



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, profesor UŁ
Katedra Biofizyki Ogólnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, UŁ
e-mail: agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Pyziak

pod tytułem „Rozwój metod i modeli badawczych umożliwiających selekcję oraz potwierdzenie specyficzności i mechanizmu działania innowacyjnych związków małowcząsteczkowych celujących w białka kompleksu SWI/SNF”

Przedłożona do oceny praca doktorska zrealizowana została w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy”, będącego w momencie rozpoczęcia rozprawy inicjatywą ówczesnego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Praca została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Agnieszki Łobody, która pełniła funkcję promotora rozprawy, natomiast promotorem pomocniczym w przewodzie była Pani dr Anna Wróbel. Partnerem biznesowym była w tym przypadku firma Ryvu Therapeutics S.A. w Krakowie, która zajmuje się rozwojem nowych terapii przeciwnowotworowych. Otrzymana przeze mnie praca ma charakter monografii liczącej 194 strony maszynopisu. Przez wzgląd na wysoce prawdopodobny potencjał wdrożeniowy i komercyjny uzyskanych wyników część z nich nie została ujawniona.

Praca doktorska Pani Karoliny Pyziak ma klasyczny układ, w skład którego wchodzi wstęp teoretyczny, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, literatura oraz suplement. Nadrzędnym celem pracy było sprawdzenie możliwości wykorzystania wybranych metod do testowania swoistości i zastosowania inhibitorów ATPazy BRM w leczeniu nowotworów (głównie płuc) z mutacjami w obrębie genu *SMARCA4*, kodującego enzym BRG1 będący homologiem BRM. Pod uwagę zostały wzięte równolegle dwa podejścia: celowane, w którym dobrze znany jest molekularny cel farmakologicznej interwencji, oraz fenotypowe, w którym poszukuje się związków umożliwiających uzyskanie pożądaných efektów w określonym typie nowotworu. Główny cel pracy

został jednoznacznie określony i podzielony na cele szczegółowe, które doprecyzowały jeszcze stosunkowo szeroki zakres branych pod uwagę aspektów. W ramach rozprawy doktorantka podjęła się m.in. potwierdzenia zasadności wyboru niedrobnokomórkowego raka płuc jako modelu do badań nad potencjalnym zastosowaniem inhibitorów BRM w leczeniu tego typu nowotworu. Wybór podyktowany był relatywnie wysokim odsetkiem mutacji w obrębie genu *SMARCA4* w grupie pacjentów onkologicznych z nie drobnokomórkowym rakiem płuc oraz zjawisko syntetycznej letalności występujące w momencie zahamowania aktywności BRM w komórkach pozbawionych BRG1. Ponadto, mgr Pyziak podjęła się optymalizacji metody (w układzie bezkomórkowym i komórkowym) umożliwiającej stwierdzenie oddziaływania pomiędzy związkiem referencyjnym a BRM i BRG1, metody określającej stopień wnikania związku do komórek, odpowiedniego doboru i stworzenia linii izogenicznych z podstawowym i wyciszonym poziomem białek BRM i BRG1, wyłonienia markerów wskazujących na swoiste działanie potencjalnych inhibitorów BRM zarówno w układzie komórkowym jak i w warunkach *in vivo*, ale także wyłonienia związków indukujących syntetyczną letalność w komórkach pozbawionych BRG1 w ramach testów przesiewowych z wykorzystaniem biblioteki LOPAC®1280.

Stosunkowo krótki rozdział pt. „Wstęp” w szczegółowy sposób wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące budowy i funkcji poszczególnych komponentów kompleksów SWI/SNF, możliwej syntetycznej letalności przy jednoczesnym braku aktywności obydwu ATPaz czy podejść w odkrywaniu nowych leków o potencjalnym zastosowaniu farmakologicznym. Doktorantka wymieniła bardzo istotne z punktu widzenia terapii właściwości, którymi musi charakteryzować się związek brany pod uwagę jako możliwy lek. Czytając tą część pracy można zauważyć, że Pani Pyziak dysponuje bardzo dużą, i co najważniejsze, uporządkowaną wiedzą z tematyki opisywanej w pracy, o czym świadczy bardzo esencjonalny charakter wstępu oraz wybór i opisanie wyłącznie zagadnień najistotniejszych dla zrozumienia dalszej części pracy. Rozdział „Materiały i metody” jest bardzo obszerny, co przy tak rozbudowanej eksperymentalnie pracy jest nieuniknione. W wyczerpujący sposób zostały opisane procedury eksperymentalne, badane parametry (niejednokrotnie z uzasadnieniem i wzorem lub wykresem) oraz zastosowana analiza statystyczna. Zadziwiający jest wręcz wachlarz zastosowanych metod, wśród których znalazły się analizy bioinformatyczne (cBioPortal, MultiDep firmy Ryvu Therapeutics, analizy danych uzyskanych technikami RNA- i CHIP-Seq), biofizyczne i biochemiczne testy interakcji BRM-ligand (TSA, CETSA), testy żywotności, stabilne wyciszanie genów

techniką CRISP i przejściowe za pomocą siRNA, testy *in vivo* (farmakokinetyczne i farmakodynamiczne). Rozdział „Wyniki” stanowią aż 81 stron pracy i zaliczyć do niego należy również przynajmniej część „Suplementu”. Ilość danych zawartych w pracy jest z punktu widzenia osoby oceniającej wręcz przytłaczająca. Doktorantka w tej części pracy uzasadniła wybór linii niedrobnokomórkowego raka płuca jako nowotworu, w którym według cBioPortal odnotowano najwyższą frekwencję mutacji genu *SMARCA4* powodującą skrócenie łańcucha białka BRG1, co z kolei może przekładać się na brak tego enzymu w komórkach lub jego niefunkcjonalność. Analizy bioinformatyczne wykazały także, że białko BRM ma największy wpływ na proliferację komórek w niefunkcyjnym enzymem BRG1. Wyniki krótko- i długoterminowych testów żywotności przeprowadzone na liniach komórkowych z różnym poziomem obydwu białek, ale przede wszystkim wyniki uzyskane dla linii izogenicznych HT1080 SM4^{KO} i SM2^{KO}, w których wyciszono odpowiednio *SMARCA2* i *SMARCA4*, potwierdziły zasadność testowania inhibitorów BRM w kontekście wywołania syntetycznej letalności w komórkach z niedoborem BRG1. W trakcie testowania warunków metody Thermal Shift wykazano, że wpływ na temperaturę denaturacji BRM mają, oprócz ligandów, również interkalatory DNA i związki powodujące agregację ATPazy. Sukcesem zakończyło się generowanie linii izogenicznych z wyciszoną ekspresją *SMARCA4* (HT1080 SM4^{KO}), *SMARCA2* (HT1080 SM2^{KO}) oraz linii HT1080 SM4^{KO} z przywróconą ekspresją *SMARCA4* (HT1080 SM4^R). Analiza różnicowej ekspresji danych uzyskanych metodą RNA-Seq dla m.in. linii bazowej HT1080 i HT1080 SM4^{KO} oraz A549 pozwoliła wybrać geny (469), których ekspresja ulegała istotnej zmianie po wyciszeniu BRM i wśród których należało poszukiwać markera odpowiedzi na swoistą inhibicję BRM. Ostatecznie w oparciu o dodatkowe eksperymenty w wykorzystaniem techniki real-time PCR potwierdzające kierunek zmian ekspresji wybranych biomarkerów w trzech wymienionych wyżej liniach poddanych przejściowej transfekcji siSMARCA2 wybrano do dalszych analiz 8 genów/biomarkerów oraz gen *KRT80*. Na kolejnych etapach wybór 3 biomarkerów (16, 19 i *KRT80*) podyktowany został wynikiem eksperymentu z inhibitorem referencyjnym firmy Novartis, w którym brano pod uwagę wyłącznie geny, dla których efekt działania inhibitora i wyciszenia *SMARCA2* był podobny. W wyniku analizy danych z eksperymentu ChIP-Seq z branych pod uwagę 20 biomarkerów oraz *KRT80* do dalszego eksperymentu z wykorzystaniem metody AlphaLISA wybrano tylko jeden o numerze 2 przez wzgląd na obecność BRG1 i BRM w obrębie jego genu, spadek jego ekspresji po wyciszeniu *SMARCA2* oraz dostępność komercyjnego testu do oceny poziomu białka biomarkera 2. Dla obydwu

linii z niedoborem BRG1 (A549 i HT1080 SM4^{KO}) zaobserwowano istotny spadek poziomu białka biomarkera 2 po traktowaniu komórek związkiem referencyjnym Novartis. Badania na modelu mysim potwierdziły możliwość oznaczenia poziomu biomarkera 2 w guzach utworzonych z komórek HT1080, HT1080 SM4^{KO} oraz A549. Co więcej, zaobserwowano jego spadek w guzach myszy poddanych działaniu związku referencyjnego Novartis.

W ostatnim etapie badań, mającym na celu przesiewowe porównanie toksyczności związków względem linii HT1080 i HT1080SM4^{KO}, bardzo precyzyjnie określono warunki, jakie muszą zostać spełnione aby związek mógł zostać uznany za wykazujący różny efekt w dwóch badanych liniach (stopień inhibicji w linii pozbawionej BRG1 musiał być większy o minimum trzykrotną wartość odchylenia standardowego względem inhibicji w linii bazowej oraz testowanie przynajmniej trzech stężeń branych pod uwagę związków). Zdefiniowano także wytyczne (minimum 3 stężenia badanych związków) do dalszych testów w układach komórkowych.

