

Kraków, 21.03.2024 r.



OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
PANI MGR INŻ. ALEKSANDRY CABAJ ZATYTUŁOWANEJ
„Modeling the impact of Hypoxia Inducible Factors binding
on gene expression in human endothelial cells during hypoxia”

Regulacja ekspresji genów przez czynniki transkrypcyjne z rodziny HIF stanowi przykład adaptacji komórek do niekorzystnej sytuacji obniżonego stężenia tlenu. Jak ważne są to zagadnienia może wskazywać fakt, że w 2019 roku, za badania nad poznaniem mechanizmów kontrolujących odpowiedź komórek na zmieniający się poziom tlenu, Szwedzka Akademia Nauk (Komitet Noblowski) uhonorowała 3 wybitnych badaczy (William G. Kaelin Jr., Sir Peter J. Ratcliffe i Gregg L. Semenza) Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii. Temat ten zainteresował również Panią mgr inż. Aleksandrę Cabaj, która za cel swojej pracy doktorskiej postawiła opracowanie modelu opisującego regulację odpowiedzi genów docelowych na niedotlenienie (hipoksję). Wykorzystując techniki modelowania molekularnego, które obecnie są istotnym narzędziem badawczym, komplementarnym do badań doświadczalnych, skupiła się na badaniu mechanizmów aktywacji czynników HIF1 i HIF2 oraz konsekwencji wiązania tych czynników do tzw. sekwencji HRE obecnej w wielu genach docelowych, regulowanych przez hipoksję. Doktorantka swoje badania zrealizowała w Pracowni Bioinformatyki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk pod opieką Pana prof. dr hab. Michała Dąbrowskiego (promotor) i Pani dr Agaty Charzyńskiej (promotor pomocniczy).

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii
Zakład Biotechnologii
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

Formalny opis rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska ma klasyczny układ i jest napisana w języku angielskim. Tytuł pracy pokrywa się z treściami rozprawy. Pracę otwierają Streszczenia w języku polskim i angielskim, dalej zawarto Wykaz skrótów, a kolejnym rozdziałem jest Wstęp, dobrze wprowadzający w temat badawczy. Po przedstawieniu Celu pracy, Doktorantka skupiła się na zwięzłym opisanu metod badawczych, by w końcu zaprezentować uzyskane w pracy Wyniki. Końcowe rozdziały to krótka, ale rzeczowa Dyskusja, podsumowana oddzielnym rozdziałem zatytułowanym Summary and conclusions. Ważne informacje zawarto również w rozdziałach 7-9, informujących o źródłach finansowania badań, współudziale innych osób w badania przedstawione

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6412
fax. +48 12 664 6918
agnieszka.loboda@uj.edu.pl
<http://biotcka.moi.uj.edu.pl/zbm>

w dysertacji oraz zgodach na wykorzystanie w pracy rysunków z opublikowanych prac. Bibliografia liczy 132 pozycje, jest odpowiednio sformatowana i umożliwia łatwe odszukanie cytowanych publikacji w zasobach internetowych.

Rozprawa jest dobrze zredagowana, błędy językowe (interpunkcyjne, literowe) są nieliczne (np. str. 7 – hypoxia-resposive zamiast responsive; str. 14 – niepoprawna interpunkcja/składnia zdania: „*This results in a transition from HIF1 to HIF2 specific effects is called the HIF switch*”). Te i inne drobne nieścisłości nie wpływają na wysoką ocenę opracowania językowego pracy.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa doktorska jest dobrze przemyślanym i opracowanym zestawieniem aktualnej wiedzy dotyczącej odpowiedzi komórkowej na niedotlenienie. **Wstęp** zajmuje 13 stron, jest zilustrowany 2 czytelnymi rycinami, trafnie obrazującymi zawarte w tej części treści. Doktorantka krótko scharakteryzowała czynniki transkrypcyjne z rodziny HIF, skupiając się na opisie ich regulacji transkrypcyjnej. Główny nacisk we wstępie położono na opis procesu modelowania molekularnego, przedstawiając różne podejścia i strategie tego narzędzia badawczego, uzupełniającego badania doświadczalne.

Wstęp dobrze wprowadza czytelnika do dalszych części rozprawy. Do tej części pracy mam jedynie drobne uwagi. Opisując (str. 15-16) główne geny regulowane przez czynniki HIF1 i HIF2, Doktorantka nie wspomniała o genach związanych z macierzystością komórek (np. Oct4). Zastanawia mnie to, że w Streszczeniu, które ma krótko wprowadzić w temat pracy i równocześnie stanowić podsumowanie uzyskanych wyników, Doktorantka przedstawia czynnik HIF3, o którym nie wspomina w dalszych rozdziałach – ani we Wstępie, ani w Wynikach. Pani mgr inż. Cabaj pisze, że HIF3A odpowiada, podobnie jak HIF2A, za adaptację do długotrwałego niedotlenienia (w przeciwieństwie do HIF1A, regulującego wczesną odpowiedź na hipoksję). Skoro czynnik HIF3A (tak mało wciąż poznany) pełni (przynajmniej w niektórych komórkach/modelach) funkcje podobne do czynnika HIF2, dlaczego nie włączono go do analiz?

W swoich badaniach, Pani mgr inż. Cabaj sformułowała 3 szczegółowe **cele badawcze**, które tworzyły główny cel projektu, tj. modelowanie aktywności czynników transkrypcyjnych HIF1 i HIF2 oraz powiązanie ich z aktywacją transkrypcyjną genów reagujących na hipoksję. Cel badań został zrealizowany i opisany w dalszych częściach pracy. Wcześniej jednak Doktorantka zawarła rozdział **Materiały i metody**. Jest to dość obszerny rozdział, podzielony na 4 podrozdziały, w których przedstawiono nie tylko metody, wykorzystane podczas realizacji pracy doktorskiej, ale również prace innych



Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii
Zakład Biotechnologii
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6412
fax. +48 12 664 6918
agnieszka.loboda@uj.edu.pl
<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>

osób (wraz z wynikami), które stanowiły niejako podstawę do przeprowadzenia/porównania analiz modelowania z danymi *stricte* biologicznymi. Jak podkreślono w opisie metod a także w rozdziale 8, badania obejmujące analizę mikromacierzy, PCR w czasie rzeczywistym, Western blot i obliczenia densytometryczne, opisane w rozdziałach 3.4.1, 3.4.2 i 3.4.3, zostały wykonane przez zespół Prof. Rafała Bartoszewskiego z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, przede wszystkim dr Adrianę Moszyńską. Nie jest to zbyt częste, aby w rozdziale opisującym zastosowane techniki przedstawiać wyniki opublikowane w pracach, zastanawiam się czy jednak nie lepsze byłoby włączyć je do sekcji Wyniki.

