

RE: Recenzja rozprawy doktorskiej

Luksemburg 29/05/2025

Doktorant: mgr. inż. Karol Jacek

Tytuł rozprawy doktorskiej: Application of single-cell and spatial transcriptomics to evaluate the effects of the IDH1 R132H mutation on the immune microenvironment of experimental gliomas

Promotor: Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek

Pracownia Neurobiologii Molekularnej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
Polskiej Akademii Nauk

Recenzent: Dr hab. Anna Gołębiewska - Buisine

.....

Ocena ogólna i zakres pracy

Rozprawa mgr. inż. Karola Jacka koncentruje się na analizie mikrośrodowiska immunologicznego agresywnych glejaków. W pracy wykorzystano przedkliniczne modele in vivo, w tym mysie modele glejaków z mutacją i bez mutacji w genie IDH1 (IDH1 wild-type, IDH1 mutant). Dogłębna analiza transkryptomicznych i proteomicznych cech komórek odpornościowych obecnych w nowotworach mózgu została przeprowadzona z użyciem zaawansowanych i nowoczesnych technologii, takich jak sekwencjonowanie RNA na poziomie pojedynczych komórek (scRNA-seq), transkryptomika przestrzenna i cytometria przepływowa. Choć doktorant otrzymał wsparcie w przeprowadzaniu eksperymentów laboratoryjnych, samodzielnie przeprowadził szczegółową i zaawansowaną analizę bioinformatyczną. Rozprawa doktorska, napisana w języku angielskim, w sposób jasny i przejrzysty przedstawia pytania badawcze oraz systematycznie opisuje przeprowadzone kompleksowe analizy. Rozprawa jest oparta na solidnych podstawach teoretycznych i aktualnej literaturze, co pozwala na trafną interpretację uzyskanych wyników.

W trakcie doktoratu kandydat przyczynił się do powstania pięciu dodatkowych publikacji w renomowanych czasopismach międzynarodowych jako współautor, co podkreśla jego szeroką wiedzę oraz zaawansowane umiejętności techniczne niezbędne do prowadzenia badań naukowych na międzynarodowym poziomie.

Ocena ogólnej wiedzy teoretycznej

Doktorant wykazuje doskonałą znajomość biologii guzów mózgu. We wstępie rozprawy kandydat w sposób klarowny przedstawił cechy molekularne glejaków o wysokim stopniu złośliwości, ze szczególnym uwzględnieniem ich heterogeniczności — zarówno pomiędzy pacjentami, jak i wewnątrz pojedynczych guzów. Praca zyskałaby jednak na wartości, gdyby bardziej szczegółowo omówiono podtypy nowotworów oraz zróżnicowanie stopnia agresywności glejaków z mutacją IDH, co mogłoby korzystnie wpłynąć na interpretację danych uzyskanych z zastosowanych mysich modeli.

Dogłębna wiedza z zakresu immunologii glejaków znajduje odzwierciedlenie w precyzyjnym i eleganckim opisie stanów fenotypowych różnych typów komórek odpornościowych obecnych w glejakach. Kandydat skutecznie wykorzystał tę wiedzę w analizie i interpretacji danych badawczych, prezentując wysoki poziom merytoryczny. Co istotne, rozprawa nie ogranicza się jedynie do opisu markerów charakterystycznych dla zidentyfikowanych podgrup komórek, lecz podejmuje również próbę głębszej interpretacji ich funkcji biologicznych.

Ponadto kandydat wykazał się bardzo dobrą znajomością przedklinicznych modeli guzów mózgu *in vivo* oraz biegłością w zakresie profilowania transkryptomicznego i zaawansowanych metod analitycznych.

Ocena samodzielnego prowadzenia pracy naukowej

Kandydat zaprezentował szeroki zakres umiejętności świadczących o wysokim poziomie samodzielności w prowadzeniu badań naukowych. Praca oparta jest na zastosowaniu różnorodnych technik komórkowych i molekularnych oraz na analizie danych zarówno uzyskanych eksperymentalnie w laboratorium, jak i pochodzących z wcześniej opublikowanych źródeł. Na szczególne uznanie zasługuje samodzielnie przeprowadzona, dogłębna analiza bioinformatyczna — od wstępnego przetwarzania danych, przez zaawansowaną analizę subpopulacji komórek, aż po szczegółową charakterystykę ich stanów fenotypowych, interakcji międzykomórkowych oraz rozkładu przestrzennego w niszach nowotworowych.

Rozprawa mogłaby jednak zyskać na bardziej szczegółowym omówieniu danych pochodzących z analizy CITE-seq, zwłaszcza w kontekście podobieństw i różnic pomiędzy poziomami mRNA a ekspresją białek błonowych. Głębsze porównanie tych parametrów mogłoby dostarczyć cennego wglądu w stopień translacji profili transkryptomicznych na poziom proteomiczny.

Ocena oryginalnego rozwiązania problemu naukowego

Praca mgr inż. Karola Jacka dostarcza nowatorskiej analizy układu immunologicznego glejaków w eksperymentalnych modelach mysich. Potwierdza obecność kluczowych typów komórek mieloidalnych i limfoidalnych oraz heterogennych stanów fenotypowych wcześniej zidentyfikowanych zarówno w modelach przedklinicznych, jak i w guzach pacjentów. Co istotne,

badanie wnosi nową jakość dzięki pogłębionej analizie zmian stanów komórkowych i ich regulatorów na poziomie transkryptomycznym, oferując świeże spojrzenie na dynamikę fenotypową komórek odpornościowych.

Rozprawa wnosi również nową ocenę bezpośrednich interakcji między komórkami mieloidalnymi i limfoidalnymi, wskazując na rolę chemokin z podklas CXCL i CCL jako mediatorów komunikacji między makrofagami immunosupresyjnymi a komórkami T i NK. Szczególnie istotne jest podkreślenie znaczenia klinicznego modeli mysich z mutacją IDH, które – w przeciwieństwie do szeroko stosowanego modelu GL261 – wykazują profil układu odpornościowego bardziej zbliżony do obserwowanego w glejakach pacjentów. Zwrócono uwagę na zmniejszoną obecność i potencjalnie niższą aktywność limfocytów T oraz przewagę mikrogleju nad monocytami w tych modelach.

Ze względu na trudności w pozyskaniu modeli IDH opartych na komórkach pochodzących bezpośrednio od pacjentów, wykorzystanie dobrze scharakteryzowanych modeli eksperymentalnych stanowi cenną alternatywę dla przedklinicznej oceny skuteczności terapii immunologicznych. Dodatkową wartością tej pracy jest zastosowanie modeli IDH dzikiego typu pochodzących z tego samego podłoża genetycznego, co zwiększa wiarygodność porównań i interpretacji danych.

Perspektywa dalszych badań może obejmować pogłębioną charakterystykę stanów fenotypowych komórek glejaka oraz analizę bezpośrednich i konkurencyjnych interakcji między komórkami nowotworowymi, mieloidalnymi i limfoidalnymi. Warto jednak zaznaczyć, że w dyskusji brakuje szerszego omówienia wyników w kontekście dotychczas rozczarowujących wyników badań klinicznych ukierunkowanych na modulację mikrośrodowiska immunologicznego w glejakach, co mogłoby wzbogacić interpretację uzyskanych danych.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr inż. Karola Jacka stanowi doskonały przykład pionierskiego wykorzystania modeli przedklinicznych oraz zaawansowanych metod analizy danych w celu pogłębienia wiedzy z zakresu biologii nowotworów. Innowacyjne techniki molekularne w połączeniu z wysokopoziomową analizą bioinformatyczną podkreślają światowy poziom badań prowadzonych w laboratorium. Pomimo pewnych ograniczeń wynikających z zastosowania modeli mysich, praca przedstawia solidne i przekonujące wyniki, które mogą stanowić istotną podstawę do dalszych badań translacyjnych z udziałem nowotworów pacjentów. Szczególnie istotne jest, że ocena modeli przedklinicznych odgrywa kluczową rolę w ich prawidłowym wykorzystaniu do analizy funkcji komórek oraz testowania skuteczności nowych terapii przed ich wdrożeniem do badań klinicznych.

Rozprawa zasługuje na wyróżnienie nie tylko ze względu na zastosowanie nowoczesnych modeli biologicznych i zaawansowanych narzędzi analitycznych w odpowiedzi na klinicznie istotne pytania, lecz także dzięki wysokiemu poziomowi interpretacji uzyskanych danych. Podczas gdy wiele współczesnych prac bioinformatycznych koncentruje się głównie na identyfikacji nowych stanów fenotypowych i markerów, praca mgr inż. Karola Jacka wykracza poza takie podejście, oferując spójną i pogłębioną interpretację funkcjonalnych cech zidentyfikowanych komórek odpornościowych oraz ich roli w kształtowaniu immunosupresyjnego ekosystemu w agresywnych glejakach.

Recenzowana rozprawa doktorska mgr. inż. Karola Jacka pt. "Application of single-cell and spatial transcriptomics to evaluate the effects of the IDH1 R132H mutation on the immune microenvironment of experimental gliomas " 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 mgr. inż. Karola Jacka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



Anna Gołębiewska - Buisine, PhD

Group leader, NORLUX Neuro-Oncology Laboratory

Department of Cancer Research

Luxembourg Institute of Health

L-1526 Luxembourg

Email: anna.golebiewska@lih.lu

Tel : +352 26 970 244

<https://norlux.lih.lu/>



UNIVERSITY
OF WARSAW

Faculty of Mathematics, Informatics and Mechanics
Institute of Informatics

Dr. Ewa Szczurek
Banacha 2,
02-097 Warszawa, Poland
Phone +48 22 55 44 558
Email szczurek@mimuw.edu.pl
www.mimuw.edu.pl/~szczurek

Warsaw, Poland, 29 May 2025

Review of Thesis *Application of single-cell and spatial transcriptomics to evaluate the effects of the IDH1 R132H mutation on the immune microenvironment of experimental gliomas* by Karol Jacek

The thesis titled "*Application of single-cell and spatial transcriptomics to evaluate the effects of the IDH1 R132H mutation on the immune microenvironment of experimental gliomas*" by Karol Jacek presents a comprehensive and technically rigorous study of the immune landscape in murine gliomas using advanced transcriptomic technologies. The core contribution of the Author are series of bioinformatics analyses using standard molecular data analysis tools. The work explores the composition and functional states of immune cells within the tumor microenvironment (TME), with a particular focus on the widely used GL261 glioma model and genetically engineered gliomas bearing the IDH1 R132H mutation. Using Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing (CITE-seq) and 10x Genomics Visium Spatial Transcriptomics, the candidate dissects the heterogeneity and spatial organization of myeloid and lymphoid immune cells and assesses the influence of tumor-genetic background on their phenotypes and interactions.

The thesis opens with a well-structured introduction that outlines the pathology of gliomas, the significance of IDH1/2 mutations, and the immunological characteristics of high-grade gliomas (HGG). It presents an accessible overview of key immune cell types in the glioma TME, the challenges posed by immunosuppressive mechanisms, and the implications of T cell exhaustion. The candidate introduces the tools of single-cell and spatial transcriptomics with a particular emphasis on preprocessing, normalization, dimensionality reduction, clustering, and downstream analysis strategies. The aims of the thesis are clearly stated: first, to define immune cell diversity and spatial architecture in the GL261 model; second, to characterize the changes induced by IDH1 R132H in the immune TME using both single-cell and spatial transcriptomic approaches.

The materials and methods chapter details the experimental pipeline, including tumor implantation in mice, FACS sorting for CITE-seq, and tissue preparation for Visium analysis. The computational steps are also described, including data filtering, normalization, scaling, dimensionality reduction (PCA and UMAP), clustering (Leiden algorithm), and downstream analyses such as gene set

enrichment, pseudotime ordering, transcription factor activity inference (via DoRothEA and VIPER), and ligand-receptor interaction prediction.

The results chapter demonstrates the successful reconstruction of an immune cell atlas of GL261 gliomas. The candidate identifies key immune cell populations including dendritic cells, T cells, NK cells, and notably refines the classification of macrophages into four spatially and transcriptionally distinct subtypes. These macrophage clusters show variation in metabolic signatures and spatial localization, challenging earlier over-clustering approaches and offering improved biological interpretability. In the lymphoid compartment, a detailed analysis of CD8⁺ T cells uncovers three principal subpopulations: two effector (Teff1, Teff2) and one exhausted (Tex), the latter enriched in immune checkpoint expression. NK cells show an immunosuppressive, glioma-associated phenotype with decreased cytotoxicity.

In the IDH1-mutant model, the author shows that the oncometabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG) dampens T cell oxidative phosphorylation and proliferation, disrupts antigen presentation by macrophages, and reshapes ligand-receptor interactions in a direction favoring immune suppression. These effects are confirmed across multiple orthogonal platforms and correlated with human glioma data. In particular, the IDH1 mutation appears to modulate both myeloid and lymphoid compartments in a manner consistent with prior literature, yet the spatial resolution and subtype-level resolution provided here constitute a substantial advance.

The contributions of the thesis include a comprehensive immune atlas for the GL261 glioma model, a refined macrophage classification that corrects for clustering artifacts seen in prior work, and novel T cell states with defined functional signatures. The thesis further delineates the immunological consequences of the IDH1 R132H mutation at single-cell and spatial levels, including ligand-receptor interactions, metabolic programming, and recruitment deficits.

