



prof. dr hab. Marta Miączyńska

Laboratorium Biologii Komórki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
w Warszawie

Warszawa, 01.12.2021 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani mgr Karoliny Pyziak

**p.t.: „Rozwój metod i modeli badawczych umożliwiających selekcję oraz
potwierdzenie specyficzności i mechanizmu działania innowacyjnych
związków małowcząsteczkowych celujących w białka kompleksu SWI/SNF”**

wykonanej we współpracy pomiędzy Wydziałem Biochemii, Biofizyki i
Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z firmą Ryvu Therapeutics S.A.
w Krakowie w ramach ścieżki edukacyjnej Doktorat wdrożeniowy
pod kierunkiem pani dr hab. Agnieszki Łobody prof. UJ jako promotora
oraz pani dr Anny Wróbel jako promotora pomocniczego

Rozprawa doktorska pani Karoliny Pyziak poświęcona jest opracowaniu metodyki poszukiwania i charakteryzowania związków małowcząsteczkowych celujących w białka BRG1 i BRM będące składnikami kompleksów remodelujących chromatynę SWI/SNF. Celem poszukiwania takich związków jest ich przyszłe zastosowanie jako leków w spersonalizowanej terapii nowotworów. Z tych względów praca badawcza pani Pyziak była wykonywana jako doktorat wdrożeniowy w firmie Ryvu Therapeutics S.A., która podjęła wysiłki, aby takie związki opracowywać i rozwijać. Rozprawa bardzo dobrze ilustruje cały proces badawczy inicjujący odkrywanie nowych leków, dokumentując ogrom prac koncepcyjnych, doświadczalnych, optymalizacyjnych i analitycznych niezbędnych na tej drodze. Znaczenie aplikacyjne tematyki podjętej w rozprawie jest bardzo duże. Obecna wiedza na temat podłoża powstawania nowotworów jednoznacznie wskazuje na ich olbrzymią heterogenność, co wymusza opracowywanie terapii spersonalizowanych, o wysokiej specyficzności i skuteczności dla określonych typów nowotworów ze zdefiniowanymi zmianami genetycznymi i epigenetycznymi. Z tego względu tematyka rozprawy jest ważna i niezwykle aktualna, a pozyskana wiedza i „know-how” mogą stanowić podwaliny do dalszych działań firmy Ryvu Therapeutics S.A. w kierunku rozwoju przyszłych leków. Działania te uzasadniają nieujawnianie w rozprawie pewnych informacji (w tym nazw genów markerowych, składu pewnych buforów, itp.) o potencjale komercjalizacyjnym.

MIĘDZYNARODOWY INSTYTUT BIOLOGII MOLEKULARNEJ I KOMÓRKOWEJ W WARSZAWIE

ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa
secretariat@iimcb.gov.pl

tel.: (48 22) 597 07 00, fax: (48 22) 597 07 15
www.iimcb.gov.pl

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 195 stron maszynopisu jest napisana w języku polskim i ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się wykazem stosowanych skrótów i streszczeniami w języku polskim i angielskim. Wstęp teoretyczny (16 stron) zawiera 4 główne podrozdziały. Po jednostronicowym przedstawieniu celu pracy następuje opis materiałów i metod (45 stron). Wyniki (64 strony) są podzielone na 3 główne podrozdziały. Dyskusja liczy 16 stron, po której następuje jednostronicowe podsumowanie i wnioski końcowe. Spis literatury zawiera 184 pozycji. Rozprawa kończy się suplementem (19 stron) z uzupełniającymi materiałami i metodami, wynikami i dyskusją oraz spisem literatury.

Ocena merytoryczna

Wstęp teoretyczny składa się z czterech podrozdziałów przedstawiających kolejno: budowę i funkcje kompleksu SWI/SNF, jego rolę w komórkach nowotworowych, perspektywy potencjalnej terapii dla nowotworów z mutacją w genie *SMARCA4* kodującym podjednostkę BRG1 kompleksu SWI/SNF oraz etapy wczesnego procesu odkrywania nowych leków. Wstęp jest ilustrowany jedenastoma rycinami.

