

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr. inż. Piotra Topolewskiego pt.
„Sources of the cell-to-cell heterogeneity in interferon gamma
and oncostatin M signaling responses”**

Promotor: dr hab. Michał Komorowski

I. Problematyka naukowa oraz przedmiot rozprawy

Mające miejsce w ciągu ostatnich kilku dekad odkrycia i postępy na gruncie nauk biologicznych jasno wskazują na to, że organizmy żywe, a także ich różne funkcjonalne bloki, są złożonymi systemami. Oznacza to, iż są one zbudowane z dużej liczby podstawowych elementów połączonych wzajemnie ze sobą gęstą siecią wzajemnych oddziaływań. Struktura tej sieci jest najprawdopodobniej kluczowa dla funkcji pełnionych przez dany układ biologiczny, jak również dla całego systemu. A zatem po to, by w pełni zrozumieć zasady, na których opiera się funkcjonowanie świata ożywionego, najprawdopodobniej nie wystarczy szczegółowe badanie elementarnych składników, z których zbudowane są organizmy na różnych poziomach organizacji, ale konieczna jest analiza wspomnianych sieci oddziaływań. Innymi słowy, organizmy żywe oraz ich funkcjonalne bloki należy postrzegać jako złożone systemy i jako takie systemy je badać.

Oczywiście, systemy różnego rodzaju badane są co najmniej od połowy XX wieku na gruncie nauk systemowych, na ogół były to jednak systemy innego rodzaju niż biologiczne. Tym niemniej pewne własności są wspólne dla systemów różnych rodzajów i mogą one być podstawą analizy również systemów biologicznych.

Jedną z zasadniczych cech systemów jest to, że wewnątrz nich zachodzi komunikacja. Innymi słowy, między składnikami systemów zachodzi przepływ informacji, który w znacznym stopniu określa funkcjonowanie danego systemu. Ten przepływ informacji odpowiada wspomnianej wcześniej sieci wzajemnych oddziaływań między składnikami systemu. Stąd jego zbadanie jest kluczowe dla zrozumienia funkcjonowania i własności danego systemu. Na ogół nie jest to zadanie łatwe, a szczególnie trudne wyzwanie stanowi ono w przypadku systemów biologicznych. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na różnice między systemami technicznymi (które prawdopodobnie najczęściej bywają badane na gruncie nauk systemowych), a systemami biologicznymi. Do jednej z głównych różnic zaliczyć można sposób powstawania systemów obu rodzajów. Te pierwsze zostały stworzone przez ludzi, natomiast te drugie nie. To dosyć oczywiste stwierdzenie ma istotne znaczenie dla możliwości analizy systemów obu rodzajów, gdyż wynika z niego, że struktura systemów technicznych jest (przynajmniej w zasadzie) znana, ponieważ zostały zaprojektowane przez człowieka, natomiast strukturę systemów biologicznych trzeba odkrywać. Oczywiście nie ułatwia to analizy procesów przepływu informacji w systemach tego rodzaju.

W obu rodzajach systemów (tj. technicznych i biologicznych) nośniki informacji są różne, jednak wiele spośród podstawowych własności procesów przesyłania informacji w obu przypadkach jest takich samych. Oznacza to m.in., że teorię informacji opracowaną początkowo głównie w kontekście systemów technicznych (a konkretnie telekomunikacyjnych) można stosować również do analizy procesów przesyłania informacji w systemach biologicznych. W tych ostatnich nośnikami informacji są często różnego rodzaju cząsteczki nazywane cząsteczkami sygnałowymi, natomiast komunikacja może zachodzić zarówno wewnątrz komórek, jak i między komórkami. W tym drugim przypadku, jeśli komunikacja zachodzi za pośrednictwem cząsteczek sygnałowych, są one wysyłane przez komórki pewnego rodzaju, a ich obecność powinna być w odpowiedni sposób zarejestrowana przez inne komórki, do których adresowana jest przesyłana informacja. Procesy tego rodzaju są często bardzo złożone i mają postać kaskad reakcji nazywanych szlakami sygnałowymi, a kluczowe jest oczywiście to, by komórka będąca adresatem przesyłanej informacji zarejestrowała ją i odpowiednio zareagowała.

Procesy komunikacji wewnątrzkomórkowej oraz międzykomórkowej stanowią przedmiot intensywnych badań i mimo iż poznano dotąd wiele mechanizmów z nimi związanych, bardzo dużo pytań pozostaje nadal bez odpowiedzi. Jednym ze zjawisk, które dotąd nie doczekały się zadowalającego wyjaśnienia jest obserwowana różnorodność (heterogeniczność) reakcji identycznych komórek na identyczne sygnały docierające do nich z zewnątrz. Wydawałoby się, że skoro komórki są takie same, to powinny w taki sam sposób reagować na ściśle określony sygnał. Tak jednak najwyraźniej nie jest. Pojawiły się dwie hipotezy mogące wyjaśnić obserwowaną różnorodność. Zgodnie z jedną z nich źródłem tej różnorodności jest szum molekularny, czyli pewna losowość reakcji biochemicznych. Zgodnie z drugą, komórki w rzeczywistości nie są identyczne, jednak różnice między nimi są na tyle niewielkie, że nie można ich dostrzec za pomocą obecnie stosowanych technik i to ta różnorodność fenotypów komórek jest źródłem różnorodności odpowiedzi na docierające do nich sygnały. Odpowiedź na pytanie, która z tych hipotez jest prawdziwa, jest kluczowa dla możliwości badania procesów przekazywania informacji między komórkami. Jeżeli okazałoby się, że prawdziwa jest hipoteza pierwsza, oznaczałoby to, że możliwości badania tych procesów są bardzo ograniczone ze względu na związaną z nimi losowość. W przypadku, gdyby prawdziwa była hipoteza druga, odpowiedź komórek na docierające do nich sygnały byłaby w dużym stopniu deterministyczna, co otwierałoby możliwości szczegółowego badania wspomnianych procesów.

W swojej rozprawie doktorskiej mgr inż. Piotr Topolewski podjął próbę odpowiedzi na pytanie, która ze wspomnianych hipotez odpowiada rzeczywistości.

II. Analiza treści rozprawy oraz uzyskanych wyników

1. Treść rozprawy

Rozprawa doktorska mgr. inż. Piotra Topolewskiego składa się z siedmiu rozdziałów poprzedzonych streszczeniem oraz listą zastosowanych skrótów, po których to rozdziałach następuje spis literatury oraz spis publikacji Autora i źródeł finansowania jego badań.

Rozdział pierwszy, bardzo krótki, zawiera zwięzłe wyjaśnienie powodów, które spowodowały, że Autor uważa problem rozważany w rozprawie za istotny i wart podjęcia nad nim szczegółowych badań.

Rozdział drugi stanowi przegląd literatury związanej z rozważanym w rozprawie problemem. Jest to obszerny rozdział, podzielony na dziesięć podrozdziałów (wiele z nich

podzielonych jest na podrozdziały niższego rzędu), w których omówione są zagadnienia ściśle powiązane z prowadzonymi przez Doktoranta badaniami. Kolejność poszczególnych podrozdziałów i omawianych w nich zagadnień nie jest przypadkowa. Została ona dobrana w sposób umożliwiający czytelnikowi zrozumienie problemu heterogeniczności komórek i jej związków z komunikacją międzykomórkową. Autor przegląd literatury przedstawił w sposób, który nie tylko pozwala zorientować się, jaki jest obecny stan badań w tej dziedzinie, ale jednocześnie stanowi też pewne wyjaśnienie i uzasadnienie wybranych przez niego metod badawczych oraz konkretnych problemów szczegółowych, które stara się rozwiązać, a także wskazuje wagę wyników uzyskanych przez Autora w toku prowadzonych przez niego badań.

Rozdział trzeci zawiera sformułowanie celu rozprawy doktorskiej oraz pięciu hipotez. Cel pracy został określony jako identyfikacja międzykomórkowej heterogeniczności odpowiedzi komórkowej na stymulację cytokinami interferonem gamma (IFN- γ) oraz onkostatyną M (OSM) indukujących szlak sygnałowy JAK-STAT w mysich oraz ludzkich fibroblastach. Sformułowane hipotezy były kolejno weryfikowane w dalszej części rozprawy, co miało na doprowadzić (i doprowadziło) do osiągnięcia postawionego celu.

Rozdział czwarty poświęcony jest opisaniu wykorzystanych w omówionych w rozprawie badaniach metod oraz materiałów. Składa się on z dwunastu podrozdziałów, z których każdy poświęcony jest omówieniu innej metody lub wykorzystanych materiałów, przy czym ostatni z nich poświęcony jest stronie językowej rozprawy, w którym Autor uzasadnia zastosowanie pierwszej osoby liczby pojedynczej.

Rozdział piąty, najdłuższy, stanowi zasadniczą część rozprawy. Doktorant opisał w nim przeprowadzone przez siebie badania oraz uzyskane wyniki. Do zbadania, czy przyczyną różnorodności odpowiedzi komórek na docierające do nich sygnały jest szum molekularny, czy różnice między fenotypami komórek pozornie identycznych, Doktorant wybrał model badawczy oparty na cytokinach związanych z układem odpornościowym, tj. IFN- γ oraz OSM. Obie cytokiny związane są ze szlakiem sygnałowym JAK-STAT. Wybór cytokin istotnych dla funkcjonowania układu immunologicznego nie był przypadkowy, gdyż układ ten jest jednym z najbardziej złożonych systemów funkcjonujących w organizmach ssaków, a poprawne przekazywanie informacji między jego składnikami jest krytyczne dla właściwego funkcjonowania tego systemu. W ramach przeprowadzonych badań Doktorant analizował szlak sygnałowy związany z IFN- γ w mysich fibroblastach MEF, natomiast szlak związany z OSM w ludzkich fibroblastach BJ.

