

SRN-404/21D/22

Gliwice, 28 lipca 2022

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

1. Zagadnienia naukowe rozpatrywane w pracy.

Przedmiotem rozprawy jest próba odpowiedzi na pytanie, czy źródłem heterogeniczności w odpowiedziach komórek tego samego typu na ich pobudzenie za pomocą określonych cząsteczek sygnałowych (interferon gamma oraz onkostatyna M) jest przede wszystkim szum molekularny, czy różnice w fenotypach komórek, oraz próba uogólnienia wniosków, płynących z analizy przeprowadzonych eksperymentów. Postawione pytanie jest niezwykle istotne dla zrozumienia sygnalizacji międzykomórkowej oraz jej wykorzystania w celach medycznych. Jeśli szum molekularny ma niewielki wpływ na odpowiedzi komórek na sygnalizację, to zachowanie komórek ma w dużej mierze deterministyczny charakter, a zrozumienie wpływu fenotypu na tę heterogeniczność może posłużyć zarówno do poszukiwania molekularnych celów dla nowych leków, jak i projektowaniu protokołów terapii. Biorąc powyższe pod uwagę, należy stwierdzić, że rozpatrywane w pracy problemy są aktualne i dobrze wpisują się w nurt obecnie prowadzonych prac naukowych. Tematyka rozprawy idealnie wpasowuje się w dyscyplinę Inżynieria Biomedyczna.

W rozprawie postawiono pięć, ściśle powiązanych ze sobą, hipotez badawczych:

1. Różnorodność fenotypów komórek ma zdecydowanie większy wpływ na stopień heterogeniczności odpowiedzi komórkowych, niż szum molekularny.
2. Błąd pomiarowy ma niewielki wpływ na obserwowany poziom sygnałów immunofluorescencyjnych (niezbyt szczęśliwie sformułowana hipoteza).
3. Stan jądra komórkowego ma wpływ na heterogeniczny charakter odpowiedzi badanych szlaków sygnałowych (ta hipoteza nawiązuje bezpośrednio do hipotezy 1).
4. Poziomy określonych białek sygnałowych częściowo przewidują (a raczej: pozwalają przewidzieć lub determinują) odpowiedzi wybranych szlaków sygnałowych.
5. Odpowiedź wybranych szlaków sygnałowych jest inna w komórkach przed replikacją DNA, niż w komórkach po replikacji.

W celu weryfikacji powyższych hipotez przeprowadzono cały szereg eksperymentów na liniach komórkowych, a następnie poddano szczegółowej analizie ich wyniki. Poszczególne hipotezy zostały zweryfikowane, acz dyskusyjne pozostaje to, czy wszystkie w całości, do czego odnoszę się w dalszej części niniejszej recenzji.

2. Struktura pracy

Rozprawa składa się ze streszczenia, listy skrótów oraz dziewięciu numerowanych części, w tym Bibliografii i listy publikacji Autora oraz źródeł finansowania (dwie ostatnie zwykle nie są numerowane w rozprawach). Pierwszy rozdział przedstawia motywację podjęcia tematu. Drugi, obszerny rozdział poświęcony został omówieniu najważniejszych zagadnień, związanych z tematyką pracy, na tle światowej literatury. Poruszone w nim zostały kwestie sygnalizacji międzykomórkowej, źródeł heterogeniczności w odpowiedziach komórkowych, technik eksperymentalnych, w szczególności umożliwiających ograniczenie wpływu na te odpowiedzi różnic w fenotypach komórek, a także teorii informacji i jej zastosowania w analizie szlaków sygnałowych. W dwóch ostatnich podrozdziałach opisano zagadnienia, związane z sygnalizacją w układzie odpornościowym, a w szczególności szlakami Interferonu gamma i onkostatyny M. Na tym tle w Rozdziale 3 zostały przedstawione cele rozprawy i hipotezy badawcze.

Rozdziały 4-7 opisują rezultaty oryginalnych badań naukowych, przeprowadzonych przez Doktoranta, stanowiących niewątpliwie osiągnięcie naukowe, pozwalające ubiegać się o stopień naukowy doktora. Rozdział 4 stanowi szczegółowy opis metod eksperymentalnych i metod analizy danych, wykorzystanych w pracy. W Rozdziale 5 przedstawiono wyniki eksperymentalne oraz ich szczegółową analizę. Dodatkowe wnioski, dotyczące dokładności odpowiedzi komórkowej oraz możliwości przewidywania tej odpowiedzi, przedstawiono w Rozdziale 6. Całość podsumowana została w Rozdziale 7.