The thesis work is complemented by five scientific publications in high-impact journals, to which the author contributed, although not as the first author. These publications address various aspects of glioma immunology, cancer genomics, and single-cell methods, and include data or methods directly relevant to the thesis scope. However, the specific role of the PhD candidate in these publications has not been clarified in the thesis

I could note a few limitations or points of that need further clarification of the presented work. First, as noted on page 81, the study is limited to male mice, excluding sex-dependent immune differences. Does the Author know how important sex differences are in glioma immunology? Second, single-cell workflows involving enzymatic dissociation and FACS sorting may selectively underrepresent fragile or rare cell populations, notably neutrophils. In the introduction, the Author mentions neutrophils as important cell type for glioma biology. Surprisingly, Figure 1.2 mentions the presence of neutrophils (defined using *Ly6ghi* marker). How was the typical problem with neutrophil quantification solved in

this work? How reliable are the results regarding neutrophil presence? Third, computational tools that are used for analyses very often have multiple alternatives and their choice is not well motivated. For example, the algorithm RCTD, used for spot deconvolution based on scRNA-seq – derived cell types, is not the only one of the kind that has been published in the field. What was the motivation behind choosing RCTD over alternative approaches? Similarly, why CellChat and not competitor models? Fourth, it would be great to hear a comment about the clinical, translational potential of the presented findings. Fifth, the Author criticized previous work for “overclustering” and claims finding alternative clustering which is more biologically relevant. How was the number of clusters defined and was it manually, or data-driven? Finally, the presented work was of supportive rather than leading nature in the presented publications. Could the Author delineate any core novel contribution that was delivered as part of the presented analyses?

As of minor note, the clarity of writing of the thesis could be improved. There are sentences with hard to decipher semantics, hard to trace subjects, objects and predicates, e.g. “Building on prior work, I redefined macrophages into four functionally distinct states, demonstrating that higher cluster counts in earlier studies arise from over-clustering and reduce translational relevance, while expanding phenotypic characterization to include metabolic and spatial dynamics.” Also minor, but worth mentioning, is the visual appeal and clarity of all presented Figures, demonstrating that the Author of the thesis has mastered data visualization techniques. The Author has cited relevant work comprehensively and appropriately compared their results to prior findings in glioma immunology and transcriptomics. Key literature on macrophage phenotyping, IDH1 mutation effects, immune suppression, and single-cell data analysis are well integrated into the discussion.

In summary, this thesis demonstrates advanced application of computational and experimental techniques in cancer immunogenomics. It contributes novel insights into the glioma immune landscape and the role of IDH1 mutation in shaping immune evasion. The bioinformatics work is well executed. I recommend the thesis be accepted for the defense of the doctoral degree.

Recenzowana rozprawa doktorska mgr. inż. Karola Jacka pt. “Application of single-cell and spatial transcriptomics to evaluate the effects of the IDH1 R132H mutation on the immune microenvironment of experimental gliomas ” 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 mgr. Inż. Karola Jacka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Sincerely,



Ewa Szczurek

Kraków, 1 czerwca 2025 roku

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. inż. Karola Jacka zatytułowanej
„Application of single-cell and spatial transcriptomics to evaluate the effects of
the IDH1 R132H mutation on the immune microenvironment of experimental
gliomas” przygotowanej pod opieką promotora
prof. dr. hab. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek,
w Pracowni Neurobiologii Molekularnej
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk.

Rozprawa doktorska mgr. Inż. Karola Jacka przedstawia kompleksowe badania nad cechami, funkcjami i znaczeniem komórek odpornościowych w mikrośrodku glejaka wielopostaciowego. W pracy szczegółowo scharakteryzowano profile molekularne oraz dokonano klasyfikacji podtypów komórek nowotworowych, a także przeanalizowano potencjalne interakcje między komórkami mieloidalnymi i limfoidalnymi. Autor zaproponował również mechanizmy związane z progresją guza oraz zaburzeniami odpowiedzi przeciwnowotworowej w modelu glejaka wysokiej złośliwości z mutacją IDH1 R132H.

W swojej pracy doktorant opracował ścieżki analityczne umożliwiające przetwarzanie dużych zestawów danych uzyskiwanych przy pomocy najnowszych technologii pomiaru transkrypcji genów. Pozyskane dane obejmują zarówno przestrzenną, jak i komórkową charakterystykę procesów immunologicznych na poziomie molekularnym. Zastosowane przez doktoranta podejście analityczne ma przełomowe znaczenie w badaniach abundancji transkryptów, umożliwiając funkcjonalną interpretację różnic oraz interakcji międzykomórkowych.

Należy podkreślić, że podjęta w rozprawie tematyka badań ma fundamentalne znaczenie dla poszerzenia wiedzy o molekularnych mechanizmach rozwoju glejaka, szczególnie w kontekście czynników napędzających jego progresję i zwiększających złośliwość. Wykorzystanie zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych do rozwiązywania złożonych problemów biomedycznych stanowi istotne wyzwanie badawcze, jednak - jak udowadnia praca - przynosi coraz bardziej obiecujące rezultaty

o potencjale translacyjnym. W kontekście dynamicznego rozwoju onkologii molekularnej, którego efektem jest wprowadzanie do praktyki klinicznej nowych metod terapeutycznych, przedstawione w rozprawie wyniki mogą stanowić istotny krok w kierunku opracowania innowacyjnych strategii farmakologicznego zwalczania glejaka.

Przedstawiona rozprawa doktorska, napisana w języku angielskim, obejmuje 93 strony tekstu głównego i zachowuje standardową strukturę pracy naukowej. Zawiera wymagane elementy, w tym streszczenia w języku polskim i angielskim, rozdziały wprowadzające (wstęp z celami pracy), szczegółowy opis metodologii, prezentację wyników badań oraz ich wszechstronną dyskusję. Praca opatrzona jest obszernym piśmiennictwem liczącym 119 pozycji, świadczącym o dogłębnym zapoznaniu się Autora z aktualnym stanem wiedzy w badanej dziedzinie. Pod względem edytorskim praca została przygotowana z należytą starannością. W trakcie lektury nie stwierdzono istotnych błędów redakcyjnych ani językowych, które mogłyby wpłynąć na zrozumienie prezentowanych treści lub utrudnić odbiór naukowego przekazu.

Wstęp rozprawy zawiera 24 strony. Rozpoczyna się od krótkiego wprowadzenia do etiologii glejaka oraz jego klasyfikacji klinicznej. W sposób zwięzły omówione zostały czynniki genomowe i wskaźniki molekularne powiązane ze stopniami złośliwości oraz rokowaniami dla pacjentów. Następnie właściwie przedstawiono warunki panujące w mikrośrodkowisku nowotworów mózgu. Wprowadzenie zawiera opis funkcji pełnionych przez poszczególne typy komórek odpornościowych oraz ich rolę w progresji guzów. W sposób wyczerpujący omówione zostały również warunki immunologiczne charakterystyczne dla ośrodkowego układu nerwowego, wynikające ze specyfiki bariery krew-mózg. Zmiany w mikrośrodkowisku guza związane z mutacjami IDH1/2 zostały przedstawione w kontekście potencjału klinicznego oraz postępów w rozwoju nowych terapii glejaka opartych na modulacji aktywności immunologicznej komórek. Kolejna część wstępu koncentruje się na omówieniu wykorzystanych w pracy narzędzi badawczych, w tym zwierzęcego modelu choroby opartego na metodzie domózgowego podania komórek nowotworowych GL261 lub linii komórkowych zawierających zmutowane allele genu IDH1. Najobszerniejszą część stanowi przegląd najnowszych technologii transkryptomicznych oraz metod analizy uzyskiwanych danych. Przedstawiono zasady działania wysokoprzepustowych metod sekwencjonowania DNA, umożliwiających analizę przestrzennej dystrybucji RNA w tkance oraz profili ekspresji genów w

pojedynczych komórkach. Dodatkowo opisano stosowane procedury przetwarzania danych, metody statystyczne i analizy bioinformatyczne.

Ogólnie wstęp sprawia dobre wrażenie i świadczy o wiedzy doktoranta w zakresie prowadzonych badań. Jednak w mojej ocenie zbyt mocno akcentuje on kwestie techniczne, kosztem głębszego omówienia biologicznych mechanizmów powstawania i rozwoju glejaka wielopostaciowego. Brakuje szerszego kontekstu badawczego oraz wyraźniejszego wskazania klinicznego znaczenia wyników wysokoprzepustowych badań transkryptomicznych. Warto byłoby rozszerzyć część dotyczącą etiologii i epidemiologii glejaka. Opisy procedur normalizacji danych czy filtrowania genów wydają się nadmiernie rozbudowane, biorąc pod uwagę, że celem pracy nie było opracowanie nowych metod analitycznych. Najmocniejszą stroną pracy jest umiejętność zastosowania zaawansowanych metod analizy ekspresji genów i ich trafnej interpretacji, co wymaga dobrej znajomości biologii nowotworów. Warto byłoby bardziej rozwinąć charakterystyczne dla glejaka mechanizmy nowotworzenia, fazy jego rozwoju oraz postulowane w literaturze punkty uchwytu nowych immunoterapii. Wstęp nie zawiera rycin, których dodanie poprawiłoby zrozumienie kluczowych zagadnień badawczych. Cytowana literatura jest odpowiednia i obejmuje najnowsze doniesienia z dziedziny.

Praca wyznacza dwa kluczowe cele: analizę zróżnicowania komórek immunologicznych w mikrośrodowisku glejaka oraz badanie wpływu mutacji IDH1 R132H na profil immunologiczny w mysim modelu glejaka wysokiego stopnia złośliwości. Cele szczegółowe precyzyjnie odzwierciedlają koncepcję badawczą, obejmując klasyfikację wykrytych komórek immunologicznych, charakterystykę ich funkcji, analizę interakcji mieloidalno-limfoidalnych, ocenę wpływu mutacji na skład i aktywność komórek oraz weryfikację wyników metodami komplementarnymi. Eksploracyjny charakter sformułowanych celów odpowiada innowacyjnemu podejściu badawczemu.

Sekcja materiałów i metod zajmuje 10 stron rozprawy. Z uwagi na cyfrowy charakter badań doktoranta, prace laboratoryjne z wykorzystaniem modeli zwierzęcych i pobranych od nich próbek biologicznych były prowadzone we współpracy. Pierwsza część tej sekcji zawiera informacje o udziale współpracowników w badaniach eksperymentalnych. Kolejne punkty szczegółowo opisują: zastosowany model zwierzęcy, używane linie komórkowe, przygotowanie próbek tkankowych, procedury sortowania komórek oraz metodykę wysokoprzepustowego sekwencjonowania. Dokładnie przedstawiono techniki obliczeniowe zastosowane

przez doktoranta do analizy danych. Badania łączyły transkryptomikę przestrzenną, analizę ekspresji w pojedynczych komórkach, dane referencyjne oraz metody klasyfikacji komórkowej. Przetwarzanie danych oparto na standardowych narzędziach i zalecanych parametrach, choć w niektórych przypadkach wybór metod i ich konfiguracja wymagałyby lepszego uzasadnienia. Ogólnie opisy są wystarczająco szczegółowe, by umożliwić powtórzenie eksperymentów. Jednak w porównaniu do opisów technik zamieszczonych we wstępie, w sekcji metod pominięto kilka podejść analitycznych, szczególnie w zakresie funkcjonalnej analizy grup genów i interakcji między czynnikami. W badaniach prowadzonych w skali transkryptomu kluczowe są założenia dotyczące pewności uzyskiwanych wyników. Opis zastosowanych metod statystycznych nie wyjaśnia w pełni stosowanych korekt wielokrotnych testów czy szacowania poziomów wyników fałszywie pozytywnych. Należy przy tym podkreślić, że te niejasności metodologiczne nie mają krytycznego wpływu na wiarygodność uzyskanych wyników analiz.

Rozdział wyników, liczący 25 stron, stanowi najobszerniejszą część rozprawy. W pierwszej części przedstawiono charakterystykę komórek immunologicznych występujących w mikrośrodku mysiego glejaka GL261. Rycina 1 prezentuje schemat eksperymentu oraz poziomy ekspresji molekularnych wskaźników 34 typów komórek mieloidalnych i limfoidalnych, znanych z literatury. Następnie zaprezentowano analizę różnic i podobieństw między zidentyfikowanymi grupami komórek. Analiza abundancji transkryptów na poziomie pojedynczych komórek pozwoliła na stworzenie molekularnego atlasu komórek immunologicznych obecnych w mikrośrodku glejaka w 21 dniu rozwoju. Kolejna część dotyczy przestrzennego profilowania ekspresji genów w mózgu, ze szczególnym uwzględnieniem obszaru występowania glejaka GL261. Warto jednak zauważyć, że prezentacja wyników dotyczących mózgu myszy (Rycina 2) nie zawiera pełnej informacji o metodzie nakładania siatki i definiowania struktur mózgu. Dodatkowym ograniczeniem jest stosunkowo mała liczba powtórzeń biologicznych w tych eksperymentach. W dalszej części doktorant szczegółowo scharakteryzował populację makrofagów w mikrośrodku glejaka, wyróżniając cztery kategorie tych komórek na podstawie ich wzorów molekularnych i przypisując im określone funkcje biologiczne. Wyniki ujawniły istotne różnice w dystrybucji poszczególnych podtypów makrofagów między różnymi obszarami mikrośrodka glejaka. Kolejne analizy dotyczyły limfocytów T i komórek NK - na podstawie profili ekspresji genów wskaźnikowych zidentyfikowano 6 grup komórek CD8+, 4 grupy CD4+ oraz jedną grupę komórek NKT, z dokładnym opisem ich cech molekularnych i potencjalnych powiązań funkcjonalnych. Szczególnie wartościowe są analizy pozwalające na przewidywanie procesów różnicowania

komórek NK w kierunku dojrzałych NK lub komórek GANK. Ostatnia część wyników poświęcona jest analizie interakcji między komórkami limfoidalnymi i mieloidalnymi w przestrzeni mikrośrodowiska glejaka. Zastosowane metody analityczne umożliwiły identyfikację szlaków sygnałowych między komórkami immunologicznymi, a doktorant zaproponował kompleksowy model tych oddziaływań, uwzględniający rolę mikrogleju i komórek dendrytycznych.