Oceniany rozdział jest w większości wyczerpujący, choć w opisie niektórych metod nie podano szczegółów eksperymentalnych, np. procesu transfekcji siRNA. Doktorantka odsyła czytelnika do opublikowanej pracy (Cabaj, A.; Moszyńska, A.; Charzyńska, A.; Bartoszewski, R.; Dąbrowski, M. *Functional and HRE Motifs Count Analysis of Induction of Selected Hypoxia-Responsive Genes by HIF-1 and HIF-2 in Human Umbilical Endothelial Cells. Cell. Signal.* 2022, 90, 110209. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110209>), w której faktycznie te dane (np. stężenie siRNA, czas transfekcji) są podane.

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

Po lekturze tej części pracy nasunęły mi się następujące pytania:

1. Zastanawia mnie wartość stężenia tlenu stosowanego jako wartości normoksyjne tj. 18,5%. Autorka w dysertacji nie komentuje wyboru takich wartości jako normoksji, ale w cytowanej powyżej pracy odnosi się do publikacji Wenger et al. (2015) zatytułowanej „*Frequently asked questions in hypoxia research*”, którą z ciekawością przeczytałam i zapoznałam się z informacjami dotyczącymi m.in. szacowania poziomu tlenu w inkubatorze. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę faktyczne stężenie tlenu, z jakim mają kontakt komórki śródbłonna w naczyniach krwionośnych (~12% wg danych literaturowych) wartość ta nie odzwierciedla w pełni poziomu tlenu *in vivo*. Chętnie dowiem się jakie jest zdanie Doktorantki na temat ustalania warunków normoksji w badaniach *in vitro*.
2. Proszę o wyjaśnienie co jest przedstawione w tabeli 1, str. 36. podsumowującej wynik ELISY HIF1 i HIF2. Jak rozumiem, abs1 i abs2 to wyniki absorbancji dla dwóch próbek (komórek) hodowanych w warunkach normoksji lub hipoksji w danym punkcie czasowym. Co oznaczają wartości w rubryce zatytułowanej OD450? Ponadto, dlaczego w tabeli przedstawiono tylko wyznaczone stężenia, bez odchyłeń standardowych dla każdego z warunków?

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotcka.moi.uj.edu.pl/zbm>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>

Opis sekcji **Wyniki** jest dokładny. Pani mgr inż. Cabaj w logiczny sposób przedstawia rezultaty kolejnych doświadczeń, wskazując na potrzebę przeprowadzenia następnych analiz.

Już pierwsze dane, zaprezentowane na stronie 39 (Rycina 6) są ciekawe i skłaniają do podjęcia dyskusji z Doktorantką. Czy uzyskany wynik, tj., tylko 7 genów, których ekspresja zwiększała się po 2h niedotlenienia, w porównaniu do 72 i 280 po 8h i 16h był spodziewanym wynikiem?

Kolejno zaprezentowano wyniki uzyskane dzięki doświadczeniom wykonanym na komórkach z wyciszoną ekspresją HIF1 i HIF2. Przedstawiono rezultaty analiz PCR w czasie rzeczywistym oraz Western blot wskazujące na wydajną transfekcję oraz wyciszenie ekspresji obu czynników oraz wpływ tego wyciszenia na ekspresję genów. Jak już wspomniano wcześniej, analizy te przeprowadziła dr Moszyńska a nie Doktorantka. Osiągnięciem Pani mgr inż. Cabaj było określenie związku między liczbą motywów HRE w promotorach genów docelowych, a ich reakcją na wyciszenie każdego z badanych czynników transkrypcyjnych. Doktorantka wykazała, że wpływ HIF1 na indukcję ekspresji genów w warunkach niedotlenienia jest proporcjonalny do liczby motywów HRE w obszarach otwartej chromatyny w promotorach genów odpowiadających na niedotlenienie. To bardzo istotne wyniki – na ich podstawie Pani mgr inż. Cabaj zaproponowała mechanizm, w którym większa liczba motywów HRE dla HIF1 zwiększa szansę na wiązanie HIF1, co przyczynia się do zwiększonej aktywacji genów docelowych dla HIF1. Doktorantka wykazała również, że geny posiadające w swoich promotorach miejsce wiązania dla HIF1 zidentyfikowane metodą ChIPseq zawierają więcej motywów dla HIF1, niż geny nieposiadające w swoich promotorach miejsc wiązania dla HIF1, co ma duże znaczenie dla lepszego zrozumienia zagadnienia regulacji ekspresji genów w warunkach obniżonego poziomu tlenu.

Kolejną częścią pracy jest **Dyskusja**, prawidłowo opisująca wyniki przeprowadzonych analiz i kolejnych etapów modelowania, prowadzącego do opracowania finalnego modelu opisującego regulację odpowiedzi genów docelowych na niedotlenienie, opartego o równania różniczkowe zwyczajne, zawierające zarówno HIF1 jak i HIF2. Pani mgr inż. Cabaj wskazała, że dla przełączenia regulacji ekspresji genów z HIF1 na HIF2 istotna jest resztkowa aktywność hydroksylazy prolinowej 2 (PHD2) w hipoksji a dla właściwego działania badanego systemu niezbędny jest nadmiar podjednostki HIF1B. Analiza Dyskusji wskazuje, że Doktorantka świetnie orientuje się w zagadnieniach modelowania molekularnego oraz regulacji ekspresji genów przez

niedotlenienie. Z ciekawości chciałam dopytać, czy możliwe jest modelowanie wpływu mikroRNA, ważnych regulatorów aktywności czynników HIF na przełączenie HIF?

Końcowe **Podsumowanie i konkluzje** dobrze przedstawia najważniejsze wnioski i jest dobrym zakończeniem ocenianej dysertacji.

Podsumowanie

Stwierdzam, iż uzyskane przez Panią mgr inż. Aleksandrę Cabaj wyniki poszerzają wiedzę na temat roli czynników HIF w odpowiedzi komórek na niedotlenienie i stanowią oryginalne rozwiązanie badanego zagadnienia. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną i praktycznymi zdolnościami w zakresie analiz bioinformatycznych/modelowania molekularnego. Co istotne, Pani mgr inż. Aleksandra Cabaj wyniki zrealizowane w ramach pracy doktorskiej opublikowała w postaci trzech oryginalnych prac naukowych (w pracy z 2021 roku opublikowanej w czasopiśmie *Cellular Signaling* jest pierwszym autorem, druga praca została opublikowana w roku 2019 w *FASEB J*, a kolejna w *Cellular and Molecular Biology Letters* w roku 2022). Zgodnie z danymi przedstawionymi w ostatnim rozdziale dysertacji, Doktorantka jest współautorem 10 prac i choć w większości z nich nie występuje na czołowej pozycji wśród autorów, dorobek ten należy uznać za bardzo dobry.

Potwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Cabaj do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Biorąc pod uwagę wysoki poziom rozprawy, fakt opublikowania wyników badań w dobrych, recenzowanych czasopismach i pierwsze autorstwa Doktorantki w jednej z prac, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Z wyrazami szacunku,

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda



Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>

Kraków, 11 kwietnia 2024 roku

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Cabaj zatytułowanej „Modelling the impact of Hypoxia Inducible Factors binding on gene expression in human endothelial cells during hypoxia”, przygotowanej pod opieką promotora dr hab. Michała Dąbrowskiego, prof. Instytutu Nenckiego PAN oraz promotora pomocnicznego dr Agaty Charzyńskiej w Pracowni Bioinformatyki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk.