Dobór treści we Wstępie jest właściwy i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy. Doktorantka w sposób jasny i precyzyjny podsumowuje wiedzę o kompleksach SWI/SNF, ich budowie i działaniu w rearanżacji chromatyny i regulacji ekspresji genów. W szczególności skupia się na głównym przedmiocie swoich badań: genach *SMARCA4* i *SMARCA2* i ich produktach, odpowiednio białkach BRG1 i BRM, oraz ich mutacjach w nowotworach. Przedstawia koncepcję syntetycznej letalności jako podstawy do opracowania terapii dla nowotworów niosących mutacje w genie *SMARCA4* poprzez hamowanie białka BRM. Wstęp kończy opis celowanych i fenotypowych podejść doświadczalnych w pierwszych etapach opracowywania nowych leków. Wstęp opiera się na bogatej literaturze (odniesienia do ponad stu pozycji). Ta część rozprawy dokumentuje szeroką wiedzę teoretyczną Doktorantki i potwierdza Jej biegłość w korzystaniu z tej wiedzy.

Cel pracy został poprawnie sformułowany, a jego realizację zaplanowano poprzez osiągnięcie trzech celów szczegółowych.

W dziewiętnastu podrozdziałach **Materiałów i metod** Doktorantka przedstawiła niezwykle szeroki warsztat doświadczalny, począwszy od analiz bioinformatycznych, poprzez hodowle i modyfikacje linii komórkowych, testy żywotności komórek, qPCR i sekwencjonowanie RNA, metody biochemii białek (western blot, dot blot, analizy oddziaływań białek z ligandami i DNA), kończąc na doświadczeniach z użyciem ksenoprzeszczepów *in vivo* oraz na wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych. Zakres zastosowanych metod jest imponujący i doskonale ilustruje złożoność procesu przygotowania do poszukiwania związków chemicznych o pożądanej aktywności. Choć nie wszystkie procedury były wykonywane własnoręcznie przez Doktorantkę (np. nastrzykiwania myszy), a część doświadczeń była wykonywana we współpracy z różnymi działami firmy Ryvu Therapeutics S.A., nie umniejsza to wartości przedstawionych wyników, a podkreśla powszechny obecnie – także w środowisku akademickim – zespołowy charakter wykonywania niektórych skomplikowanych technik eksperymentalnych, co zapewnia dużo wyższą wydajność pracy. Na podkreślenie zasługuje wyczerpujący opis wszystkich stosowanych metod badawczych, który obejmuje nie tylko stricte proceduralne szczegóły

techniczne, ale także przedstawienie zasady działania metody oraz sposobu analizy pozyskiwanych za jej pomocą danych. W tej części rozprawy znajduje się 16 rycin, 14 tabel i 13 równań, ilustrujących omawiane treści. Tak staranny i skrupulatny opis całości metodyki zasługuje na pochwałę. Z obowiązku recenzenta zwrócić jedynie uwagę na kilka przypadków użycia niepoprawnego żargonu w postaci „wyciszenia genu” (str. 41, dalej w Wynikach str. 79, 83, 84), „ilości moli związków” (str. 62), „ilości płytek” (str. 72) czy „ilości komórek” (str. 74), choć w większości przypadków Doktorantka posługuje się poprawną terminologią (wyciszenie ekspresji genów, liczba moli, płytek czy komórek).

Wyniki, przedstawione na 52 rycinach, zostały zebrane w formie trzech głównych podrozdziałów. Pierwszy z nich dokumentuje opracowanie koncepcji strategicznej projektu poprzez podejście celowane. Obejmuje ono analizy bioinformatyczne występowania mutacji w genach *SMARCA4* i *SMARCA2* w nowotworach oraz współzależności pomiędzy produktami tych genów dla żywotności różnych linii komórek nowotworowych.

W tej części niejasny był dla mnie opis danych na Ryc. 4-2. Jaka jest różnica pomiędzy komórkami NSCLC (gruczolakorak) i NSCLC? Co oznaczają liczby n dla poszczególnych typów linii? Nie jest to chyba liczba linii, skoro w legendzie zawarto informację, że analizy przeprowadzono dla 131 linii.

Najobszerniejszą częścią wyników jest podrozdział dotyczący metodyki umożliwiającej selekcję i charakterystykę związków małowcząsteczkowych celujących w białko BRM. Obejmuje on różne podejścia eksperymentalne, wiele doświadczeń optymalizujących procedury oraz konstrukcję modeli badawczych. Pierwszym etapem było badanie stabilności białka BRM *in vitro* i w komórkach, bez i w obecności referencyjnego liganda (inhibitora wyprodukowanego przez firmę Novartis). Kolejnym – wyprowadzenie i scharakteryzowanie panelu izogenicznych nowotworowych linii komórkowych z wyciszoną ekspresją genów *SMARCA4* i *SMARCA2* oraz linii z przywróconą ekspresją genu *SMARCA4*. Na podstawie uzyskanych danych Doktorantka zawężyła panel linii do dalszych badań, w których poszukiwała biomarkerów odpowiedzi komórkowej na zahamowanie białka BRM poprzez analizy sekwencjonowania RNA. Dalszym krokiem było określenie lokalizacji białek BRM i BRG1 w obrębie całego genomu za pomocą metody ChIPseq. Tę część kończą badania *in vivo* z użyciem ksenoprzeszczepów w myszach do testowania poziomów biomarkerów farmakodynamicznych pod wpływem inhibitorów BRM.