Drugi główny obszar badań dotyczył analizy wpływu mutacji R132H w genie IDH1 dehydrogenazy izocytrynianowej na skład komórkowy mikrośrodowiska glejaka o wysokiej złośliwości. Wykorzystano w tym celu dane z transkrypcyjnego profilowania sortowanych komórek immunologicznych połączone z analizą ich rozmieszczenia przestrzennego. Klasteryzacja ujawniła 27 populacji komórek, sklasyfikowanych na podstawie wcześniej opracowanego atlasu komórkowego. Analiza wykazała istotne różnice w strukturze populacji komórek immunologicznych związane z obecnością badanej mutacji. Techniki transkryptomiki przestrzennej ujawniły, że komórki mikrogleju występują głównie w obwodowych obszarach guza, podczas gdy makrofagi zlokalizowane są w jego części centralnej. Zaobserwowano tendencję do zmniejszonej liczby limfocytów Treg w glejakach z mutacją, choć różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej ze względu na duże rozbieżności między próbkami. Wyniki sugerują obniżony potencjał cytotoksyczny limfocytów T w obecności mutacji IDH1 R132H. W końcowej części przedstawiono bardziej subtelne różnice w proporcjach populacji makrofagów. Doktorant zasugerował, że występowanie mutacji powiązane jest z funkcjonalnym przeprogramowaniem komórek mieloidalnych w kierunku działań przeciwzapalnych i promujących rozwój glejaka. Mimo ogólnie wysokiej jakości opisu, pewne elementy wymagają doprecyzowania - np. metody statystyczne użyte do analizy na Rycinie 8.1D nie zostały wskazane. Całość wyników wyraźnie demonstrowa odmienność profili komunikacji międzykomórkowej w glejakach z mutacją IDH1. Wyniki są logicznie uporządkowane i dobrze udokumentowane, a towarzyszące im ryciny - mimo złożoności prezentowanych danych - zachowują przejrzystość i zawierają odpowiednie opisy. Obserwacje są trafnie powiązane z patofizjologią badanego układu, co wzmacnia ich interpretację i znaczenie naukowe.

Dyskusja rozpoczyna się od wskazania ograniczonej wiedzy na temat procesów biologicznych zachodzących w mikrośrodowisku glejaka jako kluczowego problemu badawczego. Opracowany w pracy atlas molekularnych profili komórek immunologicznych stanowi istotny postęp w tym zakresie. Nowe dane uzyskano dzięki efektywnemu zastosowaniu najnowocześniejszych technik profilowania

transkrypcyjnego. Kompleksowe podejście metodologiczne umożliwiło lepsze zrozumienie zmian zachodzących zarówno w populacjach komórek mieloidalnych, jak i limfoidalnych. Wyniki wskazują na obecność czterech wyraźnie zróżnicowanych populacji makrofagów w mikrośrodku guza. Doktorant trafnie dyskutuje kryteria ich klasyfikacji, argumentując przeciwko nadmiernemu rozdrobnieniu podtypów stosowanemu w badaniach innych autorów. Analizy ujawniły cztery odrębne stany funkcjonalne makrofagów o potencjalnym znaczeniu klinicznym. Badania przestrzennego rozmieszczenia transkryptów pozwoliły na identyfikację specyficznych lokalizacji różnych typów komórek immunologicznych, dostarczając istotnych danych dla zrozumienia patogenezы glejaka. Integracja wyników własnych z danymi z bazy GEO (publicznie dostępny zasób wyników transkryptomicznych) umożliwiła porównanie z próbkami klinicznymi. Ważnym wnioskiem jest ocena przydatności modelu GL261 do badań nad immunoterapią opartą na limfocytach T.

