

dr hab. inż. Eliasz Kańtoch, prof. AGH
Katedra Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej
Wydział Elektrotechniki, Automatyki, Informatyki i Inżynierii Biomedycznej
Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie

Kraków, 26 października 2021 roku

RECENZJA

Przedmiotem niniejszej recenzji jest rozprawa doktorska mgr Sonii Wróbel zatytułowana „Canonical correlation analysis of multi-omics data obtained from microvesicles of human skin melanoma cell lines and its possible application in biomarker discovery”. Promotorkami rozprawy są prof. dr hab. Ewa Łucja Stępień oraz prof. UJ dr hab. Monika Piwowar. Recenzję przygotowano na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie oraz wynikającego z tej uchwały zlecenia Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne prof. dr. hab. Jacka Golaka.

Problematyka rozprawy doktorskiej adresuje istotne wyzwanie integracji wielowymiarowych zbiorów danych multiomicznych pochodzących z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV) i komórek nowotworowych w celu zidentyfikowania ważnych sygnatur molekularnych, które mogą być kandydatami nowych biomarkerów biopsji płynnej w czerniaku skóry. W mojej ocenie tematyka badawcza jest oryginalna i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Zastosowane podejście wpisuje się w paradygmat biologii systemów (*ang. systems biology*) poprzez analizę złożonych interakcji w obrębie systemów biologicznych i otwiera nowe możliwości w zrozumieniu mechanizmów i współzależności występujących w mikrośrodku guza (TME) związanych z komunikacją międzykomórkową. Wykorzystanie metody korelacji kanonicznej w rozwiązywaniu wyzwań bioinformatycznych jest obiecujące, o czym świadczy dynamiczny wzrost liczby publikacji w tym obszarze. Hipoteza zakładała, że analiza korelacji kanonicznej może być z powodzeniem użyta do integracji danych omicznych, takich jak transkryptomiczne czy proteomiczne, i efektywnie korelować

sygnatury molekularne na potrzeby identyfikacji wysoce istotnych cech biologicznych, które mogą być następnie wykorzystywane jako biomarkery w leczeniu czerniaka skóry. Weryfikacja postawionej hipotezy odbyła się z użyciem modeli linii komórkowych ludzkiego czerniaka skóry o różnym stopniu złośliwości. Doktorantka wykorzystwała dane pochodzące z przeprowadzonych eksperymentów oraz z publicznie dostępnych baz danych molekularnych. W wyniku przeprowadzonych analiz Doktorantka zintegrowała trzy rodzaje danych: transkryptomiczne miRNA, proteomiczne pochodzące z mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych czerniaka, transkryptomiczne mRNA z całych komórek nowotworowych. W rezultacie otrzymano listę 24 sygnatur molekularnych, w tym 8 miRNAs, 7 białek i 9 mRNA.

Rozprawa doktorska składa się z 11 rozdziałów, słownika pojęć oraz obszernej bibliografii składającej się na 178 pozycji. Struktura rozprawy doktorskiej jest poprawna. Treść rozprawy uzupełnia i wzbogaca 6 dodatków. Dobór literatury świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Oceniana dysertacja została przygotowana bardzo starannie i rzetelnie. Opis jest wzbogacony licznymi ilustracjami i tabelami, które ułatwiają percepcję pracy. W mojej ocenie bardzo dobrą praktyką stosowaną obecnie podczas prezentacji wyników badań naukowych jest opracowywanie tzw. „streszczenia graficznego” (*ang. graphical abstract*), Doktorantka także przygotowała takie streszczenie graficzne i zostało ono zamieszczone na rysunku nr 1.1.

We wprowadzeniu Autorka zwróciła uwagę na dynamiczny wzrost objętości zbiorów danych biologicznych i wyzwania z tym związane w kontekście lepszego zrozumienia chorób nowotworowych. Doktorantka podkreśliła, że skuteczne badanie mikrośrodowiska guza (TME) i procesów powstawania przerzutów wymaga głębokiego zrozumienia kluczowych mechanizmów zaangażowanych w przekazywanie informacji biologicznych. Pokazano, że komórki komunikują się ze sobą nie tylko za pomocą pojedynczych cząsteczek, ale także za pomocą struktur zwane pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi (EV). Cytowane wyniki badań sugerują, że zwiększona liczba pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV) jest obserwowana w krwi pacjentów z chorobą nowotworowych w stosunku do zdrowej populacji. Doktorantka wskazuje, że badanie zawartości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV) pochodzenia nowotworowego jest obiecującym obszarem do poszukiwania nowych biomarkerów. W związku z powyższym

