i/lub Dyskusji. Dowodzi to znacznej dojrzałości edytorskiej Doktorantki. Ze względu na użycie licznych technik badawczych i analitycznych, rozdział Wyniki ten jest rozbudowany i podzielony na następujące obszary tematyczne:

- Prezentacja ortotopowego modelu mysiego glejaka GL261. W przedstawianym opisie opisie ciekawa jest obserwacja istotnej statystycznie zależności wzrostu

guza od płci zwierzęcia, co koreluje z wcześniejszymi obserwacjami klinicznymi. Wynik ten rodzi pytanie, czy swoista część układu odpornościowego pełni rolę w tym zjawisku? W tym kontekście bardzo interesujące byłoby wykorzystanie myszy z upośledzoną swoistą komponentą układu odpornościowego (np. myszy nagich lub SCID, a może nawet NSG), aby odpowiedzieć na to pytanie. Należy przy tym zaznaczyć, że Doktorantka w dalszej części rozdziału Wyniki częściowo tłumaczy zjawisko zależności od płci m.in. różną reaktywnością komórek mieloidalnych na koinkubację z komórkami GL261 in vitro (Rycina 6.20).

- Opis preparatyki tkanek, sortowania komórek, koniugacji przeciwciał z oligonukleotydami i oceny jakościowej uzyskanego materiału, a także odczytów metodą sc-RNAseq lub CITE-seq. Jest to bardzo cenna część rozdziału Wyniki, gdyż odpowiednie przygotowanie i kontrola jakości pozwalają na eliminację znacznej części ewentualnych artefaktów, a tym samym podnoszą wartość naukową uzyskanych w projekcie wyników.
- Opis wyników uzyskanych za pomocą metody scRNA-seq. W tych podrozdziałach Doktorantka opisuje uzyskane dane na temat profili ekspresyjnych poszczególnych typów komórek w badanych preparatach tkankowych. Ważnym osiągnięciem tej części rozprawy jest ustalenie swoistych markerów molekularnych dla naciekających guz komórek mikrogleju (np. Tmem119) oraz komórek monocytarno-makrofagalnych (np. Gal-3). Obserwacja ta ma daleko idące implikacje dla przyszłych badań nad mikrośrodowiskiem glejaków, gdyż pozwoli na precyzyjne odnoszenie się do poszczególnych populacji komórkowych w tych guzach, a więc bardziej precyzyjne planowanie ewentualnych terapii celowanych. Następnie Doktorantka dokonuje analiz opisujących bardziej szczegółowo stany funkcjonalne komórek mieloidalnych w badanych guzach, a zwłaszcza komórek monocytarno-makrofagalnych, co ma bardzo istotne znaczenia dla zrozumienia roli tych komórek w patobiologii glejaków złośliwych.
- Opis weryfikacji uzyskanych wyników za pomocą metody CITE-Seq. Rozdziały te stanowią cenne uzupełnienie badań opartych na samej transkryptomice. Jest to wyraźnie uwydatnione poprzez opis braku korelacji obecności niektórych białek z kodującym te białka mRNA. Dowodzi to, że przeprowadzenie przez Doktorantkę badań z dodatkową oceną białek było niezbędne do prawidłowej interpretacji funkcjonalnej wyników transkryptomicznych i jest to niewątpliwa zaleta ocenianej rozprawy doktorskiej. Badania z użyciem metody CITE-Seq umożliwiają również dalszą precyzję w analizie stanów funkcjonalnych poszczególnych typów komórek mieloidalnych w mikrośrodowisku guza, ale także w zdrowej tkance mysiego mikrogleju.
- Odniesienie do tematyki programów transkrypcyjnych w mikrośrodowisku glejaków, takich jak np. program związany z interferonem. Doktorantka ponownie dowodzi, jak użyta w projekcie zaawansowana metodologia -omiczna może dodatkowo wzbogacić istniejącą wcześniej wiedzę w tej dziedzinie.
- Odniesienie to zagadnienia zależności przebiegu glejaków złośliwych od płci. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wykazuje jeden z potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko, a mianowicie różną między płciami reaktywność komórek mieloidalnych w kontekście ekspresji genów zależnych od interferonu. Jak wspomniano powyżej, byłoby bardzo ciekawe pogłębienie tych badań przy użyciu modeli zwierząt z defektywną częścią swoistą układu odpornościowego. Na uwagę zasługuje fakt wsparcia obserwacji Doktorantki z modelu zwierzęcego poprzez analizę danych pochodzących z materiału klinicznego.

Discussion. W odpowiednich podrozdziałach Dyskusji Doktorantka odnosi się szczegółowo do uzyskanych wyników. Rozdział Dyskusji sam w sobie nie jest zbyt obszerny (tj. nieco ponad 10

stron maszynopisu), zważywszy na bardzo liczne wyniki uzyskane w projekcie, jednak, jak wspomniano powyżej, część interpretacji wyników i odniesienie do pozycji literaturowych zostały zawarte w odpowiednich podrozdziałach dotyczących wyników doświadczeń, co sumarycznie tworzy złożoną i rozbudowaną dyskusję osiągnięć projektowych. Należy wyraźnie podkreślić, że przeprowadzona w rozprawie dyskusja wyników jest adekwatna i merytorycznie zasadna. Większość uzyskanych w ocenianej pracy wyników jest prawidłowo zinterpretowana i odniesiona do obecnego stanu wiedzy w danej dziedzinie. Doktorantka opisuje również potencjalne implikacje kliniczne zaobserwowanej różnorodności komórek mieloidalnych naciekających guzy glejaków złośliwych. Między innymi proponowane jest potencjalne użycie czynników wywołujących mniej lub bardziej swoistą deplecję komórek mieloidalnych jako metod terapeutycznych w glejakach. W pełni zgadzam się z tą interpretacją, chciałbym jednak dodatkowo przedstawić pod dyskusję podejście alternatywne, a może nawet komplementarne do strategii proponowanych przez Doktorantkę. Chodzi mianowicie o opisane niedawno modyfikacje genetyczne komórek makrofagalnych za pomocą chimerowych receptorów antygenowych (tzw. CAR-M) w celu uzyskania swoistego efektu cytotoksycznego w kierunku komórek nowotworowych. Ponieważ Doktorantka w swej pracy dowodzi, że komórki monocytarno-makrofagalne skutecznie infiltrują mikrośrodowisko glejaków złośliwych, ciekawi mnie opinia Doktorantki na temat ewentualnego użycia strategii CAR-M, jako swego rodzaju „koni trojańskich” przeciwko tym nowotworom.

Summary and Conclusions. Przedstawionych jest 6 głównych wniosków końcowych wynikających z opisanych w ocenianej rozprawie badań, w odpowiedni sposób podsumowujących większość wyników opisanych w pracy doktorskiej.

W podsumowaniu oceny merytorycznej przedstawionej rozprawy doktorskiej, chciałbym wyraźnie zaznaczyć, że jestem pod wybitnie pozytywnym wrażeniem zakresu i nowoczesności przeprowadzonych w projekcie badań oraz potencjalnych implikacji diagnostycznych i/lub terapeutycznych, a także w zakresie biologii komórkowej i molekularnej, wynikających z części uzyskanych wyników. Należy podkreślić, że wszystkie przedstawione przeze powyżej uwagi i komentarze merytoryczne, mają w głównej mierze charakter marginalny lub polemiczny i nie wpływają na jednoznacznie wysoką ogólną ocenę merytoryczną przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Drobne uwagi redakcyjne

- W spisie treści i tytule podrozdziału 5.1. użyto określenia „GL261 TD⁺ LUC⁺ GL261”, gdzie podwójne użycie „GL261” wydaje się omyłkowe;
- W liście skrótów nie został rozwinięty skrót DE;
- W liście skrótów dwukrotnie rozwinięto skróty Act-MG, ICB, Hom-MG, IFN, MG oraz TME.

Wymienione powyżej uwagi redakcyjne w żaden sposób nie zmieniają ogólnie korzystnego wrażenia odnośnie formy edytorskiej ocenianej rozprawy.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Reasumując, w swojej rozprawie doktorskiej Pani mgr Natalia Ochocka-Lewicka podjęła bardzo istotny i aktualny temat badawczy we współczesnej onkologii doświadczalnej. Znaczną część wyników uzyskanych za pomocą nowoczesnych technik laboratoryjnych i zaawansowanej analizy danych cechuje nowatorstwo i niewątpliwie stanowią one podstawę do dalszego ukierunkowania badań nad znaczeniem różnych typów komórek mieloidalnych mikrośrodowiska glejaków złośliwych w patobiologii tego nowotworu i/lub opracowania nowych molekularnie celowanych metod terapeutycznych.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Natalii Ochockiej-Lewickiej pod tytułem: „Deciphering the diversity of glioma-infiltrating myeloid cells with single-cell RNA and protein sequencing” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668).

W związku z powyższym składam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie mgr Natalii Ochockiej-Lewickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony. Jednocześnie, ze względu na istotne znaczenie tematu badawczego, bardzo wysoki poziom merytoryczny prezentowanych wyników, a w szczególności znaczną nowoczesność stosowanych technik laboratoryjnych, wnioskuję o wyróżnienie w/w rozprawy doktorskiej.

Warszawa, dnia 20 grudnia 2021 roku.