

Doktorant: mgr Karolina Pyziak

Promotor rozprawy: Dr hab. Agnieszka Łoboda

Promotor pomocniczy: Dr Anna Wróbel

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

Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę ekspresji genów są kompleksy remodelujące chromatynę, takie jak SWI/SNF (ang. *SWitch/Sucrose Non-Fermentable chromatin remodeling complex*). Mogą one zmieniać lokalizację nici DNA względem nukleosomu powodując rozluźnienie lub skondensowanie chromatyny, co wpływa zarówno na aktywację, jak i represję ekspresji genów. Badania genomu nowotworowych linii komórkowych oraz próbek pobranych od pacjentów onkologicznych wskazały na wysoki odsetek alteracji w podjednostkach SWI/SNF, które obejmowały mutacje genu *SMARCA4* (ang. *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 4*) kodującego kluczowe dla funkcji kompleksu białko katalityczne - BRG1 (ang. *Brahma-related gene 1*). Według wstępnych przesłanek brak wspomnianej proteiny w komórkach nowotworowych uzależniał je od obecności innych regulatorów, takich jak homologiczne białko katalityczne – BRM (ang. *Brahma*), kodowane przez gen *SMARCA2*. Zaobserwowane zjawisko, nazwane syntetyczną letalnością, jest obecnie ogólnie wykorzystywanym mechanizmem do stworzenia nowych terapii przeciwnowotworowych, co jest głównym celem działań prowadzonych przez firmę Ryvu Therapeutics. W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej podjęto się opracowania metodyki, która zostanie wykorzystana w procesie rozwoju nowych leków efektywnych u pacjentów z nowotworami charakteryzującymi się niefunkcyjnym białkiem BRG1.

Wykorzystując dane bioinformatyczne umieszczone na portalach DepMap i cBioPortal potwierdzono wrażliwość komórek z mutacjami genu *SMARCA4* na wyciszenie genu *SMARCA2* oraz wskazano na komórki niedrobnokomórkowego raka płuca BRM+BRG1-, jako typ nowotworu o najwyższej wrażliwości. Według doniesień literaturowych, terapia selektywnymi inhibitorami BRM nie powinna wywołać toksyczności ogólnoustrojowej, jednak w przypadku podania związków o specyficzności dualnej wobec białek BRM i BRG1 brano pod uwagę wystąpienie znaczących efektów ubocznych. Rozwój małowcząsteczkowych inhibitorów białka BRM wiązał się z wysokim ryzykiem, gdyż sekwencje aminokwasowe BRM i BRG1 są w 90% identyczne. Firma Ryvu Therapeutics zdecydowała się jednak podjąć

to ryzyko i stworzyć kaskadę testów przesiewowych do selekcji i charakterystyki nowych związków małowcząsteczkowych, których część została zoptymalizowana w ramach niniejszej rozprawy. W pracy doktorskiej skupiono się w głównej mierze na optymalizacji testów komórkowych, lecz w metodyce znalazły się także testy biofizyczne i badania *in vivo*. Metody sprawdzające wpływ związków na stabilność temperaturową białek BRM/BRG1 (zmodyfikowana metoda Thermal Shift, CETSA z wykorzystaniem lizatu komórkowego, CETSA z wykorzystaniem żywych komórek wraz z testem wnikania związku do komórek) stworzyły unikalny zbiór metod, które mogą potwierdzić oddziaływanie związku z białkiem docelowym nie tylko w układzie wykorzystującym białko rekombinowane, ale także w lizacie komórkowym, a nawet w żywych komórkach. W ramach rozprawy doktorskiej stworzono także unikalny panel czterech komórkowych linii izogenicznych do badania aktywności i selektywności związków. Ponadto, wyselekcjonowano 19 ogólnodostępnych linii komórkowych reprezentujących w głównej mierze docelowe wskazanie terapeutyczne i zoptymalizowano z ich wykorzystaniem długoterminowy test żywotności. Kluczowym w procesie rozwoju nowych leków etapem jest określenie biomarkerów odpowiedzi komórek na terapię. W tym celu wykorzystano metody RNAseq i ChIPseq. W wyniku analiz wybrano dwa biomarkery bezpośrednie, których pomiar wykonywany był na poziomie genu (*KRT80*, qPCR) lub białka (Biomarker 2 – nazwa poufna, AlphaLISA). Dalsze badania *in vivo* pokazały, że *KRT80* i Biomarker 2 mogą pełnić także funkcję biomarkerów farmakodynamicznych w modelu ksenoprzeszczepu linii komórkowej A549 w myszach szczepu Athymic nude. Wszystkie zoptymalizowane w ramach rozprawy testy zostały włączone w kaskadę testów stworzoną przez firmę Ryvu Therapeutics, co pokazuje ich wysoki potencjał wdrożeniowy.

Ze względu na wysoką trudność uzyskania selektywnych inhibitorów białka BRM zdecydowano się na równoległą optymalizację wysokoprzepustowego fenotypowego testu przesiewowego, w którym wykorzystano stworzoną w ramach rozprawy parę linii izogenicznych z i bez mutacji typu utrata funkcji w genie *SMARCA4*. Dzięki tej strategii zamierzano wyłonić związki aktywne w komórkach bez białka BRG1 o nowym mechanizmie działania. Zoptymalizowana metoda w formacie HTS jest obecnie dostępna do testu większych bibliotek związków małowcząsteczkowych.

Podsumowując, badania wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej doprowadziły do zoptymalizowania metod umożliwiających testowanie małowcząsteczkowych związków w formacie wysokoprzepustowym, co otwiera nowe możliwości dla rozwoju terapii skierowanej do pacjentów z nowotworami z niefunkcjonalnym białkiem BRG1.