

Prof. dr hab. Grzegorz Hess

Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

Wydział Biologii

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Kraków, 28.09.2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Filipa Maciąga pt. Rola białek STIM i ORAI w wybranych aspektach fizjologii neuronów

Lokalne zmiany stężenia jonów Ca^{2+} w komórce nerwowej związane są z regulacją aktywności licznych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych, posiadających zasadnicze znaczenie dla takich funkcji neuronu, jak np. plastyczność synaptyczna, stanowiąca podłoże uczenia się i pamięci. W komórkach nerwowych za główne drogi, którymi do cytoplazmy mogą z zewnątrz napływać jony Ca^{2+} , uważa się napięciowo-zależne oraz bramkowane ligandem błonowe kanały wapniowe. Natomiast w komórkach niebędących neuronami, podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za utrzymywanie wewnątrzkomórkowej równowagi poziomu jonów Ca^{2+} jest zjawisko noszące w języku angielskim nazwę *store-operated calcium entry* co tłumaczy się na język polski jako pojemnościowy napływ jonów wapnia. Polega on na otwarciu szczególnej grupy błonowych kanałów wapniowych w reakcji na zmniejszenie wewnątrzkomórkowych zasobów jonów Ca^{2+} , zmagazynowanych w siateczce śródplazmatycznej. Wcześniejsze badania zespołu prof. dr. hab. Jacka Kuźnickiego, promotora przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej, wykazały że zjawisko pojemnościowego napływu jonów wapnia występuje również w komórkach nerwowych. Uczestniczą w nim białka błon siateczki śródplazmatycznej, STIM1 i STIM2, których aktywacja prowadzi do otwarcia zlokalizowanych w błonie komórkowej kanałów wapniowych, zbudowanych z białek ORAI.

W przedstawionej rozprawie doktorant postanowił zbadać wpływ nadprodukcji białek STIM1, STIM2 oraz ORAI1 na poziom jonów Ca^{2+} oraz na przekąźnictwo i plastyczność synaptyczną w neuronach hipokampa. Postawił również śmiałą hipotezę, według której łączne podniesienie poziomu białek STIM2 oraz ORAI1 w komórkach piramidowych hipokampa spowoduje zwiększenie spoczynkowego stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie tych neuronów, co może przyspieszać procesy neurodegeneracyjne. W mojej opinii tak postawiony problem badawczy jest trafny i aktualny.

Przedstawiona do recenzji 105-stronicowa rozprawa doktorska ma typowy układ edytorski. W liczącym 19 stron wstępie autor zwięźle omawia szeroki wachlarz zagadnień związanych z tematem pracy, a w tym

mechanizm molekularny pojemnościowego napływu wapnia oraz budowę białek STIM i ORAI, a także podsumowuje wyniki dotychczasowych badań na temat funkcji tych białek w komórkach nerwowych. Wstęp kończy podrozdział na temat związku zaburzeń funkcji białek STIM i ORAI z patofizjologią procesów neurodegeneracyjnych w mózgu, w tym z chorobą Alzheimera. Treść wstępu dowodzi dużej wiedzy doktoranta w zakresie tematyki rozprawy. Słusznie podkreśla on, że w świetle aktualnej wiedzy interesującym zagadnieniem jest zbadanie, czy nadprodukcja białek STIM i ORAI prowadzi do zwiększenia spoczynkowego stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórek nerwowych hipokampa zmodyfikowanych genetycznie myszy, wykazujących nadekspresję badanych białek w mózgu, co mogłoby pociągać za sobą konsekwencje w postaci zainicjowania procesów prowadzących do neurodegeneracji. Szczegółowy opis zastosowanych materiałów i metod, wraz z ilustracjami, zajmuje 22 strony. Uzyskane wyniki przedstawiono na 18 stronach, zawierających 9 rozbudowanych rycin a dyskusja zajmuje 9 stron. Godny uwagi jest obszerny spis piśmiennictwa, liczący 192 pozycje.

Pan mgr inż. Filip Maciąg rozpoczął realizację swojego projektu badawczego od zbadania wpływu nadprodukcji białka STIM1 na homeostazę jonów Ca^{2+} w hodowli neuronów hipokampa pozyskiwanych z zarodków myszy transgenicznych. Przy zastosowaniu obrazowania ratiometrycznego jonów Ca^{2+} z użyciem sondy Fura-4FAM przeprowadził pomiary odpowiedzi wapniowych na depolaryzację komórek przez podwyższone stężenie chlorku potasu. Pomiary te nie wykazały różnic w spoczynkowym poziomie Ca^{2+} jak również w napływie jonów Ca^{2+} po depolaryzacji między grupą eksperymentalną a kontrolną. Podobnie, pomiary wykonane z użyciem sondy Fura-2AM nie wykazały różnic w wartościach wyżej wymienionych parametrów ani w napływie pojemnościowym jonów Ca^{2+} do neuronów w hodowli. Dodatkowo przeprowadzone zostały analogiczne pomiary na skrawkach hipokampa izolowanych z czterotygodniowych myszy z nadprodukcją białka STIM1 i kontrolnych. Uzyskane wyniki nie wskazują na występowanie różnic między tymi grupami ani pod względem spoczynkowego poziomu Ca^{2+} ani pod względem kinetyki napływu tych jonów do komórki, wywołanej różnymi metodami.