Rozprawa doktorska Pani Aleksandry Cabaj przedstawia badania nad molekularnymi mechanizmami regulacji odpowiedzi komórek na niedotlenienie na poziomie ekspresji genów. W pracy przedstawiono sposoby działania wybranych czynników transkrypcyjnych o aktywności indukowanej hipoksją, których rola polega na przygotowaniu komórek do warunków obniżonej dostępności tlenu. Doktorantka opracowała matematyczne modele opisujące działanie poszczególnych czynników, z uwzględnieniem występowania motywów w obszarach promotorowych oraz dynamiki ekspresji genów docelowych. Należy stwierdzić, że podjęta w rozprawie tematyka badań jest ważna i ma istotny wpływ na stan wiedzy o mechanizmach kontroli ekspresji genów. Wykorzystanie narzędzi matematycznych do rozwiązywania problemów biologicznych to zadanie trudne, ale mające rosnący potencjał odkrywczy w erze tworzenia banków metadanych genomowych i rozwoju biotechnologii cyfrowych.

Przedstawiona do oceny rozprawa jest napisana w języku angielskim, posiada 116 stron i ma klasyczny układ, w tym wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cele, metody, wyniki, dyskusja oraz liczące 132 pozycje piśmiennictwo. Praca przygotowana jest starannie, nie stwierdziłem błędów redakcyjnych utrudniających zrozumienie treści i jej przekazu.

Wstęp rozprawy jest krótki i liczy 16 stron. Rozpoczyna się od wprowadzenia podstaw stanu wiedzy dotyczącej molekularnej odpowiedzi na niedotlenienie i ilustrowany jest dobrze dobranymi rycinami przygotowanymi przez doktorantkę lub zapożyczonymi z literatury przedmiotu. Wprowadzenie zawiera opis roli czynników białkowych HIF w procesach aktywacji genów zachodzących w odpowiedzi na obniżenie w komórce poziomu tlenu. Druga część wstępu skupiona jest na mechanizmach regulacji transkrypcji genów, w szczególności cechach czynników transkrypcyjnych oraz motywów sekwencji DNA wiążących je. Trzecią część stanowi omówienie założeń i metod modelowania systemów biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem podejść wykorzystywanych w obszarze regulacji ekspresji genów. Ogólnie, wstęp robi dobre wrażenie i pokazuje wiedzę doktorantki w zakresie prowadzonych badań. Chociaż temat specyficzności komórkowej mechanizmów odpowiedzi na niedotlenienie powinien być w mojej ocenie szerzej omówiony. Brakuje też przedstawienia kontekstu prac badawczych oraz wyznaczenia kierunków poszukiwania znaczenia uzyskanych wyników. Osobiście chciałbym dowiedzieć się więcej o mechanizmach regulacji tak ważnej fizjologicznie reakcji organizmu w kontekście ewolucji poszczególnych elementów systemu kontroli genów oraz fenotypowych czy klinicznych konsekwencjach ich genetycznego zróżnicowania. Cytowane piśmiennictwo jest odpowiednie, jednak uważam, że warto było wskazać więcej najnowszych prac.

Jako główny cel pracy wskazane jest zbadanie funkcji czynników transkrypcyjnych HIF1 i HIF2 oraz ich powiązanie z aktywacją ekspresji genów odpowiedzi komórkowej na niedotlenienie. Cele szczegółowe odzwierciedlają plan wykonanych badań i wskazują na analizę cech poszczególnych motywów HRE, identyfikacji genów o ekspresji zależnej od białek HIF oraz opracowaniu wieloczynnikowego modelu działania ścieżek sygnałowych aktywowanych w odpowiedzi na niedotlenienie. Cele pracy postawione są w sposób eksploracyjny.

Materiały, metody i źródła danych opisane zostały na 10 stronach rozprawy. Zastosowane techniki badawcze wykazują duże zróżnicowanie. W pracy znalazły się wyniki uzyskane przy pomocy połączenia metod analiz sekwencji promotorowych *in silico*, hodowli komórkowych, analizy poziomów abundancji transkryptów i białek, analizy danych ChIP-seq oraz modelowania zjawisk biologicznych. Z uwagi na obliczeniowy charakter badań doktorantki, prace laboratoryjne z wykorzystaniem modeli komórkowych były prowadzone we współpracy. Stosowne informacje o udziale współpracowników w poszczególnych aspektach badań znalazły się na 95

stronie rozprawy. W przedmiotowych badaniach szczególnie ważne są założenia dotyczące pomiarów zmian poziomów abundancji transkryptów i białek. Dlatego, wybór metod przeliczeń ilościowych oraz normalizacji odczytów sygnału (w tym czynników i punktów referencyjnych) powinien zostać lepiej uzasadniony. W opisie analizy danych mikromacierzowych brak jest informacji, w jaki sposób szacowano poziom wiarygodności uzyskanych wyników. Należy przy tym stwierdzić, że wskazane niejasności w opisie metodyki nie mają znaczenia dla wyników przeprowadzonej analizy danych. W końcowej części rozdział ten zawiera informacje o rodzaju danych eksperymentalnych oraz metodach matematycznych zastosowanych do modelowania badanego zjawiska i testowania modelu opartego o równania różniczkowe zwyczajne.

Opis wyników stanowi najobszerniejszy rozdział rozprawy, liczy on 45 stron. Wyniki rozpoczyna opis doświadczeń, w ramach których charakteryzowane były motywy HRE przy wykorzystaniu linii komórkowej ludzkiego śródbłona żyły pępowinowej poddanych niedotlenieniu. Przedstawione zostały wyniki analizy profilowania ekspresji genów w trzech okresach czasu ekspozycji (2, 8 i 16 godzin niedotlenienia). Odczyty poziomów abundancji genów w kilku punktach czasowych pozwoliły na obserwację przebiegu zmian i kumulacji efektów na poziomie molekularnym. Doktorantka zaobserwowała różnice we właściwościach elementów regulatorowych HRE wiążących czynniki transkrypcyjne HIF1 i HIF2. Scharakteryzowane zostały miejsca ich występowania w regionach otwartej chromatyny, związek z czasem aktywacji danego genu, rozkład przestrzenny oraz lokalizacja. Dalej prezentowane są wyniki doświadczeń w modelu *in vitro*, w którym badano wpływ wyciszenia czynników HIF1A i HIF2A (EPAS1) na ekspresję wybranego zestawu genów aktywowanych w odpowiedzi na niedotlenienie. Wyjątkowo interesujące są wyniki porównania profili zmian transkrypcyjnych obserwowanych w kolejnych punktach czasowych. Uzyskane dane potwierdzają występowanie podziału ról badanych czynników transkrypcyjnych HIF1 i HIF2 w kolejnych fazach odpowiedzi komórek. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazały na liniową zależność pomiędzy liczbą motywów HRE w regionach promotorowych genów docelowych oraz wpływem HIF1 na ich aktywację. Doktorantka dzieli mechanizmy regulacji ekspresji genów pod względem czasu indukcji na wczesne powiązane z aktywnością HIF1 oraz późne zależne od HIF2. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić jakie rodzaje i ilości motywów HRE są związane z aktywacją danej grupy genów. W tym punkcie należy zastanowić się, czy analizie faktycznie poddawana jest wczesna i późna odpowiedź, czy raczej porównywane są molekularne efekty krótkiego i długiego niedotlenienia. Prezentowane wyniki nie są niestety bezpośrednio lub pośrednio związane z efektami

fizjologicznymi zachodzącymi w badanym układzie eksperymentalnym, co ogranicza możliwość interpretacji obserwowanych procesów regulacyjnych. Kolejny punkt wyników stanowi omówienie procesu tworzenia i optymalizacji modelu opisującego proces regulacji genów aktywowanych w warunkach niedotlenienia. W opracowanym modelu matematycznym uwzględniono udział zarówno HIF1 jak i HIF2. Na kolejnych etapach model był optymalizowany przy wykorzystaniu danych eksperymentalnych. Wyniki zamyka opis doświadczeń dopasowywania modelu do wzorów transkrypcji trzech zestawów genów o ekspresji aktywowanej w warunkach niedotlenienia. W pracy omówione zostały zdolności predykcyjne modelu regulacji transkrypcji poszczególnych genów z wybranej grupy. Wyniki są ułożone logicznie i zwięźle opisane. Zasadniczo zamieszczone w rozprawie ryciny są przejrzyste, zawierają odpowiednio przygotowane opisy osi i legendy. Jednak w przypadku rozbudowanych schematów działania modelu (np. Ryciny 17, 20 i 31) pomocne byłyby precyzyjne opisy prezentowanych na nich wyników.

Dyskusja rozpoczyna się od ogólnej konkluzji o preferencji czynników HIF1 i HIF2 do właściwych im motywom sekwencji DNA oraz wcześniejszym zaangażowaniu HIF1. Zawartość miejsc wiązania motywów HRE charakterystycznych dla HIF1 jest bezpośrednio powiązana z transkrypcją genów indukowanych niedotlenieniem. Doktorantka słusznie zauważa ograniczenia w możliwości poznania zasad działania czynnika HIF2, wynikające z występowania miejsc jego wiązania tego białka w oddalonych od promotorów genów regionach DNA nieobjętych prezentowaną analizą oraz interakcji z innymi czynnikami. W tym punkcie dyskusji brakuje mi szerszego omówienia, w jaki sposób dodatkowe czynniki i zmiany warunków mogą być zaangażowane w proces regulacji. Takie przykłady powinny lepiej zobrazować poziom złożoności badanego układu fizjologicznego i uwidocznić trudności jego matematycznego modelowania. Zastrzeżenia wzbudza też przejrzystość schematu podsumowującego zaproponowany mechanizm regulacji (Rycina 40). Zrozumienie umiejscowienia prezentowanych w rozprawie wyników w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy wymaga dogłębnego przestudiowania opisu. W części dyskusji poświęconej modelowaniu zjawiska regulacji transkrypcji doktorantka uzasadnia wybór zastosowanego podejścia metodycznego oraz wskazuje kierunki jego poprawy. Ważnym elementem rozprawy jest omówienie wniosków z prób przewidywania profili ekspresji genów z wykorzystaniem opracowanego modelu. Uzyskane wyniki potwierdzają, że największe możliwości predykcyjne zostały osiągnięte w przypadku genów zależnych od aktywności czynnika HIF1. Dyskusja została przeprowadzona prawidłowo. Należy jednak stwierdzić, że stosunkowo duży nacisk został w niej

postawiony na kwestie metodyczne, a w mniejszym stopniu omawiany jest kontekst literaturowy. Bez względu na wymienione zastrzeżenia, uważam, że wyniki są zinterpretowane poprawnie i są w pełnej zgodzie z wnioskami pracy.

W podsumowaniu rozprawy podkreślone zostały najważniejsze odkrycia wynikające z przeprowadzonych badań. Doktorantka wskazała jako szczególnie istotne stwierdzenie liniowej zależności pomiędzy liczbą motywów HRE przyporządkowanych do czynnika HIF1 występujących w obszarach genów oraz ich aktywnością transkrypcyjną w odpowiedzi na niedotlenienie. Główny rezultat pracy stanowi matematyczny model sygnalizacji molekularnej oraz regulacji ekspresji genów uwzględniający udział dwóch czynników transkrypcyjnych. Analiza działania modelu w warunkach dalszego obniżenia stężenia tlenu pozwoliła na opracowanie hipotezy, że resztkowa aktywność hydroksylaz prolinowych odgrywa istotną rolę w zmianie wiodącego czynnika transkrypcyjnego z HIF1 na HIF2. Na podstawie wyników przeprowadzonych symulacji wywnioskowano, że właściwe działanie systemu regulacji transkrypcji genów wymaga nadmiaru podjednostki HIF1B. Co ważne, wniosek ten został już potwierdzony w wynikach badań innych autorów.

W odpowiedzi na recenzję prosiłbym o odniesienie się do kilku kwestii związanych z zaprezentowanymi wynikami i dyskusją:

- Czy w przestrzeni naukowej dostępne są zbiory danych pozwalające na weryfikację uzyskanych wyników i rozbudowę opracowanego modelu? Czy w modelu można uwzględnić różne czasy półtrwania transkryptów ulegających ekspresji?
- Czy cechy i właściwości opracowanego modelu regulacji genów w komórkach ludzkich mogą być porównane do innych tego typu narzędzi omawianych w literaturze? Czy sposób opracowania modelu można przełożyć na inne układy regulacyjne?
- W rozprawie został wspomniany czynnik HIF3A jako zaangażowany w odpowiedź na długotrwałe niedotlenienie. Czy wiadomo, w jaki sposób uzupełnia on przebieg czasowy odpowiedzi w następstwie działania czynników HIF1 i HIF2?
- Co wiadomo o zróżnicowaniu molekularnej odpowiedzi na niedotlenienie pomiędzy typami tkanek i komórek? Czy układ czynników i profil regulowanych genów powiązany jest z cechami fizjologicznymi komórek i pełnionymi rolami?



- Czy z uzyskanych wyników można wyciągnąć wnioski dotyczące przebiegu zmian fizjologicznych zachodzących w układzie? Czy wyniki badań mogą przyczynić się do postępu nauk biomedycznych?

Podsumowując, chciałbym stwierdzić, że przedstawione w rozprawie przez Panią mgr inż. Aleksandrę Cabaj wyniki są znaczącym wkładem w badania mechanizmów regulacji transkrypcji genów

Doktorantka jest współautorką trzech opublikowanych prac naukowych (w tym jednej jest pierwszym autorstwem), które opisują część wyników zaprezentowanych w rozprawie.

