

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”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Pyziak została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Agnieszki Łobody, prof. UJ oraz pod opieką promotora pomocniczego Pani dr Anny Wróbel w Zakładzie Biotechnologii Medycznej, Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Praca doktorska była realizowana w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy” jako element współpracy Uniwersytetu Jagiellońskiego z firmą Ryvu Therapeutics S.A. w Krakowie.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy opracowania autorskiego protokołu badawczego oraz konstrukcji modeli eksperymentalnych pozwalających na ocenę potencjalnych właściwości terapeutycznych selektywnych inhibitorów białek BRM należących do kompleksu SWI/SNF oraz wyłonienie związków aktywnych w komórkach bez białka BRG1. W szczególności doktorantka skoncentrowała swoje badania na weryfikacji danych bioinformatycznych otrzymanych za pomocą dedykowanych narzędzi opracowanych m.in., przez Ryve Therapeutics oraz ogólnodostępnych baz danych takich jak cBioportal oraz DepMap mających za zadanie potwierdzenie wybranego celu i wskazania terapeutycznego.

Doktorantka wykorzystując komercyjnie dostępny panel nowotworowych linii komórkowych oraz odpowiednich izogenicznych par linii komórkowych podjęła próbę opracowania oryginalnego protokołu postępowania wykorzystującego testy przesiewowe oraz ortogonalne mającego zastosowanie w badaniach nad rozwojem nowych leków dla pacjentów z nowotworami posiadającymi niefunkcjonalne białko BRG1.

Postawiony cel naukowy spełnia tym samym wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska realizowana w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy”, ponieważ jego realizacja istotnie poszerza dotychczasową wiedzę dotyczącą stosowania właściwych procedur umożliwiających

selekcję i charakterystykę związków małowcząsteczkowych specyficznych wobec określonego celu molekularnego.

Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Pyziak została opracowana w sposób typowy dla prezentacji wyników doświadczalnych w postaci monografii; obejmuje 195 str. i zawiera następujące rozdziały: wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, wstęp teoretyczny, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski końcowe, spis literatury oraz suplement.

Wstęp teoretyczny został opracowany bardzo syntetycznie. Zawarto w nim wszystkie niezbędne informacje dla wprowadzenia czytelnika w zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej. W oparciu o adekwatną do tematyki literaturę doktorantka dokonała opisu aktualnego stanu wiedzy dotyczącego m.in., budowy i funkcji kompleksów SWI/SNF, regulacji ekspresji genów przez SWI/SNF, obecności mutacji w poszczególnych podjednostkach SWI/SNF w różnych typach nowotworów, znaczenia mutacji w genie *SMARCA4*, a także opisała kwestie związane z opracowaniem celowanej koncepcji strategicznej projektu nakierowanego na rozwój nowej cząsteczki terapeutycznej, jak również fenotypowego podejścia do rozwoju nowych leków. Rozdział ten jest wzbogacony licznymi bardzo dobrze opracowanymi rycinami. Recenzent nie ma uwag do tej części pracy.

Opis wykorzystanych linii komórkowych, układów eksperymentalnych *in vitro* i *in vivo*, zastosowanych analiz bioinformatycznych oraz technik i procedur laboratoryjnych został dokonany z należytą starannością i pozwala na dokładne prześledzenie wszystkich etapów przeprowadzonych eksperymentów. Opis metod wzbogacono w schematy lub tabele, które doskonale uzupełniają informacje tekstowe. Opis metod zawiera także krótkie wprowadzenie dotyczące zasady lub etapów wykonywanego oznaczenia. Dobór metod i procedur eksperymentalnych jest adekwatny w odniesieniu do zdefiniowanych przez doktorantkę celów pracy. Recenzent nie ma wątpliwości, że jakość merytoryczna oraz ilość użytych metod, zastosowanych technik oraz narzędzi eksperymentalnych świadczy o bardzo dobrym warsztacie doktorantki.

Rozdział zawierający prezentację oraz opis wyników stanowi cenne źródło wiedzy naukowej. Prezentacja wyników została usystematyzowana w sposób tworzący logiczny ciąg zmierzający do udzielenia odpowiedzi na zdefiniowane w pracy doktorskiej cele. Wyniki zostały przedstawione na bardzo dobrze opracowanych 52 rycinach oraz dodatkowo w trzech tabelach.



Należy podkreślić, że weryfikacja hipotezy badawczej została przeprowadzona z najwyższą starannością. Do swoich eksperymentów doktorantka wykorzystwała nie tylko różne dostępne komercyjnie linie komórkowe (23 linie), ale także technikę ksenoprzeszczepu komórek izogenicznych linii HT1080, HT1080 SM4^{KO} do myszy szczepu NOD/SCI oraz, BALB/ c nude oraz szczepy myszy NUDE oraz SCID/beige, którym podano podskórną linie komórkowe A549, NCI-H2030 lub NCI-H1944.

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w rozdziale wyniki należy uznać: A) określenie celu molekularnego dla badanych inhibitorów w domenie ATPazowo-helikazowej białka BRM, B) wskazanie możliwości efektywnego zastosowania terapeutycznego badanego związku w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca bez funkcjonalnego białka BRG1, C) zoptymalizowanie protokołów testów przesiewowych i ortogonalnych dla określenia efektywności i selektywności działania inhibitorów, w tym na komórki z mutacjami *SMARCA4*. W trakcie realizacji doktoratu otrzymano także dane dotyczące genów biomarkerowych, natomiast informacji tych nie ujawniono w doktoracie, ze względu na planowane komercyjne wykorzystanie tych danych w przyszłości.

Przedstawione w pracy wnioski, zakres i jakość zaprezentowanych wyników wskazuje, że doktorantka przedstawiła oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i tym samym spełniła ustawowy warunek stawiany pracom doktorskim.

Po przeczytaniu i analizie tego rozdziału recenzentowi nasunęło się jednak kilka pytań.

W rozdziałach materiały i metody oraz wyniki doktorantka często opisując wyniki otrzymane testami CTG oraz AlamarBlue wskazuje, że przy ich użyciu określa „żywność komórek”. Testy te oparte są na pomiarze aktywności metabolicznej, a zatem nie mogą być rozpatrywane jako testy bezpośrednio oceniające żywotności czy cytotoksyczności. Może się bowiem okazać, że część testowanych związków lub określonych ich stężeń będzie indukowało wyłącznie efekt cytostatyczny, inne z kolei stężenie może powodować efekt cytotoksyczny, a jeszcze inne np. obniżać/podwyższać metabolizm komórki bez zmian w liczbie komórek. Oczywiście zatrzymanie proliferacji lub zmiany w metabolizmie np. produkcji ATP nie świadczą o obniżeniu „żywności” komórek. Co ciekawe, doktoranta pisze o zasadzie działania tych metod wskazując, że ma świadomość, iż są to testy mierzące aktywność metaboliczną komórek. Dlatego w przyszłości wskazane jest zachowanie większej ostrożności w opisywaniu wyników otrzymanych tymi metodami.

Kolejnym ważnym aspektem i uwagą odnoszącą się do wszystkich zastosowanych w pracy doktorskiej testów jest problem utrzymania takiej samej biodostępności badanych związków dla różnych typów komórek nowotworowych oraz podczas różnych wykonywanych oznaczeń. Jest to kluczowe zagadnienie dla możliwości porównywania otrzymywanych wyników między testami oraz między liniami komórkowymi. Biodostępność dla komórek jakiegokolwiek związku chemicznego będzie uzależniona nie tylko od stężenia tego związku, ale również od ilości komórek, które będą poddawane testom. Oczywistym jest, że przykładowo 750 komórek pokrywających dołek płytki hodowlanej będzie inaczej reagowało na to samo użyte stężenie niż 4000 lub 15000 komórek pokrywających taką samą powierzchnię. W przypadku komórek wysianych w liczbie 750 komórek na dołek można spodziewać się, że znacznie więcej komórek zareaguje i będzie to reakcja silniejsza. Co ciekawe, doktorantka przy okazji omawiania procedury optymalizacji wysokoprzepustowego fenotypowego testu przesiewowego na rycinie 4.50 prezentuje optymalizację liczby komórek na dołek, czas inkubacji ze związkami oraz tzw. „parametr jakości” wskazując jednoznacznie, że liczba komórek ma znaczenie dla odpowiedzi komórkowej na badany związek.

