

Warsaw, September 8th, 2019

Prof. Włodzimierz Maśliński

Department of Pathophysiology and Immunology

National Institute of Geriatrics, Rheumatology and Rehabilitation

Spartanska 1

02-637 Warsaw

Review

of the PhD Dissertation in Medical Biology of Ms Anna Rusek, M.Sc. entitled:
„Analysis of mechanisms of drug resistance to trastuzumab in HER2 overexpressing breast
cancer based on gene and microRNA expression changes in selected cell lines”

Breast cancer is the most commonly occurring cancer in women which, despite recent progresses in therapy, is still second leading cause of these patients death. Based on molecular classification, five subtypes of breast cancer have been identified, among them approximately 20% overexpress human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Activation of this receptor by several ligands or even by its overexpression leads to its homo- or heterodimerization that results in cell proliferation, resistance to apoptosis, angiogenesis, invasion and thus to cancer progression. Breast cancer cells characterized by overexpression of HER2 grow faster and are more aggressive in comparison to HER2 negative tumors. Recognizing these cancer promoting and amplifying effects of HER2 it has been proposed that blocking this receptor may present an important target for breast cancer therapy. Based on these suggestion a humanized monoclonal antibody recognizing extracellular epitope in IV domain of HER2 receptor, named trastuzumab has been constructed and tested in preclinical and clinical settings. Trastuzumab treatment of HER2 positive patients, either alone, or in combination with chemotherapy results in positive clinical response. Results of these clinical trials eventually lead to its approval by FDA in 1998 and by EMA in 2000 for the treatment of HER2 receptor positive patients. Unfortunately, substantial number of trastuzumab treated

patients developed cancer cells resistance to this drug. Subsequent intensive study identified several genes alterations as potential mechanisms that could be involved in development of resistance of cancer cells to this therapy. However, treatment trials to reverse these mechanisms were not very successful.

Based on these negative results, Anna Rusek hypothesized that development of cancer cells resistance to trastuzumab is a result of complex, multistep processes, and that studying it requires more global approach. Testing this hypothesis is the subject of present dissertation.

The dissertation starts with Prologue shortly describing discovery of trastuzumab and complex way for approval for the treatment of HER2 enriched breast cancer.

In the next chapter, Introduction, the Author described epidemiology of breast cancer patients, molecular classification of breast cancers, structure of HER2 receptor and its complex signaling pathways, structure and molecular mechanisms of trastuzumab activities and presented current possibilities for the treatment of HER2 receptor positive breast cancer. The introduction is finished by short description of importance of microRNA in regulating cell development, proliferation, metabolism and apoptosis in physiological and pathological conditions including tumors.

This part of dissertation is well written and provides excellent introduction for formulation of five objectives that are carefully designed to allow her to test her hypothesis.

In the next chapter she provided research framework, with selection of 2 cell lines that expressed HER2 receptors and were able to develop resistance for trastuzumab in vitro, time frame of collecting genetic material, obtaining genetic material, selection of periods of trastuzumab resistance development, measuring transcriptomic changes, and selection of proper statistical analysis and computational and bioinformatics methods. Given complexity of planned experiments this chapter provides simplified overlook on the project.

In the next chapter Materials and Methods the Author provided more extended information regarding chosen cell lines with BT474 isolated from primary and SKBR3 from metastatic tissue, cell culture conditions, drug resistance development with selection two concentration of trastuzumab, RNA extraction and rigorous control of its quality, gene expression microarrays experiments, microRNA microarrays experiments, statistical analysis that contained several gene expression microarrays data analysis, microRNA expression microarrays analysis and bioinformatics analysis of statistically processed microarray data.

Application of all of these, often very complicated methods were necessary but also sufficient to achieve postulated objectives.

In the next part of the dissertation, Results, the Author presented obtained results of her experiments. The most important findings include observation that:

