

Recenzja rozprawy doktorskiej Beaty Hat-Plewińskiej
"Wpływ ilości kopii genu na dynamikę sieci regulatorowych w komórce"

Obserwujemy ostatnio burzliwy rozwój metod ilościowych w naukach biologicznych. W szczególności niezwykle istotne stają się modele matematyczne pozwalające zrozumieć i przewidywać własności biochemicznych procesów na poziomie molekularnym. Jednym z podstawowych procesów zachodzących w komórce jest regulacja ekspresji genów. W klasycznej kinetyce chemicznej, ewolucja czasowa reagujących substancji modelowana jest za pomocą układu równań różniczkowych zwyczajnych opisujących zmiany stężenia substratów i produktów. Jednakże w odróżnieniu od procesów, którymi zajmuje się klasyczna kinetyka chemiczna, reakcje ekspresji genów mogą zachodzić w bardzo małych objętościach i uczestniczą w nich bardzo małe liczby cząsteczek. Konieczny staje się wtedy opis stochastyczny takich układów.

Rozprawa doktorska Beaty Hat-Plewińskiej poświęcona jest badaniom wpływu zmiany liczby kopii genów na jakościowe i ilościowe zachowanie różnych modeli sieci regulatorowych. W pierwszej części rozprawy rozpatrywany jest klasyczny stochastyczny model ekspresji genu z zewnętrzną regulacją i autoregulacją. Mamy tutaj do czynienia z procesem urodzin (transkrypcja i translacja) oraz śmierci (degradacja mRNA i białka) i przełączaniem genu między dwoma stanami: aktywnym i nieaktywnym.

W przypadku regulacji zewnętrznej można otrzymać analityczne wzory na wariancję białka w stanie stacjonarnym (Paszek 2007). Doktorantka wyprowadza te wzory w Dodatku A bez precyzyjnego powołania się na wcześniejszą pracę. Następnie zakłada, że ilości cząsteczek biorących udział w procesach są na tyle duże, że jedyne istotne fluktuacje stochastyczne są wynikiem przełączania genu (tak zwany model ciągły). Jest to podejście zaproponowane w (Lipniacki i inni 2006). Odpowiednie wzory dla wariancji białka zawarte są w pracy Paszka i w Dodatku A. Rozumiem, że wzory te nie stanowią oryginalnego wkładu rozprawy ale należałoby to jasno napisać. Istotnym, oryginalnym i niezwykle ciekawym wkładem doktorantki jest analiza wpływu liczby kopii genu na postać rozkładu stacjonarnego, a w szczególności na wariancję liczby cząsteczek białka. Doktorantka przeprowadza obliczenia analityczne i numeryczne dla modelu ciągłego z autoregulacją w przybliżeniu Keplera-Elstona (białko produkowane bezpośrednio z genu). Dla modelu z jedną kopią genu wyprowadza wzór na rozkład stacjonarny. Jest to możliwe dzięki istnieniu całki pierwszej układu dwóch liniowych równań różniczkowych zwyczajnych ze zmiennymi współczynnikami. Czuję tutaj pewien matematyczny niedosyt. Można by zadać pytanie dlaczego dla rozpatrywanych przez doktorantkę genów diploidalnych i tetraploidalnych nie można wyprowadzić w podobny sposób wzorów przynajmniej na wariancję. Należałoby się też w tym miejscu rozprawy odnieść do pracy (Self-regulating gene: An exact solution", Hornos i inni, Phys. Rev. E72, 051907, 2005). Wyprowadzona tam została funkcja rozkładu dla pełnego modelu stochastycznego dla pewnej klasy autoregulacji.

W rozprawie zaprezentowane zostały wyniki numeryczne dla genów haploidalnych, diploidalnych i tetraploidalnych (dla układów bez regulacji i dla genów haploidalnych z autoregulacją mamy wzory analityczne wyprowadzone zresztą przez doktorantkę więc wyniki numeryczne są chyba tylko testem metody i szkoda, że nie ma komentarza jak ten test wypadł). Jest to niezwykle interesująca i najlepiej napisana (dla matematyka) część rozprawy. Dla dodatniego sprzężenia zwrotnego pojawiają się trzy wzorce aktywacji (prosty, bimodalny i unimodalny). Dla równoczesnej aktywacji genu haplo-, diplo- i tetraploidalnego występuje dziewięć wzorców. Doktorantka przeprowadza szczegółową analizę wzorców i omawia konsekwencje braku jednej kopii genu lub duplikacji genu. Są to niezwykle ważne wyniki. Przykładowo, strata genu może zatrzymać ciągłą aktywację genu a duplikacja może zniszczyć przełącznikowe działanie genu co może prowadzić do różnych chorób. Doktorantka wykazuje również, że strata jednej kopii genu w

układach z autoregulacją nie może być zrekompensowana przez podwojoną ekspresję pozostałej kopii genu jak to ma miejsce w układach bez autoregulacji.

W drugiej części pracy doktorantka bada wpływ liczby kopii genów na dynamikę ścieżki sygnałowej tymocytu. System sygnałowy jest modelowany przez układ 37 równań różniczkowych zwyczajnych opisujących ewolucję poziomu różnych białek. Równania te (i niestety pewne oznaczenia i stałe) nie zostały zaprezentowane w rozprawie, można je zobaczyć w pracy (Hat i inni 2008). Omówione natomiast zostały wyniki numerycznych rozwiązań.

W trzeciej części pracy doktorantka analizuje wpływ liczby kopii genów na dynamikę sieci regulatorowych czynników transkrypcyjnych p53 i NF- κ B. Doświadczenia przeprowadzone na pojedynczych komórkach pokazują, że czynniki te generują niegasnące oscylacje o okresie niewrażliwym na poziom stymulacji. Doktorantka proponuje nową metodę walidacji modeli ścieżek regulatorowych opierającą się na analizie wrażliwości okresu oscylacji na zmieniającą się liczbę kopii genów oraz na poziom stymulacji. Pokazała, że modele opierające się na nadkrytycznej bifurkacji Hopfa generują oscylacje o okresie odpornym na zmianę intensywności degradacji i liczby kopii genu, w przeciwieństwie do modeli z bifurkacją podkrytyczną Hopfa. Ta część pracy prezentuje numeryczne rozwiązania równań, których nie widzimy. Zdaję sobie sprawę, że jest ich znowu bardzo dużo ale chyba dobrze byłoby zobaczyć jakiego rodzaju są to równania i gdzie są te sprzężenia zwrotne i opóźnienia czasowe (nawiasem pisząc nie zauważyłem w rozprawie obecności równań różniczkowych z opóźnieniem), które generują oscylacje.

Formalny układ rozprawy jest bardzo dobry. Jej duża część zawiera elementarne wprowadzenie do biologii i procesów biochemicznych co jest bardzo ważne w pracach interdyscyplinarnych. Cytowana literatura jest obszerna lecz jest trochę uchybień: pozycje 13 i 14 są takie same jak pozycje 44 i 57, cytowanie na str. 33 jest ze znakiem zapytania.

Pomimo powyższych krytycznych uwag, moja ogólna ocena pracy jest bardzo dobra. Rozprawa Beaty Hat-Plewińskiej jest przykładem bardzo dobrej pracy interdyscyplinarnej z zastosowań matematyki i metod numerycznych w biologii. Zawiera bardzo ważne wyniki.

Rozprawa spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim. Rekomenduję dopuszczenie Beaty Hat-Plewińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

dr hab. Jacek Miękiś,
Instytut Matematyki Stosowanej i Mechaniki
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 25 września 2009