Chciałbym także nadmienić, że doktorantka wykonała testy określające efektywność wnikania związku w odniesieniu do komórek wysianych w ilości 100 000 komórek na pojedynczy dołek płytki 24 dołkowej, po czym za pomocą LC/MS kolejno określiła liczbę moli związku w medium oraz stężenie związku w komórce. Natomiast analizując metodykę recenzent dostrzegł, że w różnych testach lub czasem tych samych zależnie od rodzaju użytej linii komórkowej stosowano różną liczbę komórek. Czy doktorantka nie ma obaw, iż obserwowane różnice w IC50 np. prezentowane na rycinie 4.32 są wynikiem różnicy w liczbie wysianych komórek w dołku? Czy doktorantka na wybranych przykładach mogłaby spróbować porównać liczby komórek względem powierzchni naczynia między wybranymi testami i spróbować odnieść je do wyników otrzymanych podczas testu efektywności wnikania? Recenzent zwraca na to uwagę, ponieważ przy tak zdefiniowanych celach pracy doktorskiej jest to ważny element optymalizowanych procedur i protokołów postępowania podczas testowania nowych związków. Odpowiednia walidacja liczby komórek w poszczególnych testach jest niezbędna dla powtarzalności, zapewnienia komplementarności i porównywalności wyników między poszczególnymi testami.

Czy podczas długoterminowej hodowli komórek 7, 10 lub 14 dniowej wymieniano pożywkę hodowlaną? Jeżeli tak, to jak często? Czy podczas 72 h hodowli komórek w płytkach

96-dółkowych nie obserwowano w warunkach kontrolnych efektu przegęszczenia komórek? W przypadku pomiarów aktywności metabolicznej komórek dostępność świeżego medium ma znaczenie. Chciałbym w tym miejscu zapytać także doktorantkę o rolę SWI/SNF w kontroli metabolizmu komórek. Czy zdaniem doktorantki wyciszenie ekspresji genu lub KO genowy *SMARCA2* lub *SMARCA4* ma znaczenie np. dla glikolizy? Czy doktorantka analizowała przed przystąpieniem do eksperymentów wybrane linie komórkowe względem występowania w nich tzw. efektu Warburga? W jaki sposób testowane związki lub wyciszenie genu *SMARCA2* lub *SMARCA4* będzie wpływać na komórki, które wykorzystują zjawisko glikolizy tlenowej do pozyskiwania ATP i intermediatów do syntez? Przykładowo czy opisany problem ma znaczenie dla wyników zaprezentowanych na przykład na rycinie 4-8B lub 4-30 lub 4-50?

Istotnym aspektem testowania nowych związków jest ich immunotoksyczność. Czy doktorantka mogłaby krótko podać informację, co wiadomo na ten temat w odniesieniu do inhibitorów BRM?

Niezależnie od powyższych pytań zaprezentowane wyniki oceniam bardzo wysoko, w szczególności wyniki zaprezentowane w rozdziałach dot. identyfikacji biomarkerów odpowiedzi komórkowej na zahamowanie białka BRM oraz prezentujących wyniki otrzymane za pomocą metody Thermal Shift/CETSA.

Podobnie zawarta w dysertacji dyskusja została opracowana w sposób wyczerpujący, wskazując na dużą znajomość problematyki inhibitorów BRM, a także zagadnień związanych z zastosowaniem i optymalizacją testów przesiewowych i ortogonalnych. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo wnikliwa krytyczna analiza własnych wyników w oparciu o adekwatną literaturę i obecny stan wiedzy. Podsumowanie i wnioski końcowe są adekwatne do treści otrzymanych wyników. Informacje zamieszczone w suplemencie zdaniem recenzenta mogłyby wejść w skład pozostałych rozdziałów ocenianej dysertacji.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji chciałbym stwierdzić, iż mimo moich uwag, bardzo wysoko oceniam przedstawioną pracę doktorską Pani mgr Karoliny Pyziak oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim, ponieważ udowodniła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu

Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Pyziak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową wyników oraz ich wartość aplikacyjną wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 15/11/2021

Dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR

