



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Fizjologii Bakterii
dr hab. Radosław Stachowiak



Warszawa, 07.11.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Piotra Topolewskiego, pt.:

„Źródła zmienności międzykomórkowej w odpowiedziach na interferon gamma i onkostatynę M”

wykonanej w Instytucie Podstawowych Problemów Techniki PAN pod kierunkiem dr. hab. Michała Komorowskiego.

Interferon gamma i onkostatyna M są białkami należącymi do dużej grupy cytokin. Pełnią istotną rolę w regulacji funkcjonowania układu odpornościowego, w tym elementów odporności nieswoistej, jak i bardziej wyrafinowanej odporności nabytej. Cytokiny umożliwiają przekazywanie informacji, a tym samym komunikację pomiędzy komórkami układu odpornościowego. Komunikacja pomiędzy komórkami jest niezbędna do koordynacji funkcjonowania poszczególnych komórek w celu wspólnego działania, które byłoby zdecydowanie zbyt mało efektywne w przypadku pojedynczych komórek. Aby chronić nas przed zagrożeniem ze strony patogennych bakterii, wirusów czy komórek nowotworowych funkcjonowanie reakcji odpornościowych musi być odpowiednio dynamiczne i precyzyjne. Dokładne opisanie i wymodelowanie tych zjawisk byłoby wystarczające trudne, gdyby wszystkie komórki zachowywały się w taki sam sposób. Niestety tak nie jest, komórki jednego typu różnią się pomiędzy sobą pod bardzo wieloma względami. Zjawisko to nosi nazwę heterogeniczności komórkowej i znacząco komplikuje próby spójnego opisanie i przewidzenia odpowiedzi na zadany bodziec.

Z powyżej wymienionych powodów temat, którego podjął się Pan mgr Piotr Topolewski, uważam za jednocześnie niezwykle skomplikowany oraz interesujący, jak również bardzo istotny.

Recenzowana rozprawa doktorska ma formę spójnego tematycznie opracowania o dość klasycznym układzie, z pewnymi wyjątkami. Rozprawa zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, poza tym całość jest napisana w języku angielskim. Pracę otwiera przydatny spis skrótów oraz dodatkowy rozdział (motivation) w którym Autor przedstawia uzasadnienie podjętego tematu. Rozdział wprowadzający został zatytułowany przegląd literatury (literature review). Chociaż jest to mało typowy tytuł, niewątpliwie oddaje naturę wstępu, który zawiera informacje wprowadzające do tematyki pracy uzyskane na podstawie przeglądu piśmiennictwa. Kolejne rozdziały są już typowe dla prac o charakterze eksperymentalnym. Autor wyróżnił cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i bibliografię. Rozprawę zamyka aneks zawierający informacje na temat dorobku Doktoranta. Rozprawa jest przygotowana starannie, zarówno pod względem językowym jak i graficznym, z zachowaniem odpowiednich proporcji długości poszczególnych rozdziałów. Doktorant popełnił jedynie małą ilość drobnych błędów językowych czy niezręcznych sformułowań. Nie sposób ustrzec się przed tego typu błędami, szczególnie kiedy pisze się pracę w innym niż ojczystym języku.

Wstęp (przegląd literaturowy) rozprawy w bardzo dobrym stopniu wprowadza czytelnika do tematyki pracy. Kolejne podrozdziały wstępu przedstawiają podstawowe informacje na temat zjawiska heterogeniczności komórkowej oraz mechanizmów komunikacji między komórkami. Wprowadzające rozdziały poruszają również problem związany z metodyką i wiarygodnością pomiarów, w szczególności w jaki sposób można ograniczyć wpływ zmienności fenotypu molekularnego na uzyskiwane wyniki. Przegląd literaturowy został przeprowadzony niezwykle skrupulatnie, Autor poruszył i opisał wszystkie aspekty związane z mechanizmami i metodami pomiaru przekazywania międzykomórkowego oraz czynnikami wpływającymi na przekaz informacji. Stosunkowo

niewiele uwagi Autor poświęca samym badanym oraz pokrewnym cytokinom, jednak dokładniejszy opis mógłby zbytnio rozbudować i tak już obszerne wprowadzenie. W rozdziale poświęconym interferonowi Doktorant słusznie zauważa, że z tą cytokiną, z racji dużej roli w przekazywaniu informacji pomiędzy komórkami układu odpornościowego, wiązano duże nadzieje. Niestety, w dużej mierze pozostały one niespełnione. Do praktycznego zastosowania interferonu w biotechnologii medycznej potrzeba znacznie lepszego zrozumienia funkcjonowania szlaków sygnałowych, co dodatkowo zwiększa wagę przedstawionej rozprawy. Wprowadzenie jest bardzo dobrym kompendium wiedzy, jedyne zastrzeżenia mam do niekiedy zbyt daleko posuniętych skrótów myślowych i uogólnień, które w niektórych przypadkach mogą wprowadzać zbyt dużą niejasność w odbiorze. Przykładem może być zbyt hasłowe stwierdzenie, że interferon reguluje ciążę (str. 38 akapit 4). Należy jednak podkreślić, że tego typu błędy są nieliczne i w związku z tym nie wpływają na pozytywny odbiór całości rozprawy.

Cel został sformułowany prosto i precyzyjnie, zgodnie z tytułem rozprawy mgr P. Topolewski postawił sobie za cel identyfikację źródeł zmienności międzykomórkowej po stymulacji fibroblastów badanymi cytokinami. Ponadto Autor postawił aż pięć hipotez do przetestowania w swoich badaniach.

W części metodycznej Autor przedstawił w szczegółowy sposób metody hodowli komórkowej oraz techniki pomiarowe i obróbki danych. Wszystkie eksperymenty były wykonane z minimalną wymaganą liczbą powtórzeń przy tego typu eksperymentach, to jest w dwóch powtórzeniach technicznych i trzech niezależnych eksperymentach. Część metodyczną kończy rozdział dotyczący metodyki lingwistycznej, w którym Autor przekonująco tłumaczy czemu odszedł od najczęściej stosowanego trybu bezosobowego na rzecz narracji w pierwszej osobie.

Pan mgr Piotr Topolewski w rozdziale 5 przedstawił wyniki swoich eksperymentów na ludzkich i mysich fibroblastach. Ludzkie fibroblasty

(linia BJ) zostały zastosowane jako model badawczy dla stymulacji interferonem, natomiast mysie komórki (linia MEF) posłużyły do badania ścieżki onkostatyny. Potencjalnie ogranicza to ilość możliwych do uzyskania wyników, komórki ludzkie i mysie znaczącą różnią się pod wieloma względami. Zabieg ten jest zrozumiały jako ograniczenie liczby prób badawczych, która potrafi być przytłaczająca przy eksperymentach z liniami tkankowymi. Zabrakło mi natomiast wytłumaczenia dlaczego fibroblasty zostały wybrane jako model badawczy. Przykładowo leukocyty wydają się bardziej oczywistym wyborem jako komórki układu odpornościowego. Pan mgr Piotr Topolewski rozpoczął badania od weryfikacji przyjętej metodologii badawczej. Bardzo cenną kontrolą było zastosowanie linii komórkowych pozbawionych białek STAT. Ostatecznie, jako wyznacznik aktywacji komórek przez cytokiny zostały wybrane czynniki transkrypcyjne w formie ufosforylowanej (pSTAT). By odpowiedzieć na postawione w celu pracy pytanie badawcze, Autor zastosował syncytia, dwujądrowe fuzje komórek, jako molekularną symulację dwóch identycznych komórek. Założenia okazały się słuszne, przy pomocy tego modelu Doktorant wykazał że za międzykomórkową heterogeniczność odpowiada w zdecydowanej większości zróżnicowanie fenotypowe na poziomie molekularnym. Jest to duże osiągnięcie, które zostało stosownie do wagi odkrycia opublikowane w prestiżowym czasopiśmie. Doktorant nie ograniczył się do ogólnego rozróżnienia rodzaju źródła heterogeniczności komórkowej. Sprawdził, czy różnice w odpowiedzi komórek na sygnał wynikają z poziomu fosfataz, czynników STAT czy może fazy cyklu komórkowego. Jako główny determinant zróżnicowania został wskazany poziom fosfataz, najmniej istotny okazał się cykl komórkowy. Dość zaskakującym i ciekawym rezultatem jest wykazanie, że poziom DNA (mierzony przed i po replikacji) nie miał wpływu na responsywność komórki na badane sygnały.

Mam jedynie drobne uwagi formalne, w szczególności do nazewnictwa. W opisie wyników zostaje wprowadzony termin fenotypu komórkowego. Wydaje się że jest użyty jako synonim fenotypu molekularnego. Czasem

Autor używa po prostu terminu fenotyp. Zapewne żeby uniknąć nadmiernych powtórzeń, jednak czym innym jest fenotyp na poziomie organizmu, komórki, czy rozpatrywany w tej pracy fenotyp molekularny. Należy podkreślić, że badania zostały starannie przygotowane i przeprowadzone, dobrze opisane i przedstawione na czytelnych i starannie przygotowanych rycinach. Problem jest tylko z czytelnością niektórych zdjęć, szczególnie w przypadku wizualizacji komórek barwionych DAPI (przykładowo fig. 5.21 A i C). Niewątpliwie trudno jest dobrze przedstawić na wydruku wynik fluorescencji, zapewne lepiej sprawdziłaby się jakaś modyfikacja jak rewersja kolorystyki obrazu.

Rozprawę doktorską podsumowuje bardzo dobra Dyskusja, w której mgr Topolewski rzeczowo i wyczerpująco omawia uzyskane wyniki i przedstawia je w kontekście aktualnych, odpowiednio dobranych pozycji literaturowych. Na pochwałę zasługuje obiektywna i sceptyczna postawa Doktoranta przy opisie uzyskanych wyników, który stwierdza że uzyskane wyniki mogą być przeszacowane za sprawą przyjętego modelu badawczego.

Uzyskane wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Science Signalling* a zdobyta wiedza zebrana w postaci publikacji przeglądowej wydanej przez *Current Opinion in Systems Biology*. Obie prace zostały zamieszczone w bardzo prestiżowych czasopismach, publikowane przez wydawnictwa o ugruntowanej renomie, od lat plasujące się na szczycie rankingów (1. kwartył w indeksowanych dyscyplinach). Ponadto, pomimo niedawnej daty publikacji, prace te już zostały zauważone i docenione przez czytelników, czego wynikiem są zarejestrowane cytacje. Ponadto, należy podkreślić że Doktorant poza udziałem w grantie badawczym, pozyskał również własne środki na badania w ramach programu Preludium.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr. Piotra Topolewskiego oceniam jako bardzo dobrą. Doktorant zrealizował postawione cele naukowe, uzyskując ciekawe wyniki o dużej wartości poznawczej oraz znaczącym wpływie na rozwój inżynierii biomedycznej oraz biologii systemów. Równie wysoko oceniam odpowiedni dobór i opanowanie trudnej metodyki badawczej, sposób

zaplanowania i realizacji kolejnych zadań badawczych, zastosowanie teorii informacji do opisu uzyskanych danych eksperymentalnych, a także interpretację i krytyczną dyskusję uzyskanych wyników.

Wniosek końcowy

W mojej opinii przedstawiona do mojej oceny rozprawa w pełni spełnia wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz.U. 2018 poz. 1668). W związku z powyższym, zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Podstawowych Problemów Techniki PAN o dopuszczenie Pana mgr. Piotra Topolewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość naukową uzyskanych wyników oraz wydanych publikacji, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Dr hab. Radosław Stachowiak

