

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr BEATY HAT-PLEWIŃSKIEJ

Wpływ ilości kopii genu na dynamikę sieci regulatorowych w komórce

Praca została napisana w Zakładzie Mechaniki i Fizyki Płynów pod kierunkiem doc. dr-a habilitowanego Tomasza Lipniackiego. Tematyka rozprawy wpisuje się w najnowsze trendy biologii obliczeniowej, w której analiza ścieżek sygnałowych zyskuje pierwszorzędne znaczenie. Rozprawa oparta jest na czterech pracach zamieszczonych w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej. W dwu z nich mgr Beata Hat-Plewińska jest pierwszym autorem.

Zasadność podjęcia postawionego w tytule pracy zagadnienia

W zależności od rodzaju komórek liczba kopii danego genu może być różna. Dla komórek haploidalnych wynosi ona jeden, dla komórek diploidalnych dwa, a dla niektórych komórek zmutowanych np. komórek rakowych liczba ta może wynosić w ogólności $N=2,3,\dots$. W dalszej części pracy ten przypadek określa się mianem 'genu N-ploidalnego'. Uzasadnienie podjęcia tego rodzaju zagadnienia jest wielorakie i zostało przejrzysto sformułowane w podrozdziałach 1.2 i 1.3. Niektóre geny mogą być replikowane już w normalnych tj. zdrowych komórkach w odpowiedzi na stresogenne czynniki środowiskowe, gdy wzrasta zapotrzebowanie na kodowane przez dany gen białko. Liczba genów może zmieniać się na skutek pewnych procesów, np. błędów replikacyjnych. Sytuacja ta ma miejsce np. w przypadku komórek rakowych, w których następuje multiplikacja genomu. Przede wszystkim jednak konieczność rozważenia powyższego zagadnienia wynika z obecnego stanu techniki eksperymentów na żywych komórkach. Dotyczy to w szczególności eksperymentów na pojedynczych komórkach, które są niezbędne do uchwycenia dynamiki rozpatrywanych zjawisk. Niezmutowane zdrowe komórki obumierają w hodowli 'in vitro' na tyle szybko, że śledzenie procesów biochemicznych w nich zachodzących jest praktycznie niemożliwe. Obecne techniki eksperymentalne umożliwiają jedynie analizę praktycznie nieśmiertelnych komórek rakowych z dobrze zdefiniowanych linii (takich jak np. HeLa-cells). Co więcej, w celu rejestracji poziomu syntetyzowanego białka, należy dokonać tzw. transfekcji, tzn. wprowadzić do komórki odpowiednie sekwencje genomu kodujące białko. Sekwencje te mają dołączony czynnik fluoroscencyjny. Liczba transfekowanych sekwencji jest jednak słabo kontrolowalna. Analiza powyższych eksperymentów wymaga więc uwzględnienia w rozpatrywanych modelach wpływu liczby kopii genu na zachodzące zjawiska.

ZAWARTOŚĆ PRACY

Praca składa się z 144 stron. Zawiera 9 rozdziałów i spis 74 pozycji literaturowych.

Rozdział 1 wprowadza czytelnika w biologiczne podstawy ekspresji genów i sieci regulatorowych jako takich, omawia eksperymenty na pojedynczych komórkach stanowiące źródło danych doświadczalnych istotnie bogatsze od eksperymentów uśredniających po całych populacjach komórek.

Rozdział 2 podaje podstawowe pojęcia, jakie mogą być użyteczne przy tworzeniu stochastycznych modeli ścieżek regulatorowych: zmiennej losowej, procesu stochastycznego, procesu Markowa. Wprowadza się również równanie Chapmana-Kołmogorowa oraz równanie Mistrzów. Szczególnie ostatnie z nich jest eksploatowane przez autorkę w następnych częściach pracy.