Praca doktorska prezentuje ogólną i szeroką wiedzę teoretyczną Pani mgr inż. Aleksandry Cabaj oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i tu chciałbym dodać, że duże wrażenie robi zdolność do skutecznego zastosowania narzędzi matematycznych do modelowania złożonego zjawiska biologicznego.

Stąd też z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Cabaj spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.).

Zwracam się z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Cabaj do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z poważaniem,

dr hab. Michał Korostyński
Kierownik Pracowni Farmakogenomiki
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk
Smętna 12, 31-343 Kraków,
tel.: 696 622 014, e-mail: michkor@if-pan.krakow.pl

Gliwice, 9 kwietnia 2024

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Aleksandry Cabaj pt. *Modelling the impact of Hypoxia Inducible factors binding on gene expression in human endothelial cells during hypoxia*

Promotor: dr hab. Michał Dąbrowski, profesor Instytutu Nenckiego PAN

Promotor pomocniczy: Dr Agata Charzyńska

1. Problem naukowy rozpatrywany w pracy.

Poznanie mechanizmów regulujących komórkowe odpowiedzi na różne czynniki stresu jest kluczowe dla zrozumienia procesów prowadzących do różnych chorób a tym samym również dla projektowania leków czy protokołów terapii. Pomimo olbrzymich postępów w tej dziedzinie, nadal wiele mechanizmów zostało poznanych jedynie w ogólnym zarysie, a dla wielu procesów znamy jedynie końcowe efekty ich działania. Mechanizmy regulujące komórkową odpowiedź na niedotlenienie należą do tej właśnie grupy. Należy więc stwierdzić, że rozpatrywane w rozprawie zagadnienia są aktualne i dobrze wpisują się w nurt obecnie prowadzonych prac naukowych. Tematyka rozprawy idealnie wpasowuje się w dyscyplinę nauk biologicznych.

Przedmiotem rozprawy jest analiza wpływu czynników transkrypcyjnych HIF1 i HIF2 na ekspresję genów indukowaną niedotlenieniem, próba odpowiedzi na pytanie, z czego wynika zmiana wiodącego czynnika transkrypcyjnego z HIF1 na HIF2 w dłuższym horyzoncie czasowym odpowiedzi, nazywana w pracy przełącznikiem („switch”), obserwowana w warunkach eksperymentalnych, oraz opracowanie modelu matematycznego, który pozwoliłby na przewidywanie odpowiedzi komórek na niedotlenienie w różnych protokołach eksperymentalnych. Doktorantka proponuje wykorzystanie analiz bioinformatycznych (poszukiwanie miejsc wiązania czynników), eksperymentów biologicznych (pomiar ekspresji genów indukowanych niedotlenieniem w tym w komórkach z wprowadzonym siRNA, wyciszającym czynniki HIF1 i HIF2) oraz wykorzystanie modeli w postaci układów równań różniczkowych zwyczajnych i ich analizę wrażliwością w celu rozwiązania tak postawionego problemu naukowego.

W rozprawie postawiono trzy, ściśle powiązane ze sobą, cele badawcze:

1. Określenie funkcjonalnej charakterystyki motywów HRE pod kątem preferencyjnego wiązania do nich czynników HIF1 i HIF2.
2. Sprawdzenie zależności pomiędzy liczbą motywów HRE a poziomem ekspresji genów.
3. Opracowanie modelu matematycznego opisującego dynamikę odpowiedzi na niedotlenienie związanej z czynnikami HIF1 i HIF2.

Wszystkie trzy cele można uznać za osiągnięte. Co prawda, niektóre wnioski przedstawione w rozprawie wydają się dyskusyjne (szczegółowy wykaz wątpliwości i uwag krytycznych został umieszczony w dalszej części recenzji), ale niewątpliwie **rozprawa dokumentuje oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**, zwłaszcza w zakresie opracowania modeli matematycznych.

2. Struktura pracy i analiza źródeł

Strukturę rozprawy można uznać za standardową. Składa się ona ze streszczeń w językach polskim i angielskim, listy skrótów, sześciu podstawowych numerowanych rozdziałów, w tym Wstępu i Podsumowania, Bibliografii i czterech dodatkowych części, formatowanych jako osobne rozdziały, a zawierających informacje o źródłach finansowania, prawach autorskich do wykorzystanych w pracy rysunków, wkładzie współautorów publikacji w wyniki prezentowane w pracy oraz listę publikacji Autorki. Pewnym mankamentem jest brak załączenia oświadczeń współautorów o ich wkładzie w publikacje współautorskie. Ich załączenie nie jest jednak wymogiem ustawowym, a raczej dobrą praktyką, w związku z czym nie ma wpływu na konkluzje niniejszej recenzji.

Wstęp stanowi wprowadzenie w tematykę pracy i przybliża zagadnienia związane z odpowiedzią komórek na niedotlenienie, regulacją transkrypcji za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych oraz modelowaniem matematycznym procesów wewnątrzkomórkowym, zawierając jednocześnie odwołania do światowej literatury. Na tym tle w Rozdziale 2 zostały przedstawione cele rozprawy.

W Rozdziale 3 wymieniono metody eksperymentalne, źródła danych, wykorzystane metody i narzędzia modelowania i analizy bioinformatycznej.

Rozdziały 4-5 opisują rezultaty oryginalnych badań naukowych, przeprowadzonych przez Doktorantkę, po części we współpracy ze współautorami i współautorkami opublikowanych prac oraz dyskusję tych wyników. Podrozdziały 4.1 i 4.2 poświęcone są wynikom eksperymentalnym i analizie bioinformatycznej sekwencji w pobliżu miejsc startu transkrypcji genów indukowanych czynnikami HIF1 i HIF2. Podrozdział 4.3 omawia różne warianty modelu matematycznego, zaproponowane przez Doktorantkę jako narzędzia wspomagające odkrywanie i analizę mechanizmów regulujących transkrypcję genów, wybranych w poprzednich częściach pracy. Rozdział 5 zawiera dyskusję wyników, przedstawionych w Rozdziale 4. W Rozdziale 6 Doktorantka podsumowała otrzymane wyniki, w czterech punktach wskazując swoje osiągnięcia.

Spis literatury zawiera 132 pozycje, z czego trzy są współautorstwa Doktorantki. W zdecydowanej większości są to prace bezpośrednio związane z tematyką rozprawy. Należy zwrócić uwagę, że jedynie ok. 20 źródeł pochodzi z kilku ostatnich lat (wydane w roku 2019 lub później). W obszarze biologii molekularnej nowe wyniki pojawiają się lawinowo, a kilka lat różnicy może stanowić o całkowitej zmianie punktu widzenia na niektóre procesy i mechanizmy ich regulacji. Jednakże dobór literatury uwzględnionej w pracy wynika najprawdopodobniej ze stosunkowo niewielkiego zainteresowania analizowanymi czynnikami transkrypcyjnymi – o ile termin „hypoxia” zwraca ponad 44 tysiące pozycji w bazie PubMed za ostatnie pięć lat, to wskazanie czynników HIF1 i HIF2 jedynie około sto artykułów.