3. Analiza źródeł

Spis literatury zawiera 209 pozycji, z czego dwie ([181] i [182]) są współautorstwa Doktoranta. W zdecydowanej większości są to prace bezpośrednio związane z tematyką rozprawy, zarówno klasyczne, jak i najnowsze. Część z nich porusza zagadnienia związane z teorią informacji, ale zdecydowana większość to publikacje biologiczne, biomedyczne lub poświęcone modelowaniu matematycznemu procesów komórkowych. Dobór bibliografii świadczy o dobrym rozeznaniu Doktoranta w literaturze światowej w tematyce, którą się zajmuje. Jednocześnie warto zauważyć, że obecnie bardzo trudno mieć pełne rozeznanie w literaturze związanej z tematem własnych badań i zawsze można wskazać dodatkowe prace, do których warto byłoby jeszcze sięgnąć (np. Strasen et al., *Mol Sys Biol* 2018, w kontekście hipotez 1) i 4)).

4. Oryginalność i silne strony rozprawy.

Treść rozprawy została oparta na dwóch pracach, których Doktorant był współautorem, opublikowanych w znaczących czasopismach naukowych. Wykorzystane zostały w niej co prawda standardowe metody konstruowania modeli biologicznych, schematy eksperymentalne i metody analizy, ale uzyskane wyniki są niewątpliwie oryginalne. Pewną trudność stanowi precyzyjne określenie, co jest samodzielnym dorobkiem Autora (zwłaszcza w wieloautorskiej pracy z *Science Signalling*), ponieważ w dostarczonej dokumentacji brakuje oświadczeń współautorów. Ponieważ jednak Doktorant jest pierwszym autorem obu prac, można przyjąć, że jego wkład był znaczący. Do szczególnie wartościowych, oryginalnych elementów rozprawy, istotnych z naukowego punktu widzenia należy zaliczyć:

- wykazanie, że w analizowane szlaki sygnałowe wykazują w zasadzie deterministyczny charakter odpowiedzi, a wpływ szumów molekularnych jest niewielki (potwierdzenie hipotezy 1), z zastrzeżeniem wskazanym w punkcie 6.2 niniejszej recenzji),
- wykazanie, że odpowiedź komórek na silne pobudzenie wybranymi cytokinami nie zależy od fazy cyklu komórkowego.

Ponadto, silną stroną rozprawy jest staranne zaprojektowanie protokołów eksperymentalnych, poprzedzone wstępnymi badaniami, mającymi na celu wybór reprezentatywnych czasów pomiaru i odpowiednich linii komórkowych dla poszczególnych pobudzeń.

5. Słabsze strony rozprawy

Do słabszych stron pracy należą:

- bardzo swobodne potraktowanie zagadnień błędu pomiarowego w podrozdziale 5.4, związanego z hipotezą 2) – uwaga 6.4 poniżej,
- brak podania uzasadnienia dla założenia, że komórki, które słabo odpowiadają na pobudzenie o niskim stężeniu cytokin będą również słabo odpowiadać na pobudzenie o wysokim stężeniu – uwaga 6.3 poniżej,
- ograniczona analiza wyników otrzymanych dla niskich stężeń – uwaga 6.2 poniżej.

Należy jednak stwierdzić, że silne strony rozprawy zdecydowanie przeważają nad słabszymi.

6. Szczegółowe uwagi merytoryczne i redakcyjne

W pracy pojawiły się pewne niejasności oraz niedomówienia, istotne w tym sensie, że Doktorant powinien się do nich odnieść w trakcie obrony (zwłaszcza 6.1-6.12). W szczególności:

- 6.1. Doktorant bardzo silnie koncentruje się na odpowiedziach pojedynczych komórek i wnioskuję, że charakteryzują się one wysoką precyzją (np. pierwsze zdanie podrozdziału 6.1). Pomija przy tym efekt uśredniania odpowiedzi losowej na poziomie populacji komórkowej, który wydaje się bardzo istotny w wielu procesach, przebiegających na poziomie fizjologicznym (efekt takiego uśredniania badał m.in. prof. Lasota w swoich pracach z lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku). Wydaje się, że w odpowiedzi układu odpornościowego istotniejsza jest średnia odpowiedź populacyjna (np. w przypadku sekrecji cytokin, wzbudzenia poszczególnych typów komórek układu odpornościowego itp.), niż odpowiedź pojedynczej komórki. Co prawda Doktorant w pewnym sensie wspomina o tym, m.in. w podrozdziale 2.6, ale koncentruje się tam na efektach spowodowanych przez precyzyjnie odpowiadające subpopulacje.
- 6.2. Jednym z najważniejszych wyników rozprawy jest wniosek o nieznacznym wpływie szumu molekularnego na odpowiedź komórek i, wynikający z tego, ich niemal deterministyczny charakter. O ile wyniki zaprezentowane dla większych stężeń cytokin rzeczywiście pozwalają na takie stwierdzenie, to przy stężeniu 0.1 ng/mL sprawa nie jest tak oczywista, o czym świadczą choćby Rys. 5.4CD, 5.5 BD. Wydaje się, że odpowiedzi/precyzji odpowiedzi pojedynczych komórek są zbyt silne, a obliczenia, w których wyznaczono wpływ różnic w fenotypach na wariancję odpowiedzi, gdzie zgrupowano razem wszystkie niezerowe dawki – nie do końca uprawnione. Należy się raczej spodziewać, że przy małych stężeniach cytokin wpływ szumu molekularnego powinien być większy (zresztą z danych dla późniejszych czasów również wynika osłabienie bardzo silnego stwierdzenia z tytułu podrozdziału 5.2.7); wydaje się, że generalizacja wniosków o deterministycznym charakterze odpowiedzi komórkowej nie jest w pełni uzasadniona.
- 6.3. Doktorant założył, że komórki, które słabo odpowiadają na pobudzenie o niskim stężeniu cytokin będą również słabo odpowiadać na pobudzenie o wysokim stężeniu, ale nie uzasadnił tego założenia (str. 73). Dla innych układów eksperymentalnych można znaleźć prace, które pokazują, że procent komórek odpowiadających na dane wymuszenie zależy od siły tego wymuszenia (np. Kardyńska et al., *PLOS Comp Biol*, 2018). Wydaje się, że taki efekt może mieć również miejsce w układach analizowanych w rozprawie, a wtedy założenie, na którym oparto część rozumowania nie byłoby spełnione.
- 6.4. W podrozdziale 5.4 Doktorant przeprowadza analizę błędów pomiaru immunofluorescencji. Nieprawdą (lub inaczej – prawdą jedynie przy dodatkowych założeniach) jest to, że błąd

pomiaru ma rozkład normalny o średniej równej zeru. Ponadto Doktorant miesza ze sobą różne źródła błędów, podczas gdy, mim zdaniem, sformułowanie „błąd pomiaru immunocytofluorescencji” powinien odnosić się jedynie do fizycznego pomiaru fluorescencji. Natomiast pomiar poziomu danego białka jest obarczony błędami o różnych źródłach (które będą się charakteryzowały różnymi rozkładami), wymienionymi w tym podrozdziale. Z metrologicznego punktu widzenia analiza przeprowadzona w tym rozdziale pozostawia wiele do życzenia (czymś innym jest błąd pomiaru fluorescencji, a czym innym błąd pomiaru poziomu badanych molekuł, brak rozróżnienia błędów pomiarowych różnego typu, brak kalibracji itd.) - oparcie analizy błędu wyłącznie na wariancji wyników jest, moim zdaniem, niewystarczające.

- 6.5. W podrozdziale 5.5.2 Doktorant stwierdza m.in., że poziom receptorów jest słabym predyktorem odpowiedzi komórkowej. Jednakże wniosek taki został wysnuty na podstawie wyników otrzymanych dla pobudzenia o wysokim stężeniu cytokin. Czy nie należy się spodziewać, że przy niskich stężeniach to właśnie poziom receptorów byłby lepszym predyktorem, niż poziom białek STAT?
- 6.6. Podobnie, jak w poprzedniej uwadze, wnioski w podrozdziale 5.6.2, o zależności odpowiedzi na pobudzenie cytokinami od fazy cyklu komórkowego, zostały również wysnute na podstawie pobudzenia o wysokim stężeniu cytokin. Czy taka niezależność zostałaby utrzymana bez względu na stężenie cytokin? Czy nie byłoby lepszym pomysłem wstępne zsynchronizowanie komórek przed podaniem cytokin?
- 6.7. Nie całkiem jasne jest, dlaczego Doktorant proponuje poszukiwanie celów molekularnych przy projektowaniu leków tak, by zminimalizować wariancję odpowiedzi komórek – samo w sobie wcale nie musi to oznaczać np. zmniejszenia populacji nowotworowej (str. 36).

Pozostałe uwagi ogólne i komentarze, jakie nasuwają się podczas uważnej lektury recenzowanej rozprawy doktorskiej dotyczą następujących zagadnień:

- 6.8. Czy wszystkie powtórzenia biologiczne poszczególnych eksperymentów dawały podobne wyniki, czy też pojawiły się w ich trakcie wyniki odbiegające od innych, które jednak zostały odrzucone?
- 6.9. W podrozdziale 5.1.2 Autor stwierdza, że maksymalny poziom odpowiedzi na IFN- γ można zaobserwować dla czasu 15 min – na Rys. 5.3A i 5.8A rozkłady dla czasów 15 i 30 min wyglądają bardzo podobnie – czy to podobieństwo jest tylko pozorne?
- 6.10. Czy błąd techniczny w tytule podrozdziału 5.4.1 i błąd pomiarowy oznaczają to samo?
- 6.11. Parametr α w równaniu (5.10) jest współczynnikiem kierunkowym prostej regresji – jak należy rozumieć jego wyrażenie w procentach (w podrozdziale 5.4.2)?
- 6.12. Na ile dwujądrowe syncytia są dobrym punktem odniesienia w biologii molekularnej? Czy ich odpowiedzi można rzeczywiście uznać za reprezentatywne dla zwykłych komórek, czy też stres, jakim zostały poddane komórki w trakcie tworzenia syncytiów w znaczący sposób aktywuje sieci regulatorowe i szlaki sygnałowe, zakłócając obraz „normalnej” odpowiedzi?
- 6.13. Niektóre prace wskazują, że oba rodzaje szumów, analizowanych w rozprawie, są wzajemnie od siebie zależne i należy to uwzględniać w analizach (Justman, *Cell Systems*, 2015, odnoszący się do publikacji Hofmann et al. w tym samym numerze).

Inne uwagi szczegółowe:

- 6.14. W podrozdziale 2.8.3 Autor, cytując literaturę, stwierdza, że można założyć wysokie podobieństwo pomiędzy odpowiedziami komórek będących wynikiem podziału komórki macierzystej (tzw. rodzeństwa), zwłaszcza w kontekście odpowiedzi determinujących ich los. Szerszy przegląd literatury pokazałby jednak, że założenie takie może okazać się zbyt silne (np.

praca Dołbniak et al., *Biol Direct*, 2015 – choć tam analizowane akurat odpowiedzi nie są związane z losem komórek).

6.15. Analiza cyklicznego pobudzania komórek jest dużo bardziej skomplikowana, niż zostało to opisane w podrozdziale 2.8.4. Istnieje wiele prac pokazujących, że kolejne pobudzenia mogą skutkować silniejszą lub słabszą odpowiedzią (bądź jej całkowitym brakiem), w zależności od wykorzystanych czynników pobudzających, ich kolejności, stężeń itp.).

6.16. Stwierdzenie, że ufosforylowana forma białek z grupy STAT lepiej reprezentuje odpowiedź na pobudzenie komórek cytokinami, niż całkowity poziom STAT (podrozdział 5.1.1) jest oczywiste, biorąc pod uwagę dużą ilość białek STAT w niepobudzonych komórkach i ich udział w wielu szlakach sygnałowych.

6.17. Niezbyt jasny jest wywód o dyfuzyjnym charakterze ruchu ufosforylowanych białek STAT (str. 100-101) – wiadomo np., że za transport do jądra kompleksów pSTAT odpowiedzialne są odpowiednie importyny.

6.18. W pracy pojawiają się niedociągnięcia językowe i edycyjne. Między innymi:

- mniej więcej od połowy polskiej wersji streszczenia Autor zmienił płeć („pokazałam”, „wykazałam”),
- ucięcie fragmentów rysunków lub ich opisów (Rys. 2.11, 5.7, 5.14),
- drobne błędy językowe (np. „information” nie powinno być poprzedzone rodzajnikiem „the” - linia pierwsza na str. 10, niezbyt szczęśliwie dobrane słownictwo - „omit” zamiast „neglect” na str. 11; nadużywanie rodzajnika „a” po słowie „such” (zwroty „such” oraz „such a” mają inne odcienie znaczeniowe),
- niezbyt szczęśliwie dobrane sformułowania (np. tytuł i treść podrozdziału 5.4.2 sugeruje wpływ błędu pomiarowego na poziom obserwowanego białka, a raczej nie o to chodziło Autorowi; stwierdzenie „each STAT protein is tyrosine phosphorylated” (str. 98, linia 4) – jak należy je rozumieć?; „response is easy to conclude” (str. 100), „survival rate” (sr. 36) – nieprawidłowe frazeologizmy).

7. Ocena końcowa rozprawy.

Podsumowując, pomimo licznych uwag szczegółowych, wymienionych powyżej, uważam, że silne strony pracy wymienione w punkcie 4 niniejszej recenzji zdecydowanie przeważają nad słabszymi. Stwierdzam, że mgr inż. Piotr Topolewski wykazał się wiedzą i umiejętnościami uprawniającymi go do ubiegania się o stopień doktora nauk technicznych w dyscyplinie Inżynieria Biomedyczna. Przedstawiona praca doktorska spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim przez ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. W szczególności, jej przedmiotem jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, zdefiniowanego przez postawione hipotezy badawcze, posiada tytuł magistra inżyniera oraz jest współautorem dwóch artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych, ujętych w odpowiednim wykazie. Wniosuję o dopuszczenie mgr. Inż. Piotra Topolewskiego do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.