W Rozdziale 3 analizuje się wpływ liczby kopii genu na procesy ekspresji genów w komórce z uwzględnieniem efektów stochastycznych. Przedmiotem analizy jest tutaj abstrakcyjny model uwzględniający procesy transkrypcji cząsteczek mRNA i tworzenia się kodowanych przez nie cząsteczek białka (translacja). Model ten oparty jest na referencji [15] (T. Lipniacki, P. Paszek, A. Marciniak-Czochra, A.R. Brasier and M. Kimmel. Transcriptional stochasticity in gene expression. *J. Theor. Biol.* 238:348-367 (2006)). W pierwszej części rozważa się gen posiadający tylko pojedynczą kopię (gen haploidalny). Gen może znajdować się w dwu stanach: aktywnym i nieaktywnym. Procesy transkrypcji mRNA mają miejsce tylko dla stanu, w którym gen jest aktywny. Aktywność genu zmienia się w sposób stochastyczny, przy czym prawdopodobieństwo przejścia ze stanu aktywnego w nieaktywny i odwrotnie jest proporcjonalne do współczynników kinetycznych, które mogą być zależne od liczby cząsteczek białka. Wykorzystując układ równań Mistrzów na gęstość prawdopodobieństwa liczby cząsteczek mRNA i białka, autorka wyznaczyła analitycznie średnie wartości oraz wariancje tych wielkości w przypadku dyskretnym bez autoregulacji, tzn. w przypadku, gdy współczynniki kinetyczne przejścia genu między stanami aktywnym i nieaktywnym nie zależą od liczby cząsteczek białka w komórce. Następnie, wykorzystując fakt, że średnie liczby cząsteczek mRNA i białka są znacznie większe od liczby kopii genu w komórce, przechodzi się do przybliżenia, w którym poziom mRNA oraz poziom białka stają się liczbami rzeczywistymi nieujemnymi. Obliczone w tym przypadku wariancje różnią się od odpowiednich wielkości w przypadku dyskretnym. Szkoda, że autorka nie zinterpretowała powyższych różnic. W celu dalszego uproszczenia analizy zakłada się, że tempo degradacji mRNA jest relatywnie duże, dokładniej, że średni czas życia cząsteczki mRNA jest o wiele krótszy niż średni czas przełączania genu. Pozwala to na zastąpienie 'liczby' molekuł mRNA przez ich asymptotyczną wartość odpowiadającą danemu stanowi genu. W tym przypadku opis rozważanego procesu Markowa

znacznie się upraszcza i w przypadku braku autoregulacji można znaleźć analityczną postać funkcji rozkładu dla N-diploidalnego genu z dowolnym N naturalnym. W Rozdziale 5 przedstawione są wyniki symulacji numerycznych pozwalających na znalezienie funkcji rozkładu w ogólnym przypadku. Rozdział ten zawiera szereg ciekawych rezultatów i analiz. Bardzo ciekawe jest zapostulowanie trzech wzorców aktywacji genu haplo-, di- i tetraploidalnego w wyniku stymulacji zewnętrznej bądź też w wyniku przyłączenia pewnych czynników transkrypcyjnych niezależnych od rozpatrywanego genu, oraz analiza obszarów istnienia tych wzorców w płaszczyźnie odpowiednich parametrów układu. Szczególnie ciekawe jest istnienie dobrze zdefiniowanych granic między poszczególnymi wzorcami (Rys. 5.9, 5.10, 5.11).

W Rozdziale 6 autorka zajmuje się konkretną ścieżką regulatorową i analizuje wpływ liczby kopii genów na dynamikę ścieżki sygnałowej tymocytu. Przedmiotem rozważań jest deterministyczna wersja modelu zaproponowanego w pracy [74] autorstwa Lipniackiego i innych. Układ ten składa się z 34 równań różniczkowych zwyczajnych. Autorkę interesuje wpływ obniżonej lub podwyższonej liczby kopii genów kodujących kinazy ZAP, MERK i ERK na aktywację komórki wywołanej aktywacją receptora antygenowego TCR. (Wyjściowa liczba kopii genów wynosi dwa. Z definicji komórka jest zaktywowana, jeśli stosunek liczby podwójnie sfosforylowanych kinaz typu ERK do całkowitej ich liczby jest większy niż $\frac{1}{2}$.) Wyniki symulacji numerycznych pokazane są na Rys. 6.5, 6.6, 6.7.

W Rozdziale 7 autorka dokonuje analizy modeli matematycznych opisujących sieci regulatorowe p53 oraz NF- κ B. p53 to jeden z najważniejszych czynników transkrypcyjnych związany ściśle z kontrolą cyklu komórkowego, naprawę uszkodzonego DNA oraz zapoczątkowaniem apoptozy. Zaburzenia w działaniu sieci regulatorowej p53 prowadzą najczęściej do rozwinięcia choroby nowotworowej. W swojej ocenie istniejących modeli sieci p53 autorka kierowała się kilkoma głównymi kryteriami eksperymentalnymi zamieszczonymi na str. 82. Jest to m.in. niezależność okresu niegasnących oscylacji poziomu p53 oraz Mdm2 od liczby kopii genów kodujących białka p53, Mdm2 i poziomu uszkodzenia łańcucha DNA. Przyjęte kryteria pozwoliły na ocenę przydatności szeregu klasycznych modeli sieci p53. Wśród analizowanych modeli znajdują się klasyczne modele grupy Tysona, model Batchelora, czy też model zaproponowany w pracy Puszyńskiego i innych. Przeprowadzona analiza doprowadza do stwierdzenia, że oscylacje odporne na zmianę liczby kopii genów mogą być generowane jedynie w wyniku nadkrytycznej bifurkacji Hopfa. Rozdział ten kończy się krótkim omówieniem najważniejszych rezultatów prac dotyczących czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, który związany jest ściśle z odpowiedzią immunologiczną komórki, w których doktorantka jest jednym ze współautorów.

Ocena uzyskanych rezultatów

Od dawna wiadomo, że liczba kopii genów może mieć istotny wpływ na przebieg procesów biochemicznych zachodzących w komórce, jednakże praca pani magister Hat-Plewińskiej analizuje zagadnienie wpływu ilości kopii genów na dynamikę sieci regulatorowych w komórce w sposób kompleksowy i systematyczny. Już samo sformułowanie zagadnienia ma charakter nowatorski. Co więcej, praca ta nie ogranicza się do wniosków jakościowych, ale ma bardziej zaawansowany charakter, pozwalający na formułowanie (w ramach rozpatrywanych modeli) szeregu twierdzeń ilościowych. Oczywiście, rezultaty odnoszące się do powyższego zagadnienia nie mogą mieć charakteru globalnego. Wpływ ilości kopii genu na zjawiska biochemiczne wewnątrz komórki analizowany jest zatem na przykładzie kilku wybranych sieci regulatorowych o podstawowym znaczeniu dla jej funkcjonowania. Sieci te są stosunkowo dobrze poznane, jednak wciąż kryją w sobie szereg tajemnic, dlatego też dla przeanalizowania wpływu ilości kopii genu, modele tych podstawowych ścieżek musiały być odpowiednio zmodyfikowane lub rozszerzone np. o efekty stochastyczne, czasem wręcz sformułowane od nowa. Rezultaty pracy mogą znaleźć szerokie zastosowanie praktyczne. Przede wszystkim mogą być punktem wyjścia do interpretacji i ilościowej analizy danych eksperymentalnych dotyczących układów regulatorowych w komórkach, w których liczba kopii genu odbiega od normalnej. Jest to sytuacja, z którą spotykamy się zarówno w przypadku komórek nowotworowych, jak i w przypadku pewnych chorób genetycznych. W chorobach tych dochodzi bądź to do redukcji, bądź do nadmiernego powielenia liczby kopii jakiegoś genu. Na przykład, interpretując odpowiednio dane doświadczalne możemy wnioskować o istnieniu bądź też nieistnieniu odpowiednich pętli sprzężenia zwrotnego.

Druga z prac będących podstawą rozprawy (B. Hat, K. Puszyński, T. Lipniacki, *Exploring mechanisms of oscillations in p53 and NF- κ B systems*, JET Sys. Biol. 2009) dotyczy ścieżek regulatorowych związanych bezpośrednio z mutacjami rakowymi. Oprócz nietrywialnej składowej analitycznej, prace te zawierają m.in. syntezę szerokiej klasy modelowania ścieżki regulatorowej białka p53 ich weryfikację w kontekście ich zgodności z danymi eksperymentalnymi, dokładniej niezależności okresu oscylacji koncentracji białka od liczby kopii genu. Świadczy to o tym, że doktorantka osiągnęła już duży stopień dojrzałości naukowej, pozwalający jej już na stawianie własnych hipotez w kontekście bardziej globalnego spojrzenia na badane zjawiska. Pracę tę, będącą osnową Rozdziału 7 rozprawy, uważam za najważniejszy rezultat dotychczasowej działalności naukowej magister Beaty Hat- Plewińskiej.

W zasadzie wszystkie rozdziały rozprawy zawierają rezultaty istotne z punktu widzenia modelowania sieci regulatorowych. Ich wartość opiera się zarówno na solidnych podstawach

biologicznych rozpatrywanych modeli, jak i na odwadze w formułowaniu hipotez. Rozprawa stanowi doskonały przykład zastosowania matematyki w zagadnieniach biologii i medycyny.

Z matematycznego punktu widzenia praca łączy w sobie teorię układów dynamicznych z elementami statystyki. Autorka wykazała się znajomością podstawowych pojęć z zakresu procesów stochastycznych oraz dużą sprawnością rachunkową, której dowodem jest zawartość Rozdziału 4. Opanowała teorię bifurkacji układów dynamicznych, w szczególności bifurkacji prowadzących do generacji rozwiązań oscylacyjnych. Chociaż numeryczne badanie zagadnień początkowych dla układów zwyczajnych równań różniczkowych jest już dzisiaj stosunkowo łatwe ze względu na dostępność wielu doskonałych pakietów obliczeniowych, pewne problemy, np. poszukiwanie orbit periodycznych poprzez dobór odpowiednich wartości w wielowymiarowej przestrzeni parametrów, wciąż są bardzo pracochłonne. Z problemem takim autorka miała m.in. do czynienia w Rozdziale 7 i uporała się z nim znakomicie. Świadczy to o dużej wyobraźni rachunkowej. Na koniec, a może przede wszystkim, należy podkreślić bardzo dobre przygotowanie w zakresie biologii, co w połączeniu z solidnością matematyczną oraz pracowitością zaowocowało bardzo dobrą rozprawą.

Konstrukcja pracy jest przejrzysta i dobrze przemyślana. Praca napisana jest jasnym i zrozumiałym językiem, z dużą dbałością o dokładność sformułowań. Pod tym względem pracę można uznać wręcz za wzorcową.

Uwagi krytyczne

Podrozdział 3.2.4

Do wyprowadzenia równań ciągłości dla funkcji gęstości prawdopodobieństwa g i h wkradło się szereg błędów i przeoczeń polegających na nieuzasadnionym wyłączeniu czynników przed znak całki oraz stosowaniu twierdzenia Gaussa-Ostrogradzkiego. Stwierdzenie

'Obszar całkowania zależy od czasu, stosujemy więc twierdzenie Gaussa-Ostrogradzkiego, zgodnie z którym wchodzimy z pochodną pod znak całki'

wydaje się zupełnie niezrozumiałe.

Należy jednak podkreślić, że wyprowadzenie to nie ma charakteru istotnego dla reszty rozprawy, gdyż zostało podane w jednej z wcześniejszych referencji ([15]).

Podrozdział 3.2.6 – przybliżenie K-E modelu ciągłego.

Autorka myli średni czas życia z szybkością degradacji oraz zakłada formalnie jedynie zwykłe nierówności między odpowiednimi wielkościami. Z reguły, stwierdzenie, że jakiś parametr jest mały w porównaniu z jakimś innym zapisuje się w postaci nierówności ' \ll '. Jeśli zdaniem

autorki, założenia nie wykorzystujące nierówności ' \ll ' są wystarczające do stosowania tego przybliżenia, to należy powiedzieć w jakim sensie. Ponieważ przybliżenie to jest podstawą rozważań Rozdziałów 4 i 5, powinno być lepiej uzasadnione.

Podrozdział 3.4

W podrozdziale tym twierdzi się, że obszary D_N są obszarami niezmienniczymi dla układu równań (61)-(62), lecz nie ma tutaj żadnego odniesienia się do Dodatku C. Nie ma też sformułowanego żadnego lematu. Dodatek C nosi natomiast tytuł *Dowód Lematu*. Lemat taki pojawia się dopiero w samym dodatku.

Podrozdział 6.2

Na str. 66 znajduje się stwierdzenie:

'jeśli w danym tymocycie

$$\text{ERK}_{pp} \max(\text{po czasie}) / \text{ERK}_{\{\text{total}\}} > 1/2$$

przyjmujemy, że aktywacja komórki jest stabilna.'

Powinno chyba być '...przyjmujemy, że komórka jest przejściowo aktywna'

Uwagi powyższe nie mogą jednak zmienić ogólnej pozytywnej oceny rozprawy.

Reasumując, **praca mgr Hat-Plewińskiej spełnia wszystkie wymagania Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym z dnia 14 marca 2003 i wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony.**

Warszawa, 28.09.2009



Dr hab. Bogdan Kaźmierczak