Dyskusja jest krótka, trafna, kolejne jej podrozdziały odnoszą się do omówienia uzyskanych wyników w szerszym kontekście. Znalazły się w niej ryciny i schematy, które ułatwiają zrozumienie poruszanych zagadnień i docenienie znaczenia wykonanych badań w odniesieniu do dostępnych już informacji i obecnego stanu wiedzy.

Oceniając pracę Pani Karoliny Pyziak należy przede wszystkim zwrócić uwagę na zakres i poziom przeprowadzonych badań oraz ich logiczny ciąg przyczynowo-skutkowy. Wykonane badania w przedłożonej do oceny pracy mają charakter całościowy: od sprawdzenia zasadności wyboru grupy docelowej, przez walidację testów biochemicznych i komórkowych, po model zwierzęcy, który w tym wypadku potwierdził zasadność wyboru biomarkera 2 jako genu odpowiadającego na funkcjonalny niedobór białka BRM. Trafny jest wybór linii komórkowych do badań i modelu zwierzęcego. Nie mam wątpliwości, że opracowane kryteria wyboru markera swoistej inhibicji BRM ułatwią firmie testowanie nowych związków, które mogą mieć z kolei znaczenie w leczeniu nowotworów charakteryzujących się brakiem białka BRG1. Bardzo dużym plusem pracy jest dokładny opis stosowanych procedur oraz uzyskanych wyników, co pozwala śledzić kolejne etapy wnioskowania i przesłanki, które zadecydowały o przejściu do kolejnej fazy. Wręcz zadziwiający jest krytycyzm Pani Pyziak w stosunku do uzyskiwanych wyników oraz umiejętność przedyskutowania możliwych przyczyn niepowodzeń.

Pomimo mojej bardzo wysokiej oceny pracy chciałabym zwrócić uwagę na kilka szczegółów, których w pracy mi zabrakło. Z punktu widzenia recenzenta rozprawy doktorskiej zaskoczył mnie brak informacji o dorobku naukowym Pani Karoliny Pyziak, wystąpieniach i prezentowaniu wyników przeprowadzonych badań. Mam świadomość ograniczeń wynikających z badań, których efektem końcowym ma być komercjalizacja wyników, lub które prowadzone są we współpracy z przedsiębiorcami. Aczkolwiek nawet informacja o planowanych patentach, wdrożeniach wyników (przypuszczam, że do działalności gospodarczej firmy Ryvu Therapeutics – która część wyników znajdzie lub może znaleźć zastosowanie, czy są być może inne firmy zainteresowane wynikami badań) podkreśliłaby tylko znaczenie przeprowadzonych prac. Co do samej oceny merytorycznej to chciałabym zwrócić tylko uwagę na paragraf 4.2.1. Czy zasadne jest tutaj wielokrotne użycie określenia „optymalizacja” metody? W przypadku optymalizacji metody czytający oczekuje na końcu rozdziału podsumowania wraz z wytycznymi co do konkretnych warunków reakcji czy detekcji (np. western blot czy dot blot, denaturacja w obecności czy bez DNA, interakcja z ligandem ma stabilizować czy destabilizować białka). W obecnej formie brzmi to jak testowanie różnych warunków bez wyciągnięcia finalnej dla tej części pracy konkluzji. Żeby móc ten akapit nazwać optymalizacją metody zabrakło mi jednego zdania na jego końcu. Co do wstępu i/lub dyskusji mam również pytanie dotyczące rodzaju zamian w BRG1, które muszą mieć miejsca, aby obserwować syntetyczną letalność wywołaną inhibicją BRM. Czy muszą to być wyłącznie mutacje powodujące skrócenie łańcucha? Czy np. mutacje wpływające na oddziaływanie BRG1 z DNA, innymi komponentami kompleksu SWI/SNF, modyfikacje potranslacyjne enzymu mogą również być brane pod uwagę jako te, których obecność może przemawiać za stosowaniem inhibitorów BRM w leczeniu pacjentów onkologicznych?

Wniosek końcowy

Jak wspomniałam wyżej, bardzo wysoko oceniam przedłożoną mi do oceny rozprawę doktorską Pani mgr Karoliny Pyziak oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane pracom doktorskim, które zostały określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Doktorantka udowodniła, że potrafi celnie sformułować problem badawczy, zaplanować logiczny cykl eksperymentów mających zweryfikować stawiane hipotezy, krytycznie zinterpretować wyniki i wyciągnąć wyważone wnioski. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego

o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Pyziak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Nie pozostaje mi również nic innego jak zwrócić się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne oraz Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani Karoliny Pyziak stosowną nagrodą.

Z poważaniem



Dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, profesor UŁ