1. From over 34 000 genes, 8 874 and 13 892 genes were differentially expressed during process of trastuzumab resistance development in BT474 and SKBR3 respectively. Importantly 5675 of them were present in both cell lines.
2. Several differentially expressed genes in the study were already known as involved in trastuzumab resistance development. This data indicates that applied methodology has power to validate previous findings and that newly found are likely to represent real change in gene expression during resistance development process.
3. Similarly, protein-protein interaction identified in both cell lines molecular interaction networks of proteins that were already known to participate in development of trastuzumab resistance.
4. Gene Ontology enrichment analysis identified many molecular functions altered during development of trastuzumab resistance. Among them receptor binding, protein kinase activities, RNA processing, GTPase related activities, ATP/ATPase associated mechanisms, transferase activities, RNA processing, DNA replication and organization and p53 binding.
5. Gene Ontology enrichment analysis identified several biologic processes were altered during drug resistance development. Among them cell cycle regulatory mechanisms, mitochondrial functioning, apoptosis, microRNA activity, stress response, viral infection, microtubules organization and DNA damage repair.
6. The KEGG pathway enrichment analysis several molecular networks were affected during drug resistance development. From them 8 pathways were common for both cell lines and include: cell cycle pathway, p53 signaling pathway, Fanconi anemia pathway, cellular senescence, DNA replication, EBV infection, and two cancer related pathways.

7. In the processes of resistance development participate both, HER2 dependent and independent mechanisms.
8. More than 99% of tested microRNA were significantly changed during drug resistance development. Not surprisingly, therefore that many of them were already reported in the literature.

These results confirm the Author hypothesis that development of cancer cells resistance to trastuzumab is a result of complex, multistep processes and that her approach to study these mechanisms were justified. However, despite its value, it is worth noting that chosen model of using established cell lines in *in vitro* conditions of resistance to the drug has its limitations. First, the cell lines developed trastuzumab resistance during their culture in *in vitro* conditions. This process may in some aspects differ if the tumor cells were taken from patients who were treated with this drug and then developed drug resistance *in vivo*. In addition, cancer cell lines cultured in *in vitro* conditions are not exposed to the wide variety of factors, including cells of the immune system that are present *in vivo*. Therefore it may be expected that in *in vivo* situation, the number of affected genes influencing molecular functions and biological processes could be even higher than reported by the Author.

In the next part of dissertation, Discussion, the Author presented her findings in comparison to published literature. This part is written professionally and very clear. It shows that her results either discovered new genes/mechanisms involved in the process of trastuzumab resistance development or strongly support already discovered mechanisms. It documents that she is very mature scientist with great knowledge of the subject.

The next part of the dissertation, Conclusions, consists of 17 points presenting her most important results.

In References the Author cited 234 positions of comprehensive and up to date literature related to the subject.

In my opinion Ms Anna Rusek's doctoral dissertation is very good and provides many new information that extend our knowledge of the complexity of mechanisms of development of trastuzumab resistance, that can be used as a starting platform for further research.

In summary, I have a great pleasure to make a statement that Ms Anna Rusek's PhD dissertation meets requirements for doctoral dissertations according to current Polish regulations. Accordingly, I present to the Dean of Medical Faculty and Honorable Faculty

Council of the Medical University of Białystok recommendations for Ms. Anna Rusek, M.Sc.
to proceed to the next stages of her Ph.D. evaluation process.

Yours sincerely,

Warsaw, 08.09.2019

KIEROWNIK
ZAKŁADU PATOFIZJOLOGII I IMMUNOLOGII
Narodowy Instytut Geriatrii,
Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie



prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński

Prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński

Warszawa, 8.09.2019

Prof. Włodzimierz Maśliński
Zakład Patofizjologii i Immunologii
Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji
Spartańska 1
02-637 Warszawa

Ocena

Rozprawy Doktorskiej magister Anny Rusek zatytułowanej:
„Analiza mechanizmów rozwoju oporności na trastuzumab w HER2 pozytywnym
nowotworze piersi na podstawie zmian ekspresji genów oraz mikroRNA na przykładzie
wybranych linii komórkowych”

Nowotwory piersi stanowią najczęściej występujące nowotwory u kobiet, które pomimo dużych postępów w leczeniu, są ciągle wiodącą przyczyną ich śmierci. Biorąc pod uwagę molekularną klasyfikację tych nowotworów, wyróżnia się 5 typów, spośród których około 20% stanowią takie, których komórki wykazują nadekspresję receptorów dla ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, HER2). Aktywacja tego receptora przez szereg ligandów, a nawet przez jego nad-ekspresję prowadzi do jego homo- lub heterdimeryzacji, co powoduje proliferację komórek, oporność na apoptozę, angiogenezę, inwazję i związaną z nimi progresję nowotworu. Komórki nowotworu piersi charakteryzujące się nad-ekspresją HER2 rosną szybciej, i są bardziej agresywne w porównaniu do HER negatywnych nowotworów. Biorąc pod uwagę pro-nowotworowe efekty aktywacji HER2 na indukcję i amplifikację rozwoju nowotworu, zasugerowano, że blokowanie tego receptora może stanowić ważny cel w terapii nowotworu piersi. Zgodnie z tą sugestią skonstruowano i przetestowano w badaniach przedklinicznych i klinicznych monoklonalne przeciwciała rozpoznające epitop zlokalizowany w IV domenie zewnątrzkomórkowego fragmentu receptora HER2, które nazwano trastuzumab. Leczenie pacjentów, których nowotwór wykazywał nad-ekspresję receptora dla HER2 trastuzumabem, w monoterapii lub w kombinacji z chemioterapią, prowadziło do pozytywnych wyników klinicznych. Wyniki tych badań doprowadziły do rejestracji

trastuzumabu przez FDA w 1998 i przez EMA w 2000 do leczenia pacjentów z nad-ekspresją receptora dla HER2. Niestety, znaczna liczba pacjentów leczonych trastuzumabem rozwija oporność na trastuzumab. Kolejne intensywne badania zidentyfikowały szereg genów, których zmiana mogła uczestniczyć w mechanizmach prowadzących do rozwoju oporności na trastuzumab. Jednakże, próby kliniczne, w których próbowano zatrzymać lub odwrócić te mechanizmy, nie były obiecujące.

Na podstawie tych ostatnich negatywnych wyników badań, Anna Rusek postawiła hipotezę, że rozwój oporności na trastuzumab wynika ze złożonych, wieloetapowych procesów, i że poznanie tych procesów wymaga znacznie szerszego zakresu badań. Weryfikacja tej hipotezy stanowi przedmiot obecnej dysertacji.

Dysertacja rozpoczyna się Prologiem opisującym odkrycie trastuzumabu oraz złożoną drogę do jego rejestracji oraz do leczenia pacjentów z nadekspresją HER2.

W następnej części, Wstępie, Autorka opisała epidemiologię nowotworów piersi, ich molekularną klasyfikację, strukturę HER2, złożone ścieżki sygnałowe związane z jego aktywacją, strukturę i molekularne mechanizmy aktywności trastuzumabu, oraz obecne możliwości leczenia pacjentów wykazujących HER2. Ostatnia część wstępu stanowi krótkie przedstawienie obecnej wiedzy na temat ważnej roli pełnionej przez mikroRNA w regulacji rozwoju komórek, ich proliferacji, metabolizmu i apoptozy w fizjologicznych i patologicznych (włącznie z nowotworami) warunkach. Ta część rozprawy jest bardzo dobrze napisana stanowi znakomite wprowadzenie do określenia 5 celów pracy, które były dobrze zaplanowane w kierunku umożliwienia weryfikacji postawionej hipotezy.

W następnej części Autorka przedstawiła strukturę realizacji projektu, w której przedstawiła wybór dwóch linii komórkowych nowotworów z nad-ekspresją receptorów HER2, i które wykazywały się zdolnością do rozwoju oporności na trastuzumab, schemat czasowy zbierania materiału genetycznego i jego otrzymywania, badania zmian transkryptomicznych oraz wybór metod analizy statystycznej, obliczeniowych i bioinformatycznych.

Zastosowanie tych, często bardzo skomplikowanych metod było konieczne, ale równocześnie wystarczające dla osiągnięcia zamierzonych celów.

W kolejnej części dysertacji, Wynikach, Autorka przedstawiła otrzymane wyniki jej doświadczeń. Spośród bardzo wielu osiągnięć, za najważniejsze uważam obserwacje, że:

1. Spośród ponad 34 000 analizowanych genów, ekspresja 8 874 genów w linii BT474 pochodzącej z pierwotnego nowotworu oraz 13 892 genów w linii SKBR3

pochodzącej z przerzutu nowotworu wykazywały istotne zmiany w procesie rozwoju oporności na trastuzumab. Co ważne, zmiana ekspresji 5675 z tych genów była obecna w obu liniach komórkowych.

2. Szereg genów o zmienionej ekspresji były już opisane jako geny, które uczestniczą w procesie nabywania oporności na trastuzumab. Wyniki te wskazują, że zastosowana metodologia prowadzi do potwierdzenia poznanych uprzednio genów oraz, że zmiany ekspresji nowo odkrytych genów rzeczywiście wskazują na nowe mechanizmy uczestniczące w tym procesie.