Mam następujące pytania dotyczące przedstawionych w tym podrozdziale wyników:

- Ryc. 4-10-4.14: jeśli ta informacja nie stanowi tajemnicy firmy, czy do stabilizacji białka BRM potrzebne jest DNA o określonej sekwencji czy dowolne DNA z jakiegokolwiek organizmu jedynie jako niespecyficzny nośnik-stabilizator?

- spośród genów biomarkerowych, których ekspresja ulega zmianie pod wpływem inhibitora białka BRM jedyny ujawniony z nazwy to *KRT80*. W rozprawie zabrakło mi choćby wzmianki co gen ten koduje i czy na podstawie danych literaturowych można przewidzieć możliwy mechanizm i znaczenie takiej korelacji (zwłaszcza, że w Dyskusji Doktorantka wymienia inne doniesienie literaturowe dokumentujące podobną zależność).

- jaki może być mechanizm zwiększonej inwazyjności linii HCT1080 SM4^{KO} po wszczepieniu do myszy (Ryc. 4-42)?

Trzeci i ostatni, najkrótszy podrozdział Wyników dotyczy optymalizacji i walidacji wysokoprzepustowego testu fenotypowego do badań przesiewowych w celu poszukiwań związków hamujących wzrost linii HCT1080 SM4^{KO}. Przyznaję, iż podrozdział ten był dla mnie nieco urwany i pozostawiony bez komentarza co do planowanej kontynuacji bądź podstaw do zarzucenia opracowanego testu (również w Dyskusji te doświadczenia omówiono jedynie bardzo skrótowo).

Dyskusja to bardzo rzetelne, obszerne i rzeczowe omówienie całości uzyskanych wyników. Ta część rozprawy jest ilustrowana sześcioma rycinami i dwoma tabelami, co ułatwia zrozumienie przedstawianych treści. Doktorantka poprawnie i z biegłością interpretuje swoje rezultaty w kontekście danych literaturowych. Co istotne, omawia także ograniczenia stosowanych metod, co świadczy o bardzo dobrym zrozumieniu skomplikowanych procedur. Dyskusja niewątpliwie świadczy o wiedzy i wysokich kompetencjach Doktorantki jako badacza. Również **Podsumowanie i wnioski końcowe** zostały poprawnie sformułowane, potwierdzając realizację założonych celów.

Rozprawę kończy **Suplement** z opisem uzupełniających metod i wyników. Nie mam zastrzeżeń do przedstawionych treści, choć kryteria ich zamieszczenia w suplemencie nie były dla mnie jasne.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest napisana niezwykle starannie, praktycznie bez błędów literowych, z bardzo nielicznymi niedociągnięciami redakcyjnymi (np. podwójna numeracja rozdziałów 4.2.5.1 oraz 4.2.5.2; podwójnie zamieszczone równanie 3-7). Wydaje się, że legendy rycin różnią się stopniem szczegółowości – niektóre są wręcz zbyt szczegółowe (z wyjaśnieniami standardowych skrótów typu h), a inne zbyt skrótowe i czytelnik musi spędzić dłuższą chwilę, aby zrozumieć treść ryciny. Z wyjątkiem kilkunastu przypadków niepoprawnego żargonu (oprócz wspomnianych powyżej, to np. „wyciszenie białka”, „zahamowanie genu”, „żywność prób”, „ilość genów”), rozprawa jest napisana poprawnym językiem naukowym. Generalnie wysoko oceniam stronę edytorską rozprawy.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska pani mgr Karoliny Pyziak w bardzo rzetelny i wyczerpujący sposób dokumentuje całokształt początkowych etapów procesu odkrywania nowych spersonalizowanych leków przeciwnowotworowych. Zaprezentowane badania zostały zaplanowane i wykonane w sposób profesjonalny, a ich wyniki poprawnie zinterpretowane i opisane.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Karoliny Pyziak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie z uwagi na wysoką jakość i znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Monika Kiszyńska