



Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej
im. Macieja Nałęcz
Polskiej Akademii Nauk

Dr hab.
Jan Poleszczuk

Warszawa, 2 grudnia 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Darii Kałużyńskiej pt. *Modelowanie i analiza wybranych mechanizmów regulacji procesów wewnątrzkomórkowych*

Promotor: prof. dr hab. inż. Jarosław Śmieja

Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Lalik

1. Zagadnienia naukowe rozpatrywane w pracy

Przedmiotem rozprawy jest zaproponowanie modelu opisującego proces translacji mRNA ze szczególnym uwzględnieniem występowania polisomów oraz regulacji procesu przez mikroRNA, a następnie zweryfikowanie jego przewidywań z autorskimi wynikami eksperymentalnymi. W szczególności, w rozprawie Autorka stara się odpowiedzieć na pytanie, który z mechanizmów regulacji translacji przez mikroRNA przedstawianych w literaturze ma największe znaczenie w odpowiedzi komórkowej na stres związany z oddziaływaniem promieniowania jonizującego. Postawione pytanie, jak i próba zaproponowania nowego modelu, jest niezwykle istotne dla zrozumienia procesów regulacyjnych zachodzących w komórce i może być ważne dla dalszych prac eksperymentalnych, które mają na celu poszukiwanie nowych celów terapeutycznych np. w chorobach nowotworowych. Należy pamiętać, że promieniowanie jonizujące stosuje się jako jeden z elementów leczenia u około 50% pacjentów z chorobą nowotworową, zatem każde badanie wzbogacające nasze rozumienie odpowiedzi komórek na promieniowanie jonizujące może mieć ogromny wpływ populacyjny. Biorąc pod uwagę powyższe, należy stwierdzić, że rozpatrywane w pracy problemy są aktualne i dobrze wpisują się w nurt obecnie prowadzonych prac naukowych. Tematyka rozprawy niewątpliwie wpisuje się w dyscyplinę Inżynieria Biomedyczna.

W rozprawie wyróżnione zostały trzy hipotezy badawcze: 1) *Modele hybrydowe wykorzystujące maszyny stanowe są skutecznym narzędziem pozwalającym na postawienie i wstępną weryfikację hipotez dotyczących biochemicznych mechanizmów regulacyjnych*; 2) *Regulacja ekspresji białek zależna od mikroRNA wykorzystuje równolegle wiele mechanizmów*; 3) *Mechanizm regulacji translacji z udziałem mikroRNA zależy od konkretnego mRNA i mikroRNA*. W celu weryfikacji powyższych hipotez przeprowadzono szereg badań eksperymentalnych, a

następnie porównano ich wyniki z zaproponowanym modelem wykorzystującym maszyny stanowe. Powyższe hipotezy zostały wstępnie zweryfikowane, acz dyskusyjne pozostaje to, czy część przyjętych założeń i uzyskanych wniosków nie wymaga dalszych analiz – na to wskazują uwagi zawarte w dalszej części recenzji.

2. Struktura pracy

Rozprawa składa się ze spisu treści, streszczenia w języku polskim oraz angielskim, ośmiu numerowanych części razem z podsumowaniem, bibliografii, spisu skrótów i symboli, spisu rysunków i tabel, suplementu oraz opisu dorobku naukowego Autorki. Pierwszy numerowany rozdział wprowadza krótko w tematykę rozprawy i przedstawia motywację podjęcia tematu wraz z badanymi hipotezami. Rozdziały drugi i trzeci poświęcone są omówieniu zagadnień związanych z tematyką pracy. W rozdziale drugim opisane są zagadnienia związane z procesem ekspresji genów oraz jaki wpływ na komórkę ma promieniowanie jonizujące. W szczególności Autorka skupiła się w rozdziale drugim na szczegółowym przedstawieniu procesu translacji mRNA, z uwzględnieniem mechanizmu działania rybosomów oraz wpływu mikroRNA na cały proces. W rozdziale trzecim Autorka przedstawiła istniejące modele matematyczne opisujące proces translacji, z krótkim przedstawieniem do jakich celów badawczych były wykorzystywane.

Rozdziały 4 oraz 5 opisują odpowiednio metodologię eksperymentów wykonanych na potrzeby pracy oraz zaproponowany model oparty o maszynę stanów. Rozdział 6 przedstawia wyniki eksperymentalne oraz wyniki symulacji zaproponowanego modelu, które są dyskutowane dalej w rozdziale 7. Całość została posumowana w Rozdziale 8.

Układ pracy oceniam jako prawidłowy. Rozważyć można by było jedynie przedstawienie wyników eksperymentalnych przed wprowadzeniem modelu – łatwiej byłoby zrozumieć przyjęte w nim założenia i metody symulacyjne.

3. Analiza źródeł

Spis literatury zawiera 197 pozycji, wszystkie bezpośrednio związane z tematyką rozprawy i aktualne. Dużo pozycji pochodzi z najlepszych światowych czasopism, takich jak Nature, PNAS, czy też Cell. Dobór bibliografii świadczy o dobrym rozeznaniu Doktorantki w literaturze światowej w tematyce, którą się zajmuje.

4. Originalność i silne strony rozprawy

W pracy wykorzystane zostały metody dość standardowe, jednak sposób ich wykorzystania oraz uzyskane wyniki są niewątpliwie oryginalne. Uzyskane wyniki nie zostały jeszcze opublikowane, ale wydaje się, że po pewnych uzupełnieniach powinny znaleźć miejsce w znaczących międzynarodowych czasopismach naukowych. Do szczególnie wartościowych, oryginalnych elementów rozprawy, istotnych z naukowego punktu widzenia można zaliczyć:

- Zaproponowanie nowego podejścia do modelowania procesu translacji w oparciu o maszynę stanów, co pozwala na niezwykłą dokładność i jednocześnie prostotę opisu przesuwania się rybosomów po mRNA.
- Przeprowadzenie serii eksperymentów badających zmiany w procesie translacji kluczowych białek, które zachodzą na skutek działania promieniowania jonizującego, a następnie próba wyjaśnienia uzyskanych wyników przy pomocy zaproponowanego modelu. Uzyskane wyniki sugerują, że do modyfikacji translacji w wyniku stresu przyczynia się szereg mechanizmów jednocześnie.

Silną stroną rozprawy jest niewątpliwie całościowe podejście do problemu, czyli zaproponowanie nowego modelu i jego wstępna weryfikacja przy wykorzystaniu wyników z samodzielnie przeprowadzonych eksperymentów biologicznych. W dzisiejszym świecie, w którym nowe modele są proponowane w literaturze niemal każdego dnia, szczególnie ten ostatni element (weryfikacja modelu z własnymi eksperymentami) zasługuje na pochwałę.

5. Słabsze strony rozprawy

Do słabszych stron pracy należą:

- Opis modelu zaproponowanego w pracy wydaje się niepełny i zostawia pewne pole do interpretacji, w szczególności w częściach, które nie dotyczą samej maszyny stanów. W dzisiejszych czasach wskazane jest przedstawianie w pracy przynajmniej pseudokodu opisującego model, a najlepiej umieścić kody wykorzystane do symulacji w dostępnym dla czytelnika repozytorium.
- W pracy rozważano jedynie dyskretne wartości opisujące siłę działania poszczególnych mechanizmów regulacyjnych mikroRNA (0%, 25%, 50%, 75% i 100%). Wydaje się, że w przypadku porównywania modelu tylko do konkretnego punktu końcowego, mechanizmy M1-M3 są wymienne i różnice w rankingu wynikają z tego, że sprawdzono jedynie dyskretne wartości. Dlatego wykorzystanie metod optymalizacyjnych przeszukujących całą przestrzeń (np. w oparciu o gradient) byłoby bardziej odpowiednie.
- W związku z celem badawczym, właściwe byłoby przeprowadzenie własnych eksperymentów przy wykorzystaniu cząstek wyciszających działanie konkretnych mikroRNA.

Oryginalność i silne strony rozprawy przeważają jednak nad słabszymi.

6. Szczegółowe uwagi merytoryczne i redakcyjne

W pracy pojawił się braki lub niejasności w elementach istotnych dla merytoryki pracy, do których Doktorantka powinien odnieść się w trakcie obrony. W szczególności:

- 6.1. Na Rysunku 4.1. Autorka przedstawiła informację o punkcie końcowym po 1h, natomiast w dalszej części przedstawiane są wyniki tylko dla 4h i 12h. Czy punkt czasowy po 1h nie był

jednak sprawdzany, czy też może wyniki nie były odpowiedniej jakości do przeprowadzenia dalszych analiz?