Podsumowując, stwierdzam, że **recenzowana rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne**, a w szczególności w obszarze biologii molekularnej, o czym świadczy przede wszystkim zawartość Rozdziału 1, ale również sposób rozumowania prezentowany w analizie wyników w dalszych rozdziałach.

3. Oryginalność i silne strony rozprawy.

Eksperymenty, których wyniki zostały przedstawione w rozprawie, zostały przeprowadzone przez grupę z Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku, pod kierownictwem prof. Bartoszewskiego,

przy czym Doktorantka uczestniczyła w planowaniu części tych eksperymentów. W związku z tym za oryginalne osiągnięcia Doktorantki, istotne z naukowego punktu widzenia należy uznać:

- przeprowadzenie analizy bioinformatycznej sekwencji w obszarze promotorów genów regulowanych przez czynniki transkrypcyjne HIF1 i HIF2 pod kątem liczby miejsc wiązania tych czynników oraz rozkładu położenia tych miejsc,
- Opracowanie kilku wariantów modelu matematycznego odpowiedzi komórek na niedotlenienie oraz wykorzystanie go do analizy perturbacyjnej
- Wykazanie na drodze symulacji, że ilość podjednostek beta (HIF1 β) w komórkach musi być znacznie większa niż podjednostek alfa (HIF1 α), aby można było uzyskać wyniki obserwowane eksperymentalnie
- Pośrednie potwierdzenie (również oparte na symulacji) hipotezy, że za zmianę wiodącego czynnika transkrypcyjnego z HIF1 na HIF2 odpowiada resztkowa aktywność PHD2 (choć tu pojawia się wątpliwość, czy wyniki symulacji są efektem założeń poczynionych przy budowie modelu, czy też efektem niezależnym od tych założeń).

W rozprawie pojawia się również hipoteza o liniowej zależności pomiędzy liczbą wiązania czynników transkrypcyjnych a poziomem ekspresji regulowanych przez nie genów, indukowanej niedotlenieniem. Byłby to bardzo silny wniosek, ale w mojej opinii nie jest on dostatecznie uargumentowany, co zostało wyrażone w uwadze krytycznej nr 5.9 w dalszej części recenzji.

Logiczna spójność większości analiz, wnioskowanie na podstawie pośrednich poszlak, umiejętność wykorzystania różnych metod i narzędzi oraz oparcie się na dobrze dobranych źródłach literaturowych, widoczne w rozdziałach 4 i 5 świadczy o **umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę.**

4. Słabsze strony rozprawy

Do słabszych stron pracy należą:

- Czysto spekulacyjny charakter symulacji o charakterze predykcyjnym – brakuje potwierdzenia ich poprawności na drodze eksperymentu biologicznego
- Pewna niekonsekwencja w procesie analizy części wyników (np. uwagi 5.1, 5.2, 5.8, 5.9, 5.11, 5.12, 5.13)
- Pobieżne potraktowanie wyników estymacji parametrów

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

5. Szczegółowe uwagi merytoryczne i redakcyjne

W pracy pojawiły się pewne niejasności oraz niedomówienia, istotne w tym sensie, że Doktorantka powinna się do nich odnieść w trakcie obrony (dotyczy to przede wszystkim punktów 5.1-5.16). Należy jednak podkreślić, że stosunkowo duża liczba uwag wymienionych poniżej w większości ma charakter dyskusyjny i wynika z zainteresowania wzbudzonego lekturą rozprawy i nie podważają one wartości samej rozprawy.

5.1. Analiza wpływu liczby miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych wykazała (częściowo) liniową zależność poziomu ekspresji genów od tej liczby. Jednakże wniosek z analizy wrażliwości, przedstawiony w rozprawie, mówi o niskiej wrażliwości modelu na zmianę parametrów odpowiedzialnych za wiązanie czynników transkrypcyjnych do odpowiednich obszarów promotorowych. Moim zdaniem brak tu pewnej konsekwencji – tego typu niespójność wyników powinna być przynajmniej przedyskutowana.

5.2. Przeprowadzając analizę wrażliwości modeli, Doktorantka badała wpływ zmian warunków początkowych w analizie lokalnej oraz wpływ zmian parametrów w analizie globalnej. Uniemożliwia to porównanie wyników obu analiz. Można przecież było przeprowadzić analizy

osobno dla warunków początkowych i osobno dla pozostałych parametrów, jeśli przyświecał im nieco inny cel. Dlaczego akurat takie podejście zostało zastosowane?

- 5.3. W opisie metod obliczeniowych, wykorzystanych w analizie wrażliwości opracowanych modeli, Doktorantka umieściła m.in. informacje o tym, że wyniki obliczonych wrażliwości nie są normalizowane (do czego i dlaczego?), a w przypadku analizy globalnej zakres zmian parametrów został arbitralnie określony na 40% wartości nominalnej (skąd akurat taka wartość? W przypadku parametrów kinetyki procesów biochemicznych 40% może oznaczać małą odchyłkę).
- 5.4. Wykresy kalibracyjne, przedstawione na rys. 4 (str. 35) obejmują zakres względnie liniowej zależności stężenia i gęstości optycznej. Jednakże, niektóre prążki pokazane na rys. 3 (w szczególności 6h i 8h dla HIF1 α , 10h, 12h i 16h dla HIF2 α) wyglądają na nasycone – czy nie mamy w tym przypadku do czynienia z próbą kwantyfikacji prążka w obszarze nasycenia, a więc poza zakresem stężeń widocznych na rys. 4?
- 5.5. W ostatnim modelu zostały wprowadzone zmienne, reprezentujące wolne i zajęte miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych. Wydaje się, że ze względu na znacząco mniejszą ich liczbę w porównaniu z liczbą molekuł czynników transkrypcyjnych, odpowiednie człony w równaniach powinny zawierać nasycenie tempa reakcji (jak w kinetyce Michaelisa-Menten). W jaki sposób zostało zapewnione, że suma wolnych i zajętych miejsc wiązania jest stała? Ponadto, należałoby zachować w ich przypadku dużą ostrożność, jeśli chodzi o zastosowanie analizy wrażliwości względem warunków początkowych nałożonych na te zmienne.
- 5.6. Estymacja parametrów została przeprowadzona przy wykorzystaniu gotowego pakietu oprogramowania, przy czym wartości początkowe zawsze były takie same (str. 38). Czy nie należałoby się spodziewać, że funkcja błędu w przestrzeni parametrów będzie miała wiele lokalnych minimów (i obszarów płaskich), w związku z czym wyestymowane wartości parametrów będą zależały od punktu startowego?
- 5.7. Odnosząc się do wyników, przedstawionych na rys. 12 i w Tabeli 4, dość arbitralnie przyjęto w niektórych przypadkach interpretację, że czynnik transkrypcyjny nie reguluje danego genu, pomimo tego, że wyciszenie czynnika transkrypcyjnego skutkowało zmianą ekspresji. Takie stwierdzenie wymaga co najmniej podania uzasadnienia (sformułowania „this was not interpreted as regulation by HIF” w podpisie tabeli).
- 5.8. Na str. 47, ostatnie zdanie nad tabelą głosi, że nie zaobserwowano funkcjonalnej zmiany czynnika transkrypcyjnego HIF1 na HIF2 w żadnym z genów docelowych – w takim razie, jak można utrzymać hipotezę o tej zmianie, do której rozprawa się odnosi (switch)?
- 5.9. W podrozdziale 4.2.5 zamieszczono wyniki analizy liczby miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych w odniesieniu do poziomu ekspresji genów. Tytuł podrozdziału sugeruje liniową zależność, ale jest ona widoczna jedynie w późniejszym punkcie czasowym 8h (jak w takim razie podtrzymać hipotezę o zmianie czynnika wiodącego z HIF1 na HIF2?). Nie widać takiej relacji w punkcie czasowym 2h, a także w żadnym punkcie czasowym dla drugiego czynnika transkrypcyjnego. Jeśli uzasadnieniem liniowej zależności miałyby być zwiększenie prawdopodobieństwa przyłączenia się czynnika transkrypcyjnego przy większej liczbie miejsc wiązania (a tylko takie uzasadnienie znalazłem w rozprawie), to taka zależność powinna być widoczna we wszystkich przedstawionych wynikach.
- 5.10. O ile w modelu dokonano ubezwymiarowania zmiennych poprzez ich skalowanie do wartości początkowej (tak przynajmniej można wnioskować z wyników symulacji), to nigdzie nie zamieszczono informacji o skalowaniu czasu i parametrów – można więc wnioskować, że model nie jest w pełni bezwymiarowy. Niedociągnięciem w takim przypadku jest brak podania jednostek wyestymowanych parametrów. Ponadto trudno zaakceptować wartości współczynników degradacji, które różnią się między sobą o cztery rzędy wielkości (np. wiersze