W pierwszym etapie badań mgr Topolewski zweryfikował wybrany model badawczy, tj. sprawdził, że komórki MEF i BJ odpowiadają na IFN- γ i OSM oraz że poziom białek STAT i pSTAT w jądrze zwiększa się po stymulacji tymi cytokinami, przy czym, jak się okazało, białka pSTAT stanowią lepszą podstawę badania odpowiedzi na zastosowaną stymulację cytokinową.

Po zweryfikowaniu modelu badawczego Doktorant przystąpił do zasadniczej części badań, czyli określenia przyczyny heterogeniczności odpowiedzi komórek na stymulację cytokinami. W tej fazie badań wykorzystał on przygotowane przez siebie syncytia dwujądrowe. Stanowią one dobry model dwóch identycznych komórek trudnych (o ile nie niemożliwych) do uzyskania w praktyce, gdyż dwa jądra w takim syncytium zanurzone są w tej samej cytoplazmie i otoczone są tą samą błoną komórkową. A zatem stanowią one odpowiedni układ mogący posłużyć do określenia wpływu różnorodności fenotypów komórek i szumu molekularnego na różnorodność odpowiedzi komórkowych.

Przeprowadzone przez Doktoranta badania wskazują, że dominującą przyczyną heterogeniczności odpowiedzi komórkowej są różnice między fenotypami komórek, natomiast szum molekularny ma tylko ograniczony wpływ na tę heterogeniczność. Jest to zasadniczy i bardzo ważny wynik uzyskany przez Doktoranta w ramach jego badań

związanych z rozprawą doktorską.

Ponadto, Doktorant podjął m.in. próbę zbadania wpływu cyklu komórkowego na odpowiedź komórek na stymulację cytokinami. W tym przypadku okazało się, że cykl ten nie ma większego wpływu na tę odpowiedź. Jest to również bardzo ważny wniosek z przeprowadzonych badań.

Rozdział szósty zawiera analizę (dyskusję) wyników uzyskanych w rozdziale poprzednim.

Krótki rozdział siódmy zawiera bardzo zwięzłe podsumowanie rozprawy.

2. Uwagi merytoryczne i redakcyjne

Rozprawa doktorska mgr. inż. Piotra Topolewskiego przygotowana została bardzo starannie. Autor zadbał o to, by zarówno zastosowane przez niego metody, jak i przeprowadzone badania oraz uzyskane wyniki opisane zostały w sposób czytelny i precyzyjny. Warto zwrócić uwagę na sposób przedstawienia przeglądu literatury w rozdziale drugim oraz uzyskanych wyników w rozdziale piątym. Pierwszy z tych rozdziałów napisany został w sposób, dzięki któremu czytelnik jest stopniowo wprowadzany w kolejne aspekty zagadnień badawczych, którymi zajmuje się Autor rozprawy, tak że przy końcu tego rozdziału ma jasny obraz dziedziny, zawierający m.in. wyzwania, z którymi mierzy się Doktorant w swojej rozprawie. Z kolei drugi ze wspomnianych rozdziałów napisany jest w sposób pozwalający łatwo dostrzec i docenić tok rozumowania Doktoranta, którym kierował się on przechodząc przez poszczególne etapy prowadzonych przez siebie badań.

Problem, który Autor rozprawy w niej podjął jest niezwykle ważny, a uzyskane wyniki są bardzo interesujące i mają duże znaczenie dla zrozumienia natury skomplikowanych procesów komunikacji międzykomórkowej. O wadze tych wyników świadczy m.in. fakt opublikowania ich w czasopiśmie *Science Signaling*. Mogą one też stanowić istotną wskazówkę do prowadzenia dalszych badań, mających na celu bardziej szczegółowe wyjaśnienie procesów przesyłania informacji między komórkami. Nasuwa się przy tym pytanie, na ile uzyskane wyniki można uogólnić na komórki innego rodzaju niż te badane przez Doktoranta oraz innego rodzaju stymulacje?

3. Podsumowanie

Moim zdaniem mgr inż. Piotr Topolewski przedstawił w swojej rozprawie doktorskiej bardzo interesujące wyniki dotyczące źródeł heterogeniczności odpowiedzi komórek na docierające do nich sygnały. Wyniki te stanowią ważny krok naprzód na drodze do zrozumienia procesów przesyłania informacji w systemach biologicznych, co z kolei jest kluczowe dla zrozumienia zasad funkcjonowania świata ożywionego. Uważam zatem, że wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr. inż. Piotra Topolewskiego stanowią istotny wkład do dyscypliny inżynieria biomedyczna

III. Konkluzja

Rozprawa doktorska mgr. inż. Piotra Topolewskiego zawiera oryginalne i interesujące wyniki naukowe dotyczące heterogeniczności komórek i jej związków z komunikacją międzykomórkową. Moim zdaniem przedstawione w niej wyniki stanowią istotny wkład do dyscypliny inżynieria biomedyczna. Uważam, że wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez obowiązujące przepisy zostały spełnione. Wnoszę zatem o dopuszczenie mgr. inż. Piotra Topolewskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