- 6.2. W opisie części modelu dotyczącej maszyny stanów zabrakło mi opisu sytuacji, w której głowice (rybosomy) zaczynają na siebie nachodzić. Teoretycznie, patrząc na różnice w wyliczonym czasie przyłączania się tRNA, można wyobrazić sobie sekwencję, dla której rybosom rozpoczynający pracę z pewnym opóźnieniem „dogania” już pracujący rybosom. Czy taki przypadek był uwzględniony w modelu? Jeśli tak, to jak został ten przypadek algorytmicznie rozwiązany?
- 6.3. Opis mechanizmów regulacyjnych przedstawiony w podrozdziale 5.2.3 jest niewystarczający do zrozumienia jak dokładnie realizowane są poszczególne symulacje i z jakimi dokładnie wartościami parametrów.
- 6.4. W podrozdziale 5.2.4 Autorka pisze o względnych poziomach ekspresji zarówno mRNA jak i białka w obecności mikroRNA wziętych z literatury. Nie jest jednak przytoczony odnośnik do pozycji literaturowej oraz wskazane byłoby choć krótkie opisanie jak wyglądały eksperymenty.
- 6.5. Na wykresach przedstawiających wyniki kontrolne nie jest jasne z jakiego punktu czasowego zostały one wzięte (1h, 4h, czy też 12h). Co więcej, wszystkie wyniki należałoby wzbogacić testami statystycznymi sprawdzającymi, czy rzeczywiście występują istotne różnice w wynikach dla poszczególnych punktów czasowych.
- 6.6. Jednym z elementów symulacji modelu jest losowanie liczby rybosomów – naturalnie jest w ten sposób wprowadzony element stochastyczny, o którym Autorka wspomina w dyskusji. Na wykresach widzimy jednak pojedyncze linie – czy to jest średnia? Jeśli, tak to jak wyglądało odchylenie standardowe dla każdego przedstawionego przypadku? Idąc dalej, jak te odchylenia przedstawiają się w rankingach?
- 6.7. Na rysunku 6.12 i w wartości błędu w Tabeli 6.2. widać, że dopasowanie do względnego poziomu mRNA nie jest jednak prawidłowe. Czy możemy uznać zatem, że model prawidłowo zidentyfikował wagę poszczególnych mechanizmów (M1-4)? Jeśli nie, to w dyskusji warto byłoby rozważyć jakie zmiany w modelu mogłyby pomóc rozwiązać ten problem.
- 6.8. Nie jest do końca jasne czym różniły się symulacje dla PTEN i miR-638 oraz miR-29a. W dodatku, czy wpływ tych dwóch mikroRNA nie powinien być rozważany jednocześnie przy przeprowadzaniu symulacji?

Pozostałe uwagi ogólne i komentarze (niewymagające odnoszenia się w trakcie obrony):

- 6.9. Tytuł pracy wydaje się zbyt ogólny względem tego co w pracy zostało uwzględnione.
- 6.10. Słowa kluczowe w wersji polskiej znajdują się pod streszczeniem w języku angielskim. Dodatkowo nie ma wersji angielskiej słów kluczowych.
- 6.11. Zapoznanie się z tematyką przedstawioną w Rozdziale 2 byłoby zdecydowanie łatwiejsze gdyby Autorka zamieściła w nim ilustracje poszczególnych procesów (w literaturze istnieje wiele przykładowych ilustracji, na których można by było się oprzeć).
- 6.12. Rozdział 2 przedstawia wiele informacji, które nie wydają się być kluczowe dla wyników zaprezentowanych w pracy. Wskazane byłoby ograniczenie się do rzeczy, które mają pomóc czytelnikowi w zrozumieniu wyników zawartych w pracy.

- 6.13. W podrozdziale 2.8.2 Autorka pisze o tym, że jeśli komórki nowotworowe są w stanie skutecznie naprawić uszkodzenia spowodowane promieniowaniem, to rozwija się oporność na promieniowanie. Takie stwierdzenie nie jest do końca prawdziwe, ponieważ komórki nowotworowe wcale nie muszą skutecznie naprawić uszkodzeń żeby przeżyć.
- 6.14. Autorka używa w pracy skrótów ODE, przy czym w języku polskim przyjęte jest stosowanie skrótów RRZ.
- 6.15. Rysunek 3.1. ma zbyt uproszczony opis względem tego co przedstawia. W dodatku zawiera sformułowania w języku angielskim.
- 6.16. Czytelnik miałby niezwykle ułatwione zadanie, gdyby na końcu Rozdziału 4 Autorka przedstawiła tabelkę z informacją jakie ostatecznie dane eksperymentalne otrzymała (nazwa danej, opis danej, jednostki).
- 6.17. W Tabeli 5.1. w nagłówku ostatniej kolumny należałoby dodać wzór na podstawie którego wyliczono czas.
- 6.18. Ostatnia kolumna w Tabeli 5.4. (suma dla frakcji) wydaje się mieć niepoprawne wartości.
- 6.19. Wykresy przedstawione w Rozdziale 6 powinny być lepiej zorganizowane - w obecnej formie mamy liczne powtórzenia wykresów. Bardziej wskazane byłoby przedstawienie pogrupowanych słupków oznaczających poszczególne punkty czasowe na jednym wykresie.

7. Ocena końcowa rozprawy

Podsumowując, pomimo uwag szczegółowych przedstawionych powyżej, uważam, że silne strony pracy przeważają nad słabszymi. Stwierdzam, że mgr inż. Daria Kałużyńska wykazała się wiedzą i umiejętnościami uprawniającymi ją 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 postawioną hipotezę badawczą. Autorka posiada tytuł magistra inżyniera, jest współautorką trzech artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych ujętych w odpowiednim wykazie oraz pięciu rozdziałów w monografiach naukowych. Wnioskuje o dopuszczenie mgr inż. Darii Kałużyńskiej do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

