

**Prof. dr hab. Krzysztof Zabłocki**  
Instytut Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

Warszawa, 22 listopada 2020r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Igi Wasilewskiej  
„Rola białka Stim2 w procesie neurodegeneracji u *Danio rerio*”,  
wykonanej pod kierownictwem promotora prof. dr. hab. Jacka Kuźnickiego w  
Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska łączy w sobie dwa zagadnienia, które są ważne zarówno z punktu widzenia poznawczego jak i potencjalnie aplikacyjnego. Są to: regulacja homeostazy wapniowej ze szczególnym uwzględnieniem pojemnościowego napływu jonów wapnia oraz procesy neurodegeneracyjne. Oba te obszary są intensywnie badane w bardzo wielu laboratoriach i klinikach na świecie i mimo niewątpliwych sukcesów jeszcze wiele pracy jest konieczne do pełnego ich zrozumienia i przede wszystkim wykorzystania tej wiedzy w celach terapeutycznych. Choroby neurodegeneracyjne począwszy od najłagodniejszych form otępienia aż po skrajne przypadki choroby Parkinsona czy Alzheimerera są skutkiem nieprawidłowego funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Chociaż podstawy etiologiczne tych chorób często nie są oczywiste i nie są jednorodne nawet w obrębie każdego z zespołów, wydaje się, że w patofizjologii tych anomalii zazwyczaj wpisuje się zaburzenie sygnalizacji wapniowej oraz ściśle z tym powiązany nieprawidłowy i w efekcie niewydajny metabolizm energetyczny komórki. Ze względu na to, że pobudliwość neuronów związana jest w dużej mierze ze zmianami stężenia jonów wapnia w komórkach, a ściślej w ich specyficznych przedziałach (cytosolu, siateczka śródplazmatyczna, mitochondria) jest oczywiste, że uzyskanie możliwości farmakologicznego wpływu na homeostazę wapniową jest bardzo kuszącą i już w znacznej mierze stosowaną strategią terapeutyczną w przypadku dysfunkcji OUN. Prawidłowa sygnalizacja wapniowa wymaga współdziałania wielu białek i struktur komórkowych objętych wspólną nazwą narzędzi molekularnych. Spektakularnym przykładem takiego współdziałania jest regulacja pojemnościowego napływu  $\text{Ca}^{2+}$  do komórek, wymagająca udziału białek błony plazmatycznej i siateczki śródplazmatycznej jako głównych partnerów oraz mitochondriów jako modulatora intensywności sygnału wapniowego. Mechanizm ten po raz pierwszy opisany w połowie lat 80-tych ubiegłego wieku początkowo był przypisywany komórkom niepobudliwym elektrycznie, ale wkrótce wykazano jego powszechność. Natomiast wyjaśnienie mechanizmu sprzęgającego opróżnienie magazynów wapniowych w siateczce śródplazmatycznej z aktywacją napływu  $\text{Ca}^{2+}$  do komórki zajęło kolejne 20 lat. Następne lata przynoszą szereg nowych informacji, które uściślają naszą wiedzę i ujawniają niepoznane dotąd mechanizmy regulacyjne, a także pozwalają na zrozumienie specyficznej roli napływu pojemnościowego w różnych tkankach i narządach w warunkach normy i patologii. Dzisiaj wiemy jak ten proces przebiega i w dużej mierze wiemy też jakie są jego funkcje w komórce,

ale to nie znaczy, że wiemy wszystko na ten temat. Praca Pani mgr Igi Wasilewskiej wpisuje się dobrze w tę tematykę badawczą i wychodzi naprzeciw oczekiwaniom zarówno badaczy-neurologów jak i lekarzy terapeutów, którzy intensywnie poszukują sposobów zapobiegania chorobom neurodegeneracyjnym i ich leczenia.

Niniejsza rozprawa jest napisana po polsku i ma układ typowy dla tego typu opracowań, może tylko z tym wyjątkiem, że na początku zamieszczony jest spis tabel i rycin, jakie pojawiają się w pracy, co nie jest powszechnie spotykane. Następnie umieszczone są kolejno: wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski. Rozprawę kończy spis publikacji Doktorantki obejmujących wyniki przedstawione w pracy doktorskiej oraz wykaz piśmiennictwa zawierający 163 pozycje z czego 57 ukazało się po roku 2015, co potwierdza aktualność podjętych badań.

Postępując kolejno zgodnie z układem pracy chciałbym najpierw zwrócić uwagę na Spis skrótów, w którym pojawia się „centralny .....” zamiast „ośrodkowy układ nerwowy”, a poprawna nazwa IP3 to inozytolo 1,4, 5 – **trifosforan**. W Streszczeniu pracy Autorka stwierdziła, że białko Stim jest czujnikiem „poziomu wapnia”. To samo uchybienie pojawia się też w dalszych częściach pracy. Samo określenie „poziom wapnia”, chociaż stosowane chętnie w języku polskim jak i angielskim jest bardzo nieprecyzyjne. A w przypadku białka Stim, innych białek wiążących jony wapnia oraz sond fluorescencyjnych parametrem kluczowym jest stężenie  $Ca^{2+}$ . Nie zatrzymując się tutaj na drobnych uchybieniach i niezręcznościach (niektóre wymienię na końcu recenzji), przejdźmy do następnego podrozdziału.

Wstęp do Rozprawy podzielony jest na kilka podrozdziałów, w których Doktorantka kolejno omawia (i) zjawisko pojemnościowego napływu jonów wapnia do komórek ze szczególnym uwzględnieniem zaangażowanych białek i naciskiem na Stim, (ii) regulację gospodarki wapniowej w neuronach z naciskiem na znaczenie białek Stim, (iii) skupia się na zaburzeniach gospodarki wapniowej w neuronach w patofizjologii chorób neurodegeneracyjnych, (iv) omawia skutki fenotypowe wywołane wyłączeniem ekspresji genu kodującego Stim2, (v) przedstawia możliwości wykorzystania Danio přegowanego w badaniach neurobiologicznych wyróżniając w tym podrozdziale trzy wątki dotyczące kolejno przyżyciowego obrazowania, możliwości prowadzenia badań behawioralnych oraz badania sygnalizacji wapniowej.

Lektura tej części pracy dobrze wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy, ponieważ dostarcza wszystkich potrzebnych informacji koniecznych dla zrozumienia dalszych rozdziałów, a jednocześnie nie sprawia wrażenia „przeładowania” informacjami w tym miejscu niepotrzebnymi. Chciałbym jednak zwrócić uwagę na fakt, że SOCE nie jest jedyną drogą pozwalającą na uzupełnienie magazynów wapniowych, co mogłoby przyjść na myśl po przeczytaniu poniższego zdania: „Proces, który pozwala na utrzymanie wysokich stężeń  $Ca^{2+}$  wewnątrz ER, przez ich napływ spoza komórki nazywany jest pojemnościowym napływem  $Ca^{2+}$  (SOCE, ang. store-operated  $Ca^{2+}$  entry)”.

Kolejnym rozdziałem są Założenia i cel pracy. Doktorantka uzasadnia w kilku słowach wybór organizmu modelowego a następnie formułuje cele. Pierwsze zdanie określające cel jest bardzo ogólne i przez to niewiele mówiące. W mojej opinii nie jest to

najszczęśliwiej napisany podrozdział, ponieważ ma formę przypominającą raczej zwięzły raport z już wykonanych zadań niż cel i plan działania na przyszłość.

Rozdział Materiał i metody jest napisany bardzo wyczerpująco. W kolejnych podrozdziałach opisane są warunki hodowli stosowane w badaniach ryb (typ dziki linii AB, mutant *stim2b*<sup>-/-</sup> i ryby transgenicznej linii Tg(HuC:GCaMP5G), a także odpowiednie krzyżówki oraz sposób otrzymywania i metoda genotypowania mutantów *stim2b*<sup>-/-</sup>. Dalej opisany jest sposób przeprowadzenia analizy bioinformatycznej, metoda izolowania RNA i jego sekwencjonowania, a także analiza ekspresji genów związanych z sygnalizacją wapniową i ilościowa ocena ekspresji genów. Osobną grupę metod tworzą testy behawioralne, których celem było skorelowanie usunięcia genu *stim2b* ze zmianami zachowania ryb na różnym etapie rozwoju (larwy, osobniki dorosłe). I wreszcie opisana jest metoda przyżyciowej wizualizacji rozmieszczenia jonów wapnia w części głowowej zwierząt. Trzy schematyczne rysunki ułatwiają lekturę tej części rozprawy. Co ważne, Doktorantka wyraźnie zaznaczyła, które z procedur były wykonane przez firmy zewnętrzne lub w ścisłej współpracy z innymi osobami – ekspertami w danej dziedzinie. Podobna informacja zawarta jest w publikacjach obejmujących materiał zawarty w doktoracie. Jest to właściwe postępowanie pozwalające na ocenę udziału Doktorantki w prowadzonych badaniach. Nikt nie może oczekiwać, że tak złożone i trudne technicznie oraz skomplikowane pod względem opracowania danych badania mogą być przeprowadzone bez współpracy ze specjalistami.

Rozdział Wyniki obejmuje 34 strony i jest bogato ilustrowany. Rozpoczyna się porównaniem danych uzyskanych z bazy *Gene* dotyczących genów w jakikolwiek sposób związanych z homeostazą wapniową z wynikami otrzymanymi po analizie transkryptomicznej mózgu dorosłej ryby; stwierdzono obecność 444 transkryptów spośród potencjalnych 491. Analiza funkcjonalna pozwoliła na ustalenie do jakich grup należą ich produkty białkowe uwzględniając lokalizację w komórce (np. błona plazmatyczna, mitochondria, cytosol), funkcje molekularne (np. transporter, enzym, czynnik transkrypcyjny itp.) oraz udział w funkcjonowaniu ścieżek sygnałowych (np. glutaminianergicznej, adrenergicznej itd.). Co więcej, wykazano obecność transkryptów kodujących białka, których funkcja (albo dysfunkcja) są korelowane z chorobami neurodegeneracyjnymi (np. geny szlaku amyloidowego związane z chorobą Alzheimera kodujące białka szlaku presenilinowego lub geny białek związane ze ścieżką sygnałową kojarzoną z chorobą Huntingtona). Na szczególną uwagę zasługuje identyfikacja 63 genów związanych z sygnalizacją wapniową, które nie były wcześniej opisywane u *D. rerio*, w tym sensie, że nie był znany wzór ich ekspresji. Ustalono lokalizację komórkową odpowiadających im białek i przypisano kategorię ortologiczną. Co najciekawsze, analiza qPCR pozwoliła na oszacowanie względnych ilości transkryptów tych genów oraz na porównanie profilu transkrypcji w mózgach dorosłych ryb oraz w głowach larw. Wskazano ogólną tendencję (z jednym tylko wyjątkiem) zwiększania ilości transkryptów wraz z wiekiem, co chyba zgodnie z intuicją, wskazuje na zależną od stopnia rozwoju regulację i rozbudowę zastawu narzędzi związanych z sygnalizacją wapniową w ośrodkowym układzie nerwowym. To samo dotyczy także białek szlaku amyloidowego. Zawężając spektrum badań w kolejnej części wyników Doktorantka skupia się na białkach bezpośrednio związanych z SOCE. Wykazała posługując się techniką RNAseq, obecność

transkryptów wszystkich genów *Stim* i *orai* w mózgach badanych ryb. Znaczne podobieństwo tych genów do ortologów występujących u człowieka oraz obecność kluczowych domen funkcjonalnych sugerują podobieństwo funkcjonalne tych białek u ryb i u ludzi. To podkreśla użyteczność *Danio* przegowanego w badaniach homeostazy wapniowej i możliwość szerszego interpretowania obserwowanych zjawisk. Wykorzystując technikę qPCR porównano poziom i profile ekspresji genów kodujących izoformy białek *orai* i *Stim* w głowach i tułowiach larw, a także w mózgach i innych narządach osobników dorosłych. Zaobserwowane różnice między narządowe oraz związane z procesem dojrzewania oraz starzenia się dorosłych osobników zostały szczegółowo przedstawione na rysunkach. Jak wynika z tytułu rozprawy, jej sedno dotyczy znaczenia genu kodującego białko *stim2b*, a zatem kolejny podrozdział pracy skoncentrowany jest na tym zagadnieniu. Doktorantka wykazała, że wprowadzenie mutacji niwelującej aktywność genu *stim2b* przy pomocy techniki CRISPR/Cas9 nie ma istotnego wpływu na przeżywalność ryb (co najmniej do 20 miesięcy) ani na ich morfologię i zdolności rozrodcze. Natomiast, jak pokazano w kolejnym podrozdziale, brak funkcjonalnego genu *stim2b* nie wywołuje żadnej zmiany kompensacyjnej polegającej na zwiększeniu ekspresji pozostałych trzech paralogów; nieoczekiwanie powoduje obniżenie ekspresji genu jednego z nich. Co więcej, dochodzi do zmniejszenia ilości transkryptów dwóch białek *orai*. Obserwacja ta, ciekawa i w mojej ocenie dość nieintuicyjna, skłania do dyskusji. Przeprowadzenie procedury RNAseq wykazało zwiększenie ekspresji 180 genów i obniżenie ekspresji 96 genów u larw z usuniętym genem *stim2b* w porównaniu do osobników szczepu dzikiego. Wśród genów, których ekspresja jest zmieniona u mutantów były geny związane z rozwojem i aktywnością układu nerwowego, a niekoniecznie albo nie tylko bezpośrednio z homeostazą wapniową. Obserwacje te wskazują, że upośledzenie ekspresji genu *Stim2b* pociąga za sobą daleko idące następstwa wykraczające znacznie poza aktywność SOCE. Ale z drugiej strony, w neuronach warstwy okołokomorowej larw mutantów *Stim2b<sup>-/-</sup>* obserwowano zwiększenie oscylacji wapniowych, co wskazuje wprost na zaburzenie regulacji sygnałów wapniowych u tych mutantów. Nie jest jednak dla mnie oczywiste, czy jest to bezpośredni skutek braku białka *Stim2b* jako jednego z „graczy” w regulacji sygnałów wapniowych z udziałem SOCE, czy też pochodną bardziej złożonych zmian w komórce. Myślę, że nie ma dobrej odpowiedzi na to pytanie, ale może to być zarzewiem dyskusji.

Kolejny wątek poruszony w rozdziale Wyniki dotyczy zmian zachowania larw z mutacją *stim2b<sup>-/-</sup>*. Analizowano parametry lokomotoryczne i wykazano, że larwy mutantów cechują się zwiększoną aktywnością wyrażoną poprzez przebyty dystans, szybkość przemieszczania się i czas jaki był spędzany w ruchu. Wnikliwa analiza danych uzyskanych w teście otwartego pola pokazała, że larwy mutantów wykazują zwiększoną tigmotaksję w stosunku do larw szczepu dzikiego, która przejawiała się dłuższym przebywaniem w peryferyjnej części naczynia. Kolejne badania fizjologiczne wskazały na zaburzenia fototaksji u larw mutantów, a nawet zwiększoną skototaksję. Natomiast podobna reakcja obu linii larw *Danio* na nagły, przejściowy bodziec świetlny sugeruje, że mutanty *Stim2b<sup>-/-</sup>* nie miały zaburzonej zdolności rozróżniania światła i ciemności. Kontynuując doświadczenia neurofizjologiczne, Doktorantka wykazała także, że mutanty pozbawione funkcjonalnego białka *Stim2b* charakteryzują się zmienioną i nie zależną wprost od dawki wrażliwością na substancję stosowaną do wywoływania drgawek. Co więcej mutanty charakteryzowały się

zwiększoną odpowiedzią na glutaminian ale tylko w warunkach zmniejszonej aktywności lokomotorycznej (oświetlenie). Podsumowując, uzyskanie takiego spektrum danych jakie zostały przedstawione w rozdziale Wyniki wymagało wielkiego nakładu pracy oraz bardzo szerokiego spojrzenia na badane zjawiska.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka przedstawia swoje wyniki odnosząc się do danych piśmiennictwa. Rozdział ten dobrze się czyta ale w mojej opinii zachwiana jest proporcja między ponownym i zbyt dokładnym opisywaniem uzyskanych danych a szerszym ich przedyskutowaniem na tle dostępnej literatury. *Danio* jest zwierzęciem modelowym wykorzystywanym jako uzupełnienie badań na organizmach bardziej zaawansowanych ewolucyjnie ale zazwyczaj nie jest modelem alternatywnym w stosunku do ssaków (m.in. w badaniach sygnalizacji wapniowej). Dlatego zastanawiałbym się, czy nie warto było trochę poszerzyć dyskusję odnosząc się do danych dla innych gatunków w stopniu większym niż to przedstawiono. Poddaję tę myśl pod rozważę, nie traktując tego jako szczególnej krytyki. Rozdział Wnioski jest w istocie krótkim streszczeniem tego co zostało zrobione, a rzeczywista konkluzja zamknięta jest w jednym bardzo ogólnym zdaniu: „*Podsumowując, brak Stim2b zaburza funkcjonowanie neuronów w mózgu Danio pręgowanego, co ujawnia się m.in. zmianami w zachowaniu tych ryb. Zaobserwowane odchylenia mogą wskazywać na udział Stim2b w procesach prowadzących do zmian patologicznych, w tym np. pojawienia się zachowania przypominającego drgawki*”. Pozostając przy tej konkluzji warto może rozważyć problem specyficzności obserwowanych skutków pozbawienia ryb genu *Stim2b*. Mam na myśli to, że białko Stim2b jest jednym z elementów „maszyny wapniowej” w komórkach, którego aktywność jest konieczna dla zachowania właściwej sygnalizacji  $Ca^{2+}$ . Może zatem być tak, że usunięcie jakiegokolwiek z tych elementów może doprowadzić do zaburzenia tej sygnalizacji i podobnych skutków fenotypowych. Autorka wspomina o podobnych wynikach uzyskanych dla mutantów pozbawionych białka Stim1.

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć stanowiących o wartości pracy i jej nowatorstwie zaliczyłbym: (i) Scharakteryzowanie transkryptomu *Danio* ze wskazaniem na geny związane z homeostazą wapniową, a zwłaszcza opisanie wzorca ekspresji genów wcześniej nie scharakteryzowanych u tego gatunku (ii) scharakteryzowanie profili ekspresji genów związanych z SOCE w różnych narządach zwłaszcza w kontekście wieku ryb, (iii) pokazanie, że eliminacja genu *Stim2b* powoduje zmianę ekspresji wielu pozornie niepowiązanych genów (nawiasem mówiąc ta obserwacja komplikuje interpretację wyników i przypisywanie pewnych cech bezpośrednio brakowi genu *Stim2b*) (iv) przeprowadzenie złożonych obserwacji behawioralnych, które wskazują na neurologiczne następstwa usunięcia genu *Stim2b*.

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie były w większości wcześniej opublikowane w dwóch pracach, które ukazały się w renomowanych czasopismach o międzynarodowym zasięgu.

Moje uwagi i komentarze zamieszczone w recenzji nie zmniejszają pozytywnej oceny pracy i są raczej zachętą do dyskusji bardzo złożonych zależności przedstawionych przez Doktorantkę niż krytyką.

Dlatego uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca Pani mgr Igi Wasilewskiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymogami określonymi w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenia Pani mgr Igi Wasilewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



W rozprawie natknąłem się drobne uchybienia i niedoskonałości edytorskie nie mające żadnego wpływu na treść i ładunek merytoryczny pracy. Niektóre przykłady umieszczam na końcu, kierowany poczuciem obowiązku recenzenta.

CNS to po polsku ośrodkowy układ nerwowy, a nie centralny układ nerwowy

IP3 to po polsku inozytolo 1,4,5 – trisfosforan

Stim działa jako czujnik stężenia, a nie poziomu wapnia (ta sama uwaga stosuje się do wszystkich części rozprawy). Poziom wapnia niewiele znaczy po polsku. Podobnie poziom białka Stim2 (jak wyrazić poziom?).

Zamiast behavior – zachowanie.

Cytosolu, a nie cytozolu. Także w dalszych częściach pracy. Co prawda cytozol pojawia się powszechnie w piśmiennictwie ale zgodnie z sugestiami PTBioch cytosol jest lepszy.

Chyba nie ma potrzeby objaśniania skrótów w tekście, skoro są objaśnione w obu językach w spisie skrótów. Jak jest pełna nazwa „jony wapnia” to nie ma potrzeby dodawania w nawiasie ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

Regulacja procesu pojemnościowego napływu... chyba słowo „procesu” nie jest potrzebne. Unikałbym terminu „poziom  $\text{Ca}^{2+}$  w ER” ponieważ Stim nie reaguje na „poziom” tylko na stężenie, a miarą kinetyki tej reakcji jest stała dysocjacji.

„Ryby dzikie” nie brzmi dobrze, chociaż wiadomo o co chodzi. Może linia dzika?

Organelle czy organella (biernik l. mn.)

Białko raczej nie posiada lecz zawiera reszty cysteiny, lub ma...

Co to jest „tkanka oczu”? Oczy nie są tkanką ale z różnych tkanek zbudowanym narządem

Ujednoliciłbym pisownię nazw genów i białek (por. tabela skrótów i pozostały tekst)