- 11 i 12 w Tabeli 5) – w takim wypadku wartość przynajmniej jednego z tych współczynników nie ma sensu (łatwiej byłoby wskazać, którego, gdyby były podane jednostki).
- 5.11. Wątpliwości budzą wyniki symulacji, przedstawione na Rys. 19. Co prawda, są całkiem nieźle dopasowane do wyników eksperymentalnych, ale trudno je zrozumieć, biorąc pod uwagę postać równań modelu. Z równań (4) i (5) wyraźnie wynika, że wzrost ilości każdego z białek może wynikać wyłącznie z transkrypcji. Problem w tym, że mRNA kodujące te białka maleje. Być może obserwowana dynamika jest efektem wygasania warunków początkowych, które nie są związane z homeostazą (a założenie homeostazy powinno być przyjęte, jeśli model ma odwzorowywać odpowiedź układu na niedotlenienie). W zasadzie należałoby to ująć jeszcze inaczej – ponieważ zmienne zostały przeskalowane do ich wartości początkowej. W takim wypadku błąd najprawdopodobniej wynika z faktu, że podczas estymacji parametrów wszystkie zostały potraktowane jako niezależne, podczas gdy, jeśli przyjąć założenie homeostazy przed rozpoczęciem niedotlenienia, tylko część z nich jest niezależna. Identyczna uwaga dotyczy wyników symulacyjnych otrzymanych z pozostałych modeli.
- 5.12. W podrozdziale 4.3.2 został wprowadzony model uwzględniający efekty indukowane przez siRNA. Model został skonstruowany w taki sposób, żeby spróbować zweryfikować hipotezę biologiczną postawioną przez współpracującą grupę eksperymentalną, a związaną z pośrednimi efektami działania siRNA. Jednakże w podrozdziale 4.2.2 przedstawiono wyniki eksperymentów z siRNA, które bezpośrednio oddziaływało na transkrypty kodujące HIF1 i HIF2. Dlaczego w takim razie nie zostało to wprost uwzględnione w modelu, co pozwoliłoby na porównanie wyników symulacji z danymi eksperymentalnymi (z rys. 11)? Bez porównania symulacji z danymi eksperymentalnymi model pozostaje czysto spekulacyjny.
- 5.13. Dlaczego w trzecim modelu zakłada się ograniczenie tempa reakcji w postaci kinetyki Michaleisa-Menten (uwaga dotyczy nieliniowych członów z HIF), a w pierwszych dwóch modelach nie ma takiego ograniczenia?
- 5.14. Porównując wykresy 26 i 27 zauważyłem pewną niespójność. Przebiegi oznaczone liniami ciągłymi, reprezentujące zmiany poziomu czynników HIF1 α i HIF2 α na rys. 27 powinny być identyczne, jak na rys. 26, a nie są (wystarczy porównać wartości maksymalne). Z czego to wynika?
- 5.15. W ostatnim wprowadzonym modelu założono „znacznie większą” (cytat z treści rozprawy) początkową ilość białka HIF2 α w porównaniu z HIF1 α . Jednakże w symulacjach założono stosunek tych dwóch wielkości na poziomie 2.6303 (przy okazji – skąd dokładność do czwartego miejsca po przecinku?) – trudno chyba uznać, że reprezentuje to „dużo większą ilość” HIF2 α .
- 5.16. W Streszczeniu Doktorantka napisała, że uwzględnienie w modelu czynnika HIF2 nie poprawiło wyników przewidywania ekspresji genów regulowanych przez niedotlenienie. W rozprawie nie znalazłem porównania działania tych modeli (ani modelu zawierającego tylko HIF1). Podobnie jednak jak w przypadku uwagi zamieszczonej w punkcie 5.9 – czy nie poddawałoby to w wątpliwość istnienia bądź znaczenia zmiany wiodącego czynnika transkrypcyjnego?

Inne uwagi szczegółowe:

- 5.17. Skoro, jak Doktorantka zauważyła, powołując się zresztą na literaturę, że samo wiązanie czynników transkrypcyjnych HIF1 i HIF2 nie wystarcza do aktywacji transkrypcji (str. 15), to jakie dodatkowe procesy są do tego potrzebne i czy nie należałoby ich uwzględnić w jakiś sposób w modelu?
- 5.18. Dlaczego pominięto w badaniach czynnik HIF3? Czy jego uwzględnienie nie mogłoby pomóc w wyjaśnieniu wątpliwości, które pojawiły się w analizie otrzymanych wyników?
- 5.19. W podrozdziale 1.4.3, Autorka rozprawy pisze, że równania różniczkowe cząstkowe często wprowadzane są równań różniczkowych zwyczajnych – trudno się z tym zgodzić, biorąc pod

uwagę znaczenie słowa „wyprowadzać”; podobnie trudne w interpretacji jest stwierdzenie o statycznym charakterze modelu zadanego przez krzywe przeżyciowe w tym samym podrozdziale