Trzon rozprawy doktorskiej pana Filipa Maciąga stanowią badania efektów nadprodukcji białka ORAI1. Pierwsza ciekawa obserwacja, jaką poczynił doktorant, dotyczyła spontanicznych napadów drgawkowych jakie pojawiają się u samic, lecz nie samców, myszy transgenicznych w wieku 15 miesięcy. W celu zbadania mechanizmu tego zjawiska doktorant zastosował rejestracje zewnątrzkomórkowe potencjałów polowych ze skrawków hipokampa myszy w wieku 8 miesięcy. Pomiary te wykazały, że częstotliwość spontanicznych wyładowań, generowanych przez obwody neuronalne znajdujące się w polu CA3 hipokampa pod wpływem dodania 0,5 μ M kwasu kainowego i 5 μ M bikukuliny do płynu inkubacyjnego, jest znamienne obniżona w skrawkach pochodzących od myszy transgenicznych, zaś efekt ten występuje jedynie u samic. Amplituda potencjałów polowych wywołanych w polu CA1 hipokampa samców przez stymulację elektryczną włókien aferentnych w warunkach fizjologicznych, nie wykazała różnic między grupą eksperymentalną a kontrolną. Dalsze badania aktywności elektrofizjologicznej w skrawkach hipokampa, przeprowadzone z zastosowaniem techniki *whole-cell patch-clamp* wykazały, że średnia częstotliwość miniaturowych prądów pobudzających,

rejestrowanych z neuronów piramidowych pola CA1 dorosłych myszy, była znamienne obniżona w preparatach pochodzących z samic myszy transgenicznych w stosunku do kontroli. Wraz z poprzednimi wynikami wskazuje to, iż nadprodukcja ORAI1 wywiera efekty zależnie od płci. W kolejnej serii pomiarów, tym razem wykonanych na neuronach pola CA3, doktorant wykazał, że zmniejszenie częstotliwości prądów pobudzających można wykazać u myszy z nadprodukcją białka ORAI1 w wieku ośmiu, lecz nie dwóch miesięcy, co świadczy o zależności obserwowanych efektów od wieku zwierząt. Jest interesujące, że nie stwierdzono zmian w parametrach, charakteryzujących hamujące przekaźnictwo synaptyczne w tych neuronach. Ostatnia seria doświadczeń, wykonanych na skrawkach pochodzących z myszy z nadprodukcją ORAI1 dotyczyła obrazowania poziomu jonów Ca^{2+} w skrawkach hipokampa pochodzących z czterotygodniowych zwierząt. Wykazały one, iż neurony pochodzące z myszy transgenicznych wykazują odmienną kinetykę odpowiedzi, która może świadczyć o zwiększonej aktywności błonowych kanałów pojemnościowo-zależnych.

Trzecia część programu badawczego, który przeprowadził doktorant, dotyczyła doświadczeń na preparatach pochodzących z podwójnej linii transgenicznej, która wykazuje nadekspresję białek STIM2 i ORAI1. Rozpoczęły ją pomiary przeprowadzone na skrawkach hipokampa uzyskanych z myszy z nadprodukcją STIM2, które nie wykazały istotnych zmian w wewnątrzkomórkowej homeostazie jonów Ca^{2+} . Natomiast efekty, które zaobserwowano w komórkach podwójnej linii transgenicznej, były zbliżone do wyników pomiarów przeprowadzonych na komórkach wykazujących nadekspresję ORAI1. Co istotne, w komórkach z nadprodukcją białek STIM2 i ORAI1 nie wykazano podniesionego spoczynkowego poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Pomiary potencjałów polowych, przeprowadzone na skrawkach hipokampa dwunastomiesięcznych myszy z linii podwójnie transgenicznej, nie wykazały istotnych różnic między grupą eksperymentalną a kontrolną w zakresie bazowego przekaźnictwa synaptycznego oraz krótko- i długotrwałej plastyczności synaptycznej.

Przedstawioną rozprawę oceniam pozytywnie. Należy stwierdzić, że doktorant uzyskał nowe, interesujące wyniki, posiadające znaczenie dla rozwoju badań nad znaczeniem pojemnościowego napływu Ca^{2+} w plastyczności synaptycznej hipokampa i epileptogenezy. Wykazane, istotne zmiany funkcjonalne, związane z nadