



Kraków, 21 grudnia 2020 r.

Dr hab. n. med. Katarzyna Starowicz-Bubak, prof. IF PAN

**RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ**

**mgr Igi Wasilewskiej**

**pt. " Rola białka Stim2 w procesie neurodegeneracji u *Danio rerio*"**

wykonana w Laboratorium Neurodegeneracji  
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie  
pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Kuźnickiego

Kationy wapnia są fundamentalnymi transmiterami sygnału w komórce. Odpowiadają za stabilizowanie potencjału błonowego oraz kontrolę pobudliwości miocytów i neuronów. Wpływ sygnalizacji wapniowej na wiele aspektów biologii komórki odzwierciedla kluczową rolę sygnałów wapniowych w kontrolowaniu różnych funkcji komórkowych. Pomimo precyzji, z jaką przestrzenne i czasowe elementy szlaków sygnałowych wapnia zostały poznane, podstawowy aspekt generowania sygnałów wapniowych czyli 'store-operated channels' (SOC) pozostaje pod względem molekularnym i mechanistycznym nie do końca poznanym zjawiskiem. Stymulacja receptorów powierzchniowych powoduje wzrost stężenia cytozolowych jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ), które pochodzą głównie z dwóch źródeł: wewnątrzkomórkowej siateczki śródplazmatycznej (ER), magazynów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Główna kaskada wnikania  $\text{Ca}^{2+}$  do komórek układu odpornościowego przebiega przez kanały wejściowe  $\text{Ca}^{2+}$  „sterowane magazynem” (SOCE) i  $\text{Ca}^{2+}$  aktywowane uwalnianiem  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC). Aktywacja SOCE jest wyzwalana przez wyczerpanie wewnątrzkomórkowych zapasów ER  $\text{Ca}^{2+}$ , ale mechanizm molekularny wciąż jest nie do końca zbadanym zagadnieniem. Dzięki niedawnej identyfikacji molekularnej czujnika  $\text{Ca}^{2+}$  w ER: białek STIM (ang. stromal interaction molecule) oraz kanałów ORAI, nasza wiedza na temat ścieżki aktywacji SOCE wzrosła. Postępy te, włączając w nie wyniki niniejszej pracy, pozwalają rzucić nowe światło na pytanie o fizjologiczne znaczenie SOCE.

Przedstawiona do recenzji 110-stronicowa rozprawa doktorska ma typowy układ edytorski. W obszerny, liczącym 14 stron (str. 15-28) wstępie doktorantka przedstawia podstawy teoretyczne pozwalające w pełni zrozumieć badany mechanizm. Odbiór tekstu znacząco ułatwiają ryciny. Autorka omawia szeroki wachlarz zagadnień związanych z tematem pracy m.in. zjawisko pojemnościowego napływu wapnia (SOCE) i jego kluczowych składników

czyli białek STIM; regulację gospodarki wapniowej w neuronach i udział białek STIM; zaburzenia neuronalnej gospodarki wapniowej w chorobach neurodegeneracyjnych; fenotyp spowodowany wyłączeniem ekspresji STIM2 oraz zastosowanie danio pręgowanego w neurobiologii. Na przestrzeni ostatniej dekady nastąpił gwałtowny wzrost popularności ryby danio pręgowanego jako organizmu modelowego w wielu dziedzinach badań biologicznych i biomedycznych, doktorantka przybliży więc czytelnikowi metody przyżyciowego obrazowania aktywności neuronalnej u ryb, badania behawioru larw danio pręgowanego oraz homeostazy i sygnalizacji wapniowej danio pręgowanego. Ta część wstępu stanowi niezmiernie ciekawe wprowadzenie do metodologii badań, tj. metod mikroskopowych, behawioralnych oraz aspektów pracy z danio pręgowanym, dzięki czemu wartość pracy staje się w pełni zrozumiała nawet dla osoby nie wyspecjalizowanej w badaniach w tej dziedzinie. Powyższe dowodzi również dużej wiedzy doktorantki w zakresie tematyki rozprawy. Materiały i metody zostały dokładnie opisane i wzbogacone odpowiednimi rycinami zawierającymi szczegółowe dane. Obszerny opis metodologii (str. 30-42) wskazuje na bardzo dobrą znajomość przez doktorantkę metod wykorzystywanych w rozprawie. Uzyskane wyniki przedstawiono na 50 stronach (str. 46-95), zawierających 18 rozbudowanych rycin (Ryciny 7-24) oraz 4 tabele (Tab. 6-9). Zarówno ryciny jak i tabele cechuje przejrzysta konstrukcja i są prawidłowo opisane. Uwagę zwraca obszerna i rzeczowa interpretacja uzyskanych wyników, w tym wyników informatycznych, molekularnych i behawioralnych. Mocną stroną pracy jest interesująca dyskusja (str. 82-95), która została podzielona na podrozdziały adekwatne do realizowanych kolejno zadań badawczych. Autorka ostrożnie i krytycznie analizuje uzyskane wyniki i podejmuje próbę wyjaśnienia złożonych i wciąż słabo z badanych mechanizmów badań nad homeostazą wapniową w mózgu u danio pręgowanego, co świadczy o jej dłużej dojrzałości naukowej. Szczególną uwagę zwraca dogłębna dyskusja badań behawioralnych, która szczegółowo nawiązuje do obserwacji molekularnych. W podsumowaniu adekwatnie do postawionych celów rozprawy doktorskiej doktorantka przypomina najważniejsze wyniki swoich badań. Rozprawę uzupełnia obszerny spis piśmiennictwa, liczący 163 pozycje.

Doktorantka odpowiednio podzieliła otrzymane wyniki na podrozdziały, co świadczy o dokładnym całościowym przemyśleniu przez autorkę otrzymanych wyników a także o jej doświadczeniu w ich prezentowaniu. Doktorantka rozpoczęła prezentację wyników od przedstawienia funkcjonalnej ekspresji genów zidentyfikowanych jako kodujące składniki maszyny komórkowej kontrolującej homeostazę wapniową i ścieżki sygnałowe zależne od jonów wapnia (CaTK, ang. calcium toolkit), wyniki te zostały potwierdzone przez sekwencjonowanie RNA (RNAseq) wyizolowanego z mózgów dorosłych ryb danio pręgowanego. Następnie poziom mRNA dla wybranych genów o nieznanym wzorze ekspresji został zwalidowany techniką qPCR. Wśród ponad 400 zidentyfikowanych genów CaTK danio pręgowanego aż 63 geny nie posiadały scharakteryzowanego wzoru ekspresji w tym organizmie i zostały po raz pierwszy wykryte w mózgu ryby. Dodatkowo doktorantka przeprowadziła analizę ekspresji nowo wykrytych genów CaTK w mózgu danio pręgowanego wraz z lokalizacją komórkową kodowanych przez nie białek (błona komórkowa, cytozol,

mitochondrium, macierz zewnątrzkomórkowa, siateczka śródplazmatyczna). Doktorantka wykazała, że około 40% z badanych genów wykazywało podobny poziom ekspresji w obu analizowanych stadiach (larwa i dorosła postać danio), jednak dla większości z nich poziom transkryptów był istotnie wyższy w mózgu dorosłej ryby, niż u larwy. Jedynym wyjątkiem był gen *trpm4* (gen kanału przepuszczalnego dla kationów, którego aktywność wzrasta wraz ze wzrostem stężenia wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$ ).

Kolejnym etapem rozprawy doktorskiej była szczegółowa analiza obecnych u danio pręgowanego genów kodujących białka zaangażowane w SOCE, tj. białek Stim i kanałów Orai, a następnie scharakteryzowaniu fenotypu związanego z wyłączeniem ekspresji jednego z uprzednio analizowanych genów – *stim2b*. Ryby z wyłączoną ekspresją *stim2b* nie wykazywały znacznej śmiertelności ani zmian morfologicznych, a analiza żywotności larw od 6 hpf do 5 dpf nie wykazała statystycznie znaczących odchyżeń od larw WT. Dojrzałe osobniki były płodne i przeżywały co najmniej 20 miesięcy. Praca autorki wykazała, że u mutantów *stim2b*<sup>-/-</sup> poziom mRNA dla *stim2b* był istotnie obniżony, przy jednoczesnym braku kompensacyjnej zmiany w ekspresji paralogów *stim2b*, tj. *stim2a*, *stim1a* i *stim1b*. Co więcej doktorantka określiła jak brak funkcjonalnego białka Stim2b wpłynie na ekspresję genów u danio pręgowanego, porównując transkryptom larw 5 dpf *stim2b*<sup>-/-</sup> i WT przy użyciu RNAseq. Analiza wykazała ok. 100 genów o obniżonym i ok. 200 genów o podniesionym poziomie mRNA u larw *stim2b*<sup>-/-</sup> w porównaniu z rybami WT. Kolejnym krokiem była analiza aktywności neuronów larw *stim2b*<sup>-/-</sup> poprzez rejestrację zmiany w poziomie  $Ca^{2+}$  przy użyciu genetycznie kodowanej sondy wapniowej GCaMP5G. Tu po raz kolejny doktorantka wykazała się znajomością nowoczesnej i trudnej metodycznie techniki i z wykorzystaniem mikroskopu typu SPIM i transgenicznymi larwami danio pręgowanego wykazującymi neuronalną ekspresję GCaMP5G i pokazała wyższą częstotliwość oscylacji  $Ca^{2+}$  w neuronach larw *stim2b*<sup>-/-</sup>.

Niezmiernie ciekawym etapem prac autorki było zbadanie czy przedstawione powyżej zmiany w ekspresji genów i aktywności neuronalnej korelują ze zmianami w zachowaniu larw *stim2b*<sup>-/-</sup>. Autorka wykazała nadaktywność lokomotoryczną larw *stim2b*<sup>-/-</sup>, wykazała też że mutanci *stim2b*<sup>-/-</sup> charakteryzują się wyższym poziomem tigmotaksji. Doktorantka podjęła się również oceny reakcji wzrokowo-motorycznej u mutantów *stim2b*<sup>-/-</sup>, która pomimo nieprawidłowości w fototaksji, nie wpływała na ich reakcje w teście reakcji wzrokowo-motorycznej. W końcowym etapie pracy autorka wykazała, iż brak funkcjonalnego białka Stim2b wpływa na reakcję larw na substancje modulujące sygnalizację GABA- i glutamatergiczną. W przeprowadzonych doświadczeniach w obecności substancji drgawkotwórczej larwy *stim2b*<sup>-/-</sup> wykazywały wyższą podatność na drgawki wywołane niską dawką PTZ (blokującą neurotransmisję GABAergiczną), a na wysoką dawkę PTZ reagowały słabiej niż larwy WT. Autorka zbadła też rolę pobudzającej neurotransmisji glutaminergicznej i wykazała silniejszą odpowiedź na glutaminian u mutantów *stim2b*<sup>-/-</sup> niż larw WT, ale wyłącznie dla warunków nagłej ekspozycji na światło, która powodowała redukcję aktywności lokomotorycznej larw.

Przedstawioną rozprawę oceniam wysoce pozytywnie. Należy stwierdzić, że doktorantka uzyskała nowe, interesujące wyniki. Niniejsza praca doktorska zawiera kompleksowy opis genów maszynerii komórkowej regulującej homeostazę wapniową, które ulegają ekspresji w mózgu danio, jak również opis ekspresji genów kodujących białka SOCE w różnych tkankach danio i charakteryzuje funkcje białka Stim2b w ośrodkowym układzie nerwowym danio pręgowatego. Dzięki przeprowadzonym badaniom autorka wykazała, że danio pręgowane stanowi odpowiedni model do badań nad sterowaniem homeostazą wapniową w komórkach, pozwalający na obserwowanie procesów zachodzących w żywym organizmie. Dużym atutem pracy jest wykorzystanie metod bioinformatycznych do wstępnego przesiewu wszystkich potencjalnych celów molekularnych oraz dogłębna funkcjonalna interpretacja uzyskanych wyników. Tutaj zabrakło jedynie wizualnego przedstawienia interakcji białkowych. Satysfakcjonujący i ułatwiający odbiór uzyskanych wyników jest również podział poziomu transkryptów genów CaTK ze względu na lokalizację i funkcjonalność przedstawiony na Rycinach 10 - 12. Bardzo dogłębnie przeprowadzona jest analiza genomiczna badanego modelu jak również analiza behawioru. Praca z pewnością w znacznym stopniu przyczynia się do rozwoju dziedziny (chciałabym jedynie zwrócić uwagę ze bardziej w kontekście padaczki niż chorób neurodegeneracyjnych).

Autorka nie ustrzegła się nielicznych błędów edytorskich i stylistycznych jak np. nazwanie ośrodkowego układu nerwowego centralnym układem nerwowym czy częste zwroty w pierwszej osobie: „W dniu tarła przegroda była usuwana, a około 30 min później zbierałam ikrę przy użyciu sitka.” Nie znalazłam w dysertacji informacji na temat sprawdzania integralności RNA, niejasne są dla mnie kryteria dotyczące poziomu względnej ekspresji nowo wykrytych genów (niski, średni, wysoki). Podobnie doprecyzowania wymaga określenie intensywność oświetlenia, która wynosiła 70% i nasuwa się pytanie czym było wyjściowe 100%. Ponadto tytuł dysertacji „Rola białka Stim2 w procesie neurodegeneracji u *Danio rerio*” nie jest w pełni adekwatny do opisanych wyników, które w znakomitej większości pokazują zachowania lękowe/padaczkę, natomiast nie odnoszą się do chorób neurodegeneracyjnych, te są omawiane wyłącznie w dyskusji w kontekście ekspresji genów.

Moim obowiązkiem jako recenzenta była ocena nie tylko aspektów merytorycznych, ale i interpretacyjnych dysertacji mgr Igi Wasilewskiej, tak więc z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kilka aspektów interpretacji wyników.

- Doktorantka stwierdza „***Dane dotyczące zwierząt z wyłączoną ekspresją STIM2 pochodzące z różnych laboratoriów nie są całkowicie spójne.***” Prosiłabym o rozwinięcie tego wątku, szczególnie w kontekście informacji zawartych w samej pracy. We Wstępie autorka pisze: „***W mysim modelu choroby Alzheimera, w którym, jak wcześniej wspomniano, poziom STIM2 ulega redukcji [34], zaobserwowano zwiększoną pobudliwość neuronów [58]. Natomiast, w mysim modelu drgawek oraz u pacjentów z epilepsją wykryto podniesiony poziom STIM2 w hipokampie [24].***” Stad pytanie, dlaczego pobudliwość neuronów zwiększa się w oby przypadkach, gdy ekspresja STIM2 zarówno zwiększa lub zmniejsza się. Wcześniejszy akapit poniekąd to tłumaczy: „***Powyższe nie całkiem spójne***

obserwacje wskazują na złożoność mechanizmów kontrolujących pobudliwość neuronów, w których bierze udział STIM2 i potrzebę dalszych badań.” jednak niewystarczająco. Dalej w dyskusji autorka pisze „Tylko w kilku opublikowanych do tej pory pracach dotyczących funkcji STIM2 w neuronach opisano zachowanie zwierząt z wyłączoną ekspresją STIM2 lub nadprodukcujących to białko. Jednak wyniki tych eksperymentów są niejednoznaczne. Myszy, nadprodukujące STIM2 i ORAI1 w neuronach, wykazywały spadek w poziomie lęku, a wzrost eksploracji areny w teście otwartego pola (ang. *open field*) i więcej czasu spędzały na otwartych ramionach uniesionego labiryntu krzyżowego (ang. *elevated plus maze*), niż myszy WT [62]. Myszy z podwójną wyciszoną ekspresją zarówno *Stim1* jak i *Stim2* w przodomózgowiu również spędzały więcej czasu na otwartych ramionach uniesionego labiryntu krzyżowego, co sugeruje większą skłonność do eksploracji i niższy poziom lęku [61]. Wydaje się zatem, że wyłączenie ekspresji białek STIM1 i STIM2 u myszy wywarło podobny wpływ na zachowanie jak nadprodukcja białek STIM2 lub ORAI1.” więc tym bardziej warto przedyskutować skąd mogą wynikać te niespójności.

- Kolejne pytanie związane jest z interpretacją poniższych wyników: „Mutanty *stim2b*<sup>-/-</sup> wykazywały znacznie wyższą aktywność lokomotoryczną po przeniesieniu do nowej płytki, niż larwy WT. Również tigmotaksja u tych larw była bardziej nasiloną i larwy *stim2b*<sup>-/-</sup> spędzały więcej czasu w pobliżu ścianek dołka, niż larwy WT. Uważa się, że tigmotaksja u larw danio pręgowanego jest związana z poziomem lęku u tych zwierząt [76,110]. Zatem wyniki testu otwartego pola i pomiaru poziomu tigmotaksji wskazały na wzrost poziomu lęku u larw *stim2b*<sup>-/-</sup>. Aby zweryfikować, czy zachowanie mutantów *stim2b*<sup>-/-</sup> wynika z podniesionego poziomu lęku, przeprowadziłam test preferencji światła. Wcześniejsze badania wykazały, że tendencja larw danio pręgowanego do unikania ciemności jest dodatnio skorelowana z ich poziomem lęku [76]. Test preferencji światła wykazał zaburzenia fototaksji u mutantów *stim2b*<sup>-/-</sup>, które w przeciwieństwie do larw WT nie wykazywały jednoznacznej tendencji do przebywania w oświetlonej części szalki, a wręcz u części z mutantów zaobserwowałam odwrotną tendencję, skototaksję. Zatem, w przeciwieństwie do wyników testu otwartego pola, wyniki testu preferencji światła sugerowały redukcję poziomu lęku. By wykluczyć możliwość, że larwy *stim2b*<sup>-/-</sup> miały trudności w rozróżnieniu pomiędzy ciemnością a światłem przeprowadziłam test reakcji wzrokowo-motorycznej [101]. Wyniki tego testu wykazały, że zaburzenia fototaksji larw *stim2b*<sup>-/-</sup> nie były związane z zaburzeniami widzenia. Ponadto test VMR potwierdził nadaktywność larw *stim2b*<sup>-/-</sup>, które miały zwiększoną w porównaniu do larw WT aktywność lokomotoryczną we wszystkich fazach testu, niezależnie od warunków oświetlenia.” Skąd pewność, że zaburzenia fototaksji i tigmotaksji świadczą o lęku? Doktorantka cytuje tutaj

dwie prace, ale w jednej z cytowanych prac przeglądowych (pozycja 76 w spisie literatury) lęk łączony jest z skototaksją.

- W kontekście dwóch zacytowanych poniżej fragmentów dysertacji poproszę o komentarz jak rozróżnić lęk od padaczki. Czy scharakteryzowanie zachowań lękowych u Danio może nie być podatne na nadinterpretację?  
„Wcześniejsze badania, w których larwy danio pręgowanego były traktowane PTZ wykazywały wzrost aktywności lokomotorycznej i zmiany we wzorze pływania, charakteryzujące się właśnie okrężnymi trajektoriami ruchu [84,88]. Zaburzenia w fototaksji mogą być również oznaką *circling behavior* larw *stim2b*<sup>-/-</sup>, które nie jest zależne od oświetlenia. Zaobserwowane w tej pracy zmiany w zachowaniu mutantów *stim2b*<sup>-/-</sup> mogą być zatem związane z aktywnością drgawko-podobną.”  
„Warto również zauważyć, wzrost aktywności neuronalnej w pokrywie wzrokowej został opisany wcześniej jako jeden z efektów wywołania drgawek u larw danio pręgowanego [162]. Zachowanie mutantów, podniesiona częstotliwość aktywności neuronalnej oraz zmiany w ekspresji kilku genów takich, jak *anxa3a* i *smc1a*, mających związek z epileptogenezą wskazują, że brak białka *Stim2b* zwiększa pobudliwość neuronów i prowadzi do pojawiania się drgawko-podobnych zachowań.”
- Pragnę jeszcze zwrócić uwagę na fragment dotyczący aktywności receptora GPR39. Autorka pisze: „Zaobserwowaliśmy również prawie trzykrotny wzrost poziomu mRNA genu kodującego cynkowy receptor *Gpr39* sprzężony z białkiem G. Receptor ten wykrywa zmiany w zewnątrzkomórkowym poziomie jonów  $Zn^{2+}$ . Wykazano, że aktywność receptora GPR39 może redukować nadmierną pobudliwość neuronów podczas drgawek poprzez wzmacnianie neurotransmisji GABAergicznej [149]. Zatem, podniesiony poziom ekspresji *gpr39* mógł wpływać na odpowiedź larw *stim2b*<sup>-/-</sup> na PTZ i chronić je przed nadmierną aktywnością neuronalną wywołaną przez wysoką dawkę tego związku. Pokazano również, że GPR39 bierze udział w regulacji zachowania związanego z lękiem, a jego poziom rósł po podaniu antydepresantów [150].” Moją uwagę zwrócił fakt, że cytacje to prace przeglądowe, stąd pytanie czy istnieją dane dotyczące farmakologicznej aktywacji/blokady GPR39 u Danio czy nawet *stim2b*<sup>-/-</sup>? Autorka wspomina też o opublikowanych pracach z *stim2a*<sup>-/-</sup> które miało wywoływać podobne efekty do *stim2b*<sup>-/-</sup>. Chciałabym poprosić o dokładniejsze porównanie i czy wskazanie czy były jakieś różnice.

Wymienione przeze mnie uwagi krytyczne nie umniejszają znaczenia odkryć dokonanych przez Doktorantkę i są przede wszystkim otwartą dyskusją na temat formy prezentacji wyników i celów naukowych. Liczba nowoczesnych metod badawczych

zastosowanych w rozprawie jest imponująca i świadczy o ogromnej pracowitości i doskonałym przygotowaniu merytorycznym doktorantki. Pracochłonność przeprowadzonych eksperymentów, oryginalność, wysoka wartość poznawcza uzyskanych wyników oraz fakt, że przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki zostały już wcześniej opublikowane w prestiżowych czasopismach upoważnia mnie do złożenia również wniosku o wyróżnienie rozprawy.

Biorąc pod uwagę powyższe, uważam że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 197 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm). Dlatego zwracam się z wnioskiem do wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Igi Wasilewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.