pojawia się potrzeba rozwoju metod bioinformatycznych w celu wykrywania biomarkerów opartych o pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV). W rozdziale drugim Doktorantka opisuje teoretyczne podstawy metody korelacji kanonicznej oraz jej zastosowanie do analizy wielowymiarowych zbiorów danych multiomicznych. W rozdziale trzecim zatytułowanym „*Extracellular vesicles*” Autorka omawia rolę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV) w komunikacji międzykomórkowej oraz ich zawartość molekularną. Doktorantka cytuje wyniki badań sugerujące, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV) są wydzielane przez wszystkie typy komórek i są obecne we wszystkich płynach ustrojowych (w tym we krwi), ponadto komórki rakowe wytwarzają więcej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV) niż niezłośliwe. W oparciu o te wyniki, uznaje się, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV) są uznawane za obiecujące biomarkery raka oparte na biopsji płynnej. W rozdziale czwartym zatytułowanym „*Sparse multiset CCA computational implementation*” Autorka odpowiednio uzasadnia wybór implementacji o nazwie „sCCA” oraz opisuje zastosowany algorytm. Implementacja bioinformatyczna tego narzędzia została dokonana w języku programowania R. Doktorantka w opisywanej analizie wykorzystuje następujące trzy macierze wejściowe reprezentujące różne zestawy cech dla tego samego zestawu linii komórkowych czerniaka: transkrypty miRNA z mikropęcherzyków, białka mikropęcherzykowe oraz transkrypty całkowitego RNA komórkowego. Rozdział piąty zatytułowany „*Multi-omics melanoma datasets*” zawiera informacje o wykorzystanych zbiorach danych (linie komórkowe czerniaka: WM115, WM266-4, WM793 i WM1205Lu. WM115 i WM266-4, dane z cBio Cancer Genomics Portal). Doktorantka przeprowadziła prace laboratoryjne niezbędne do wygenerowania danych miRNA z mikropęcherzyków w Zespole Pęcherzyków Zewnątrzkomórkowych w Zakładzie Fizyki Medycznej, Instytutu Fizyki im. Mariana Smoluchowskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz we współpracy z Zakładem Biochemii Glikokoniugatów Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego, natomiast sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) zostało przeprowadzone przez Intelliseq Sp. z o. o. W rozdziale szóstym zatytułowanym „*Data integration*” opisany został sposób integracji danych miRNA, proteomiki i totalRNA do plików w formacie CSV. Opisano oryginalną metodologię wykrywania biomarkerów z użyciem metody sCCA, która cechuje się: wykorzystaniem trzech macierzy danych

czerniaka zamiast dwóch; integracją danych nie tylko z całych komórek, ale także z mikropęcherzyków; wykorzystaniem wyników analizy sCCA i danych dotyczących nowotworowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W rozdziale dziewiątym zamieszczono wyniki przeprowadzonych analiz. Rozdział dziesiąty zawiera dobrze opracowaną dyskusję otrzymanych wyników. W rozdziale jedenastym zatytułowanym „Conclusion” Doktorantka zbiera i omawia najważniejsze konkluzje z pracy.

W mojej ocenie Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością stosowanego warsztatu badawczego. Metodologia badań jest poprawna. Podkreślam bardzo dobre przygotowanie metodologiczne i teoretyczne Doktorantki. Znakomite przygotowanie merytoryczne widać w rozdziałach piątym i siódmym. Na uwagę zasługuje bogaty materiał badawczy i interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań jak również biegłość w posługiwaniu się terminologią. Praca jest poprawna pod względem merytorycznym. Sformułowałem następujące uwagi o charakterze dyskusyjnym:

- W mojej ocenie postawiona hipoteza rozprawy na str. 4 „*hypothesis that canonical correlation analysis-based bioinformatics algorithm can be an effective method for identification of the extracellular vesicle-based biomarker candidates in human melanoma*” mogłaby być bardziej precyzyjnie sformułowana w kontekście możliwości walidacji i oceny opracowanej metody. Można rozważyć doprecyzowanie „*effective method for identification*”.
- Jakie są ograniczenia i ryzyka związane ze stosowaniem CCA do danych multiomicznych?
- Czy rozważono innych kandydatów na macierz wejściową do analizy sCCA?
- Wysoko oceniam dobór literatury, jednakże w mojej ocenie warto byłoby precyzyjnie porównać cechy opracowanej metody z rozwiązaniami dostępnymi w literaturze w oparciu o kryteria ilościowe lub jakościowe.
- Autorka na str. 33 wskazuje, że „*In this thesis, a new method of miRNA isolation from microvesicles, which uses centrifugation and Hydrostatic Filtration Dialysis (HFD), has been proposed.*”, nie zostało to jednak opisane w podrozdziale 1.1 Thesis objectives.
- Czy można wskazać kryterium jakościowe opracowanego rozwiązania i przedstawić wskaźnik oceny przedstawionego rozwiązania?

- Autorka stwierdza, że *„A big problem in developing and validating CCA-based bioinformatics tools is a small amount of relevant publicly available experimental data”*, warto rozważyć genezę tego problemu.
- Jaką metodę komplementarną można wykorzystać w dalszych badaniach?
- Czy Doktorantka analizowała możliwość zastosowania metod sztucznej inteligencji?

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy, którą oceniam bardzo wysoko. Podsumowując stwierdzam, że praca Pani mgr Sonii Wróbel spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Za najważniejsze osiągnięcie Autorki uznaję opracowanie oryginalnej metody integracji danych z różnych poziomów organizmu żywego i jej zastosowanie w celu zidentyfikowania ważnych sygnatur molekularnych, które mogą być kandydatami nowych biomarkerów czerniaka skóry. Praca stanowi interesujące studium badawcze i niesie istotną wartość praktyczną. Zaangażowanie w eksplorację problematyki badawczej widać w dużej aktywności naukowej Doktorantki, która zaowocowała uczestnictwem w grantach badawczych (NCN, NCBiR), pięcioma opublikowanymi artykułami naukowymi o łącznej punktacji ministerialnej 480 punktów oraz uczestnictwem w sześciu międzynarodowych konferencjach naukowych, co w mojej ocenie jest znaczącym osiągnięciem.

Podsumowując moją opinię stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wymagania przewidziane dla rozpraw doktorskich w obowiązujących przepisach przeto **wnoszę o przyjęcie tej rozprawy i o dopuszczenie jej Autorki mgr Sonii Wróbel do jej publicznej obrony. Ponadto, biorąc pod uwagę znaczące osiągnięcia naukowe Pani mgr Sonii Wróbel wnoszę o wyróżnienie rozprawy.**

Kontech