3. Podobnie, analiza oddziaływań białko-białko zidentyfikowała w obu liniach komórkowych molekularne interakcje białek, które były uprzednio opisane jako uczestniczące w procesach nabywania oporności na trastuzumab.

4. Analiza bazy danych Gene Ontology umożliwiła identyfikację szeregu funkcji molekularnych zmienionych w trakcie nabywania oporności na trastuzumab. Spośród nich wskazano na wiązanie receptora, aktywności kinazy białkowej, aktywności związane z GTPazą, mechanizmów związanych z ATP lub ATPazą, aktywności transferazy, powstawania i dojrzewania RNA, replikacji i organizacji DNA oraz wiązania białka p53.

5. Podobnie, analiza bazy danych Gene Ontology w zakresie procesów biologicznych, wskazała na zmiany mechanizmami regulacyjnymi cyklu komórkowego, funkcjonowaniem mitochondriów, apoptozą, aktywnością mikroRNA, reakcją na stres, infekcją wirusową, organizacją mikrotubul oraz naprawą uszkodzeń, DNA.

6. Analiza ścieżek molekularnych w oparciu o bazę KEGG wskazała na występowanie szeregu szlaków sygnałowych istotnych dla rozwoju oporności na trastuzumab, spośród których 8 wspólnych dla obu linii komórkowych zawierały: szlak cyklu komórkowego, szlak sygnałowy białka p53, szlak anemii Fanconiego związany z naprawą DNA, starzenie komórkowe, replikacja DNA, infekcja EBV oraz dwa szlaki sygnałowe związane z nowotworem.

7. W procesie rozwoju oporności uczestniczą mechanizmy zależne jak i niezależne od receptora HER2.

8. Ponad 99% znanych ludzkich mikroRNA wykazuje istotne zmiany ekspresji wskazujące na ich udział w budowaniu oporności na trastuzumab. W tym przypadku, nie dziwi fakt, że szereg z tych mikroRNA było znanych z literatury.

Wyniki te potwierdzają hipotezę Autorki, że rozwój oporności komórek nowotworowych na trastuzumab wynika ze złożonych, wieloetapowych procesów zachodzących w czasie, oraz świadczy o tym, że wybór globalnych analiz doprowadziła do identyfikacji wielu genów, funkcji molekularnych oraz procesów biologicznych zaangażowanych w ten proces.

Jednakże, pomimo dużej wartości poznawczej tej pracy, warto wspomnieć o pewnych ograniczeniach tych badań związanych z indukcją oporności w warunkach *in vitro*. Ten proces może się różnić od sytuacji w warunkach *in vivo*, gdzie rozwój oporności na trastuzumab odbywa się w obecności wielu czynników, w tym komórek układu odpornościowego. W związku z tym, można się spodziewać, że w warunkach *in vivo*, liczba genów wykazujących zmiany ekspresji i wpływających na funkcje molekularne oraz procesy biologiczne może być nawet wyższa lub nieco odmienna niż wykazana przez Doktorantkę.

W następnej części dysertacji Autorka omówiła otrzymane wyniki w kontekście danych literaturowych. Ta część jest napisana profesjonalnie i bardzo jasno. Autorka przekonująco wykazuje odkryte geny i mechanizmy włączone w nabywanie oporności na trastuzumab jak i potwierdzenie występowania mechanizmów już poznanych. Przeprowadzona dyskusja wskazuje, że Autorka jest dojrzałym naukowcem wykazującym się bardzo dużą wiedzą.

Na następną część pracy składają konkluzje, w których Autorka zawarła 17 punktów opisujących najważniejsze osiągnięcia.

Pracę zamykają referencje, na które składają się 234 prace zawierające odpowiednio dobraną aż do chwili obecnej literaturę.

W mojej opinii, dysertacja mgr Anny Rusek jest bardzo wartościowa, rozszerzając naszą wiedzę o złożonych mechanizmach nabywania oporności na trastuzumab, które stanowią solidną podstawę do dalszych badań.

Biorąc pod uwagę powyższe, mam przyjemność stwierdzić, że praca odpowiada warunkom stawianym pracom doktorskim określonym w art. 13.ust 1 Ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki, i dlatego przedstawiam Panu Dziekanowi i Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie magister Anny Rusek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
KATEDRY PATOFIZJOLOGII I IMMUNOLOGII
Narodowy Instytut Geriatrii,
Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie


prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński

Warszawa, 8.09.2019

Prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński

