



Prof. dr hab. Anna Żaczek
Zakład Onkologii Translacyjnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Gdańsk 05.07.2023

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

dr n. med. Alexandra Cortez pt. „*Molecular mechanisms of tumor cell resistance to the FGFR kinase inhibitor*” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Joanny Polańskiej z Katedry Inżynierii i Analizy Eksploracyjnej Danych, Wydziału Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Politechniki Śląskiej i prof. dr hab. n. med. Katarzyny Lisowskiej z Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowy Instytut Badawczy; Oddział w Gliwicach.

Projekt doktorski był częściowo realizowany w ramach projektu zatytułowanego „Opracowanie nowoczesnych biomarkerów oraz rozwój innowacyjnego inhibitora kinaz FGFR stosowanego w terapii nowotworów”, o akronimie CELONKO, sfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBR), w ramach programu STRATEGMED II.

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy poszukiwania potencjalnych biomarkerów związanych z opornością komórek nowotworowych na nowy małowcząsteczkowy inhibitor FGFR opracowany przez polską firmę farmaceutyczną Celon Pharma S.A. W związku z tym, że zaburzona sygnalizacja FGFR stanowi jeden z ważnych mechanizmów regulujących proliferację w komórkach nowotworowych, zastosowanie inhibitorów FGFR jako strategii przeciwnowotworowej jest bardzo intensywnie rozwijane i obiecujące. Jednak poważnym wyzwaniem staje się rozwój oporności na inhibitory drobnocząsteczkowe. Stąd identyfikacja potencjalnych biomarkerów związanych z opornością komórek nowotworowych na te związki, jak również lepsze zrozumienie biologicznych podstaw tego zjawiska, może prowadzić do poprawy jakości procesu diagnostyczno-terapeutycznego związanego z inhibitorami FGFR. Zaplanowane i przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej analizy są więc aktualne i istotne z poznawczego punktu widzenia. Posiadają także potencjał aplikacyjny w kontekście nowego inhibitora FGFR (CPL304110), jak również całej rodziny drobnocząsteczkowych inhibitorów FGFR.

Oceniając stronę formalną pracy, rozprawę stanowi przygotowane w języku angielskim opracowanie liczące 140 stron. Praca obejmuje: spis treści, wykaz skrótów, streszczenie po angielsku i po polsku, wstęp, a następnie rozdziały opisujące kolejno receptory FGF, charakterystykę nowotworów płuca, żołądka i pęcherza moczowego, inhibitory kinaz tyrozynowych, opis biomarkerów i sposobu ich odkrywania, koncepcje różnorodności, opis projektu CELONKO, projekt eksperymentów, opis transkryptomiki, sposób prowadzenia (pipeline) analiz, ocenę biologicznego znaczenia wytypowanych genów, wnioski, bibliografię i listę osiągnięć naukowych Doktoranta. Do pracy dołączono materiały dodatkowe na płycie CD. Układ pracy jest dość nietypowy jak na dysertację doktorską, trudno zorientować się gdzie są wyniki własnej pracy Doktoranta, a gdzie opisy metod i stanu wiedzy w temacie. Według mnie np. opis metod analizy transkryptomicznej, bądź sposobów analizy ścieżek sygnalizacyjnych powinien znaleźć się w części teoretycznej (wstępie) pracy. Dyskusji jako takiej nie znalazłam, tylko omówienie tabeli przedstawiających znaczenie biologiczne wyłonionych w poszczególnych analizach biomarkerów. Natomiast na docenienie zasługują dobrze opracowane ryciny i starannie przygotowane schematy, jak również imponująca lista ponad 400 pozycji literaturowych.

Przechodząc do oceny merytorycznej, pracę zaczyna krótki dwustronicowy Wstęp, w którym został również zdefiniowany cel pracy. Po nim następują kolejne rozdziały, dotyczące przedmiotu analiz, które tradycyjnie byłyby również zawarte we wstępie, tu natomiast stanowią osobne rozdziały. Niezależnie od umiejscowienia w pracy, kolejne rozdziały omawiające receptory FGF, nowotwory płuca, żołądka i pęcherza moczowego, inhibitory kinaz tyrozynowych czy biomarkery dobrze wprowadzają w tematykę pracy. Szczególnie chciałabym docenić dobrze przygotowaną część dotyczącą opisu biomarkerów, ich pożądanych parametrów, walidacji i sposobu ich odkrywania, zwłaszcza w kontekście projektowania badań klinicznych. Według mnie ta część pracy pokazuje dojrzałość naukową Doktoranta i jego szeroką wiedzę dotyczącą biomarkerów. Odnośnie tej części pracy mam kilka pytań:

- Jak EMT może przyczyniać się do rozwoju oporności na FGFR-TKIs?
- Jak opisywana charakterystyka idealnego markera (str. 27) odnosi się do opracowywanych w pracy biomarkerów? Poproszę o dyskusję pożądanych właściwości markera oporności na terapię w kontekście przytoczonej charakterystyki.

Przechodząc do oceny samego badania (Experimental design), przedmiotem pracy była identyfikacja biomarkerów związanych z opornością w opornych na badany inhibitor FGFR (CPL304110) liniach komórkowych 3 nowotworów: raka płuca, żołądka i pęcherza moczowego. Wykorzystano 6 linii komórkowych (L1: NCI-H1581, L2: NCI-H1703, S1: SNU-16, S2: KATO III, B1: RT-112, and B2: UM-UC-14), z każdej po dwa warianty (wariant dziki i jednocześnie wrażliwy (S: L1S, L2S, S1S, S2S, B1S, B2S) na inhibitor FGFR i wariant oporny (R: L1R, L2R, S1R, S2R, B1R, B2R), w dwóch powtórzeniach biologicznych na każdy wariant, łącznie 24 próbki eksperymentalne. Próbkę poddano sekwencjonowaniu RNA (RNA-seq), a następnie analizie uzyskanych danych w celu zidentyfikowania *in silico* kandydatów na predykcyjny biomarker związany z potencjalnym mechanizmem oporności na inhibitory FGFR. Analizy *in silico* zostały

wykonane przez Doktoranta i stanowią główną część pracy doktorskiej. Jak Autor sam zauważa liczba analizowanych próbek była ograniczona. Dlatego też w swoich badaniach skupił się na opracowaniu nowej metody selekcji potencjalnych kandydatów na biomarkery, specjalnie dostosowanej do danych sekwencjonowania RNA uzyskanych z eksperymentów o małej próbie. W ramach pracy został opracowany schemat obliczeniowy nazwany „Pipeline for Rapid Evaluation, and Discovery of Important biomarker CandidaTes” (PREDICT), który obejmuje dwie miary, tj. minimalną krotność zmiany (ang. *minimal fold change*, minFC) i minimalną różnicę (ang. *minimal Difference*, minDiff). Zastosowanie schematu PREDICT powinno zapewnić na selekcję potencjalnych kandydatów o spójnym kierunku zmiany, jak również o pożądanym cechach czułości i swoistości. Podczas lektury tej części pracy mam następujące pytania:

- Poproszę o rozwinięcie uzasadnienia przyjętej wartości progowej minimalnej krotności zmiany i minimalnej różnicy.
- Jak zostało zweryfikowane, że zastosowane wartości progowe pozwolą na wyselekcjonowanie wyników znaczących biologicznie? Jak i gdzie w tym procesie zastosowano dane z Human Protein Atlas i GeneCards? Skąd pewność, że wybrane wartości pozwolą wykryć ekspresję wytypowanych markerów standardowymi metodami biologii molekularnej? Czy taka próba doświadczalna została wykonana? Jak w tym kontekście uwzględniono aspekt mikrośrodowiska guza nowotworowego? Czy przyjęte założenia też się sprawdzą do analizy danych z „bulk sequencing” guzów nowotworowych (np. przy wykorzystaniu ogólnodostępnych baz danych)?
- Czy gdyby linie komórkowe były hodowane w modelu 3D wytypowane na biomarkery geny byłyby takie same?

W kolejnej części pracy zidentyfikowane DEGs poddano analizie dotyczącej oceny kontekstu biologicznego. Kontekst ten został oceniony przez przeprowadzenie analizy ścieżek sygnałowych, stosując dwie metody: analizę nadreprezentacji (ang. *over-representation analysis*, ORA) oraz analizę wzbogacenia zbiorów genów (ang. *gene set enrichment analysis*, GSEA). W skrócie, otrzymane wyniki wskazują, że komórki odporne na działanie inhibitora FGFR wykształciły kompensacyjną aktywację szlaków regulujących proliferację komórek, tempo migracji, przeżycie, inwazyjność i hamowanie apoptozy. Zidentyfikowano kilka biomarkerów wspólnych dla raka żołądka i pęcherza moczowego (SSRP1, CCNB2, CDT1 i CENPO), natomiast według mnie trudno je nazywać uniwersalnymi, występowały w 2 z 3 nowotworów. Według mnie ta część pracy została wykonana w sposób dość pobieżny. Dokonano szeroko zakrojonego przeglądu literatury, analizując znaczenie biologiczne potencjalnych biomarkerów (ponad 120), odnosząc się do każdego z nich osobno. Natomiast w moim odczuciu brakuje syntezy, z przedstawionych danych trudno wywnioskować, czy odnotowany kontekst biologiczny dotyczył warunków *in vitro*, *in vivo*, w jakim konkretnie modelu i czy pojawiał się również w kontekście klinicznym (w próbkach klinicznych od chorych na nowotwory). Odnośnie tego aspektu pracy mam również pytania:

- Jak Doktorant widziałby zastosowanie wytypowanych biomarkerów w kontekście klinicznym? Miałyby one przewidywać rozwinięcie się oporności, czyli być analizowane

podczas terapii, do jej monitorowania? Czy raczej po progresji, dla wyjaśnienia czemu terapia nie zadziałała? Na jakie zastosowanie pozwalają uzyskane dane?

- Uważa się, że dobry biomarker powinien spełniać 3 podstawowe kryteria: ważność analityczna (*analytical validity*), ważność kliniczna (*clinical validity*) i użyteczność kliniczna (*clinical utility*). Jak Autor ocenia stopień rozwoju proponowanych markerów w kontekście tych kryteriów? Jakie badania należałoby wykonać, by w pełni zwalidować proponowane markery? Jakie kolejne kroki należałoby podjąć, by proponowane markery mogły znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej?

Z obowiązku recenzenta, muszę zauważyć, że niestety w pracę wkradły się drobne błędy merytoryczne, np. „FGFR belongs to the large family of tyrosine kinase inhibitors” (str. 20), co nie jest prawdą (FGFR to receptory, nie inhibitory) czy np. tytuł Tabeli 6. Według mnie tabela przedstawia markery predykcyjne a nie prognostyczne.

Podsumowując, uważam, że postawiony cel pracy został zrealizowany. Zastosowana metodyka była standardowa, dobrana w sposób pozwalający na realizację wyznaczonych zadań. Uzyskane wyniki poszerzyły wiedzę na temat zmian ekspresji genów w liniach komórkowych raka płuca, żołądka i pęcherza moczowego w modelu oporności na inhibitory drobnocząsteczkowe FGFR, a zaproponowany schemat analizy PREDICT pozwolił na wytypowanie potencjalnych kandydatów na biomarkery o pożądanej charakterystyce.

Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a tym samym spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574, z późn. zm)”. Dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Inżynieria Biomedyczna Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pana dr Alexandra Cortez do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Zakład Onkologii Translacyjnej
Gdański Uniwersytet Medyczny
prof. dr hab. Anna Żaczek



Kierownik