Dyskusja szczegółowo analizuje interakcje między różnymi populacjami komórkowymi, odnosząc wyniki do aktualnego stanu wiedzy, ze szczególnym uwzględnieniem ich znaczenia dla immunobiologii glejaka. Kolejna część dotyczy wpływu mutacji IDH1 R132H na skład komórek immunologicznych, w tym zmniejszonej liczby limfocytów T w rdzennej części guza. Wyniki są interpretowane w kontekście metabolicznych skutków mutacji i ich wpływu na funkcje immunologiczne, wnioskując nowe mechanizmy progresji nowotworu. Doktorant słusznie wskazuje na potrzebę dalszych badań funkcjonalnych dotyczących stanów makrofagów i komórek NK. Dyskusja uwzględnia ograniczenia modelu zwierzęcego, w tym metod izolacji komórek, pojedynczy punkt czasowy i różnice międzygatunkowe. Skomentowania wymaga punkt dotyczący różnic płciowych w przebiegu glejaka. Dane epidemiologiczne dowodzą prawie dwukrotnie częstszego występowania tej choroby u mężczyzn. Zastosowanie modelu zwierzęcego w postaci samca myszy ma silne podstawy. Ograniczeniem podejścia jest natomiast brak możliwości uwzględnienia w eksperymentach dodatkowych czynników tj. wpływ hormonów o potencjalnie protekcyjnym czy przeciwnowotworowym działaniu. W tej sytuacji, przeprowadzenie eksperymentów uwzględnieniem dwóch płci myszy może nie być ekonomicznie uzasadnione i wymagało by wykonania dodatkowego uzasadnienia. Podsumowując, dyskusja jest dobrze przeprowadzona i zawiera interesujące wnioski naukowe.

W podsumowaniu rozprawy zostały wyróżnione kluczowe osiągnięcia badawcze. Doktorant dokonał kompleksowej charakterystyki funkcjonalnej komórek immunologicznych występujących w mikrośrodku glejaka, zidentyfikował sieć wzajemnych oddziaływań między populacjami komórek mieloidalnych i limfoidalnych

oraz scharakteryzował wpływ mutacji R132H w genie IDH1 na profil komórek immunologiczny. W pracy podkreślono znaczenie translacyjne uzyskanych wyników, wskazując na ich potencjalne zastosowanie w opracowywaniu nowych, lepiej ukierunkowanych strategii terapeutycznych przeciwko glejakowi.

W odpowiedzi na recenzję, uprzejmie proszę o odniesienie się do następujących kwestii dotyczących prezentowanych wyników i dyskusji:

- Obserwacje przedstawione w rozprawie zostały opublikowane w pięciu artykułach naukowych. Prosiłbym o wskazanie, które konkretnie wyniki znalazły się w poszczególnych publikacjach oraz o informacje czy planowane są kolejne manuskrypty omawiające prezentowane dane.
- Czy osiągnięto cel pracy związany z opracowaniem referencyjnego atlasu komórek immunologicznych występujących w mikrośrodku glejaka? Czy tego typu atlas i/lub dodatkowe zasoby (np. zbiory danych, repozytoria kodu) zostały udostępnione w postaci narzędzi użytecznych dla społeczności naukowej?
- Można odnieść wrażenie, że w analizach stosunkowo niewielką uwagę przywiązano do szacowania poziomu wyników fałszywie pozytywnych w poszczególnych zestawach danych (np. brak stosowanej informacji w opisie Ryciny 4.2C). Jakie założenia statystyczne przyjęto na etapie planowania badań? Czy uzyskane wyniki były weryfikowane przy użyciu alternatywnych metod lub niezależnych zestawów danych?
- Opracowane sygnatury komórkowe odnoszą się do pojedynczego punktu czasowego. Jakie metody badawcze można zastosować, aby śledzić dynamikę zmian komórkowych w trakcie rozwoju glejaka?
- Jaki jest translacyjny potencjał obserwacji zawartych w rozprawie? Czy uzyskane wyniki badań mogą przyczynić się do postępu rozwoju immunoterapii glejaka?

Podsumowując, należy stwierdzić, że badania przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr. inż. Karola Jacka stanowią istotny wkład w rozwój wiedzy na temat immunobiologii glejaka.

Doktorant jest współautorem pięciu opublikowanych prac naukowych, które opisują części wyników zaprezentowanych w rozprawie.

Praca świadczy o rozległej wiedzy teoretycznej mgr. inż. Karola Jacka oraz potwierdza jego umiejętność samodzielnego prowadzenia zaawansowanych badań naukowych. Szczególnie imponująca jest biegłość w zastosowaniu wielowymiarowych metod transkryptomicznych do kompleksowej charakterystyki mikrośrodowiska glejaka, co pozwoliło na uzyskanie nowych, istotnych danych funkcjonalnych.

Stąd też z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. inż. Karol Jacek 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. Karola Jacka 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