- 5.20. Być może jest to kwestia różnic w rozumieniu tych samych terminów w różnych środowiskach – ale dyskusyjne dla mnie jest stwierdzenie, że w podrozdziale 4.1 dokonano funkcjonalnej analizy miejsc wiązania HRE. W moim rozumieniu o charakterystyce funkcjonalnej można mówić dopiero wtedy, gdy przeprowadzony zostałby szereg eksperymentów, sprawdzających, czy miejsca wiązania są funkcjonalne, tzn., czy rzeczywiście wiążą się do nich czynniki transkrypcyjne. Oczywiście, biorąc pod uwagę liczbę miejsc wiązania czynników eksperymenty takie trwałyby lata i ich przeprowadzenie znacznie wykroczyłoby poza zakres jakiegokolwiek pracy doktorskiej. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę fakt, że sekwencje konsensusowe tych wiązań zostały zaczerpnięte z literatury, to przedstawione wnioski dotyczące tego, że są one specyficzne dla czynników HIF1 i HIF2 wydają się mało oryginalne.
- 5.21. Nie mogę się również zgodzić ze stwierdzeniem, że w przypadku gdy stałe kinetyczne reakcji prostej i odwrotnej są sobie równe, to substrat i produkt są w stanie ustalonym (równowadze) – str. 25. W układzie stabilnym, przy braku zewnętrznych wymuszeń, układ jest w równowadze niezależnie od wzajemnego stosunku stałych kinetycznych (układy generujące drgania niegasnące wymagałyby tu poszerzonej dyskusji), natomiast jeśli z jakiegoś powodu (np. zakłócenia) układ zostanie z takiego położenia wytrącony, to nawet przy identycznych wartościach tych stałych stan równowagi zostanie osiągnięty dopiero po pewnym czasie. Na tej samej stronie pojawia się również niezbyt szczęśliwe sformułowanie dotyczące kinetyki Michaelisa-Menten, z którego wynika niejako, że nie jest ona oparta o prawo oddziaływanie mas (sformułowanie „another type”). W rzeczywistości podstawą jej wyprowadzenia jest właśnie prawo oddziaływania mas.
- 5.22. Nadużyciem jest stwierdzenie, że metody lokalnej analizy wrażliwości nie są „adequately sufficient” w analizie złożonych modeli (str. 27 - choć może to kwestia interpretacji tego sformułowania). Jak każda metoda, również ta ma swoje zastosowanie w poszukiwaniu odpowiedzi na określone pytania, natomiast nieprzydatna, jeśli pytanie zostaje inaczej postawione. Podobnie, niezbyt trafne jest ostatnie zdanie na str. 28, dotyczące wskaźników wrażliwości Sobola, gdzie po pierwsze zastąpiono parametr słowem wejście, a po drugie, zbytnio uproszczono wniosek końcowy (wskaźnik mówi o udziale wariancji parametru w wariancji danego wyjścia).
- 5.23. Zazwyczaj przyjmuje się, że parametry w równaniach opisujących wewnątrzkomórkowe procesy biochemiczne są nieujemne, a znaki przed poszczególnymi wyrażeniami są informacją, czy odpowiadają one za wzrost, czy spadek wartości zmiennej. W tym kontekście przyjęcie ujemnej wartości współczynnika w pierwszym równaniu modelu przedstawionego w podrozdziale 4.3.2 nie jest co prawda błędem, ale utrudnia analizę modelu. Podobnie, umieszczenie w ogólnej postaci ostatniego modelu pojedynczych wyrażen z prawej strony równań, opisujących zmiany w ilości wolnych i zajętych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych, które okazują się później (w tabeli) różnicą dwóch wyrażen, znacząco utrudnia analizę struktury takiego modelu.
- 5.24. Niezbyt trafne jest użycie słowa „optymalne” w stosunku do poszukiwania początkowego stężenia HIF1 β – żeby można było mówić o optymalizacji, należałoby wprowadzić kryterium oceny i wykazać, że rzeczywiście znaleziono rozwiązanie optymalne (a nie tylko porównać wyniki dla trzech arbitralnie wybranych wartości)
- 5.25. Na rys. 9 przedstawiono różnice w rozkładach położenia miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych – obserwacja jest słuszna, ale brakuje dyskusji znaczenia tych różnic – jakie to ma znaczenie dla poziomu ekspresji genów?
- 5.26. W pracy pojawiają się niedociągnięcia językowe i edycyjne. Między innymi:

- Równania, przedstawione w rozprawie powinny być numerowane za pomocą kolejnych liczb. Jeśli Autorka chce numerację równań dla każdego modelu rozpoczynać od jedynki, to taki numer powinien być uzupełniony przedrostkiem, związanym z numeracją rozdziałów. Numeracja równań w formie użytej w rozprawie moim zdaniem jest błędem w sztuce pisania pracy.
- W rozprawie powinno się używać konsekwentnie jednej notacji – tymczasem te same izoformy raz są oznaczane HIF1 α , raz HIF1A. Podobnie niepotrzebne wydaje się zamienne stosowanie oznaczeń HIF2A i EPAS1, co zmniejsza czytelność pracy.
- Niektóre zdania wydają się poddane częściowej edycji, a potem zapomniane, co skutkuje nieprawidłową składnią (np. pierwsze zdanie ostatniego akapitu na str. 14, podpis pod Tabelą 2 na str. 37).
- W niektórych fragmentach pracy chęć zwięzłego streszczenia opisywanych zjawisk prowadzi do niezbyt szczęśliwych sformułowań bądź nieuprawnionych uproszczeń (np. zdanie o zmianie charakteru czynników transkrypcyjnych w ostatnim akapicie na str. 17 – nie ma tu zmiany, ponieważ nie pojawia się przełączenie z jednego zachowania do drugiego; jest natomiast inny typ zachowania, objawiający się w komórkach różnego typu; innym przykładem jest stwierdzenie, że model Markowa jest metodą obliczania prawdopodobieństwa lub że stosunek dwóch wartości jest metodą wnioskowania o występowaniu określonego motywu – str. 19-20 – bądź praktycznie cały, wspomniany już wyżej, podrozdział 1.4.3).
- Wracając do przykładu podanego w poprzedniej uwadze, nie rozumiem stwierdzenia o modelu Markowa rzędu zerowego – wydaje się, że tu skrót myślowy został posunięty zbyt daleko; zresztą całość podrozdziału 1.3.2 byłaby znacznie czytelniejsza, gdyby wzbogacić go o ilustracje prezentowanych konceptów.

6. Ocena końcowa rozprawy.

Podsumowując, pomimo licznych uwag szczegółowych, wymienionych powyżej, uważam, że silne strony pracy zdecydowanie przeważają nad słabszymi. Stwierdzam, że mgr inż. Aleksandra Cabaj wykazała się wiedzą i umiejętnościami uprawniającymi do ubiegania się o stopień doktora nauk w dyscyplinie nauki biologiczne. Przedstawiona praca doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W szczególności, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauki biologiczne, wykazuje umiejętność samodzielnej pracy naukowej, a jej przedmiotem jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, opisanego w punkcie 1 niniejszej recenzji, Doktorantka posiada tytuł zawodowy magistra inżyniera oraz jest współautorką dziesięciu artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, ujętych w odpowiednim wykazie. W związku z powyższym, **wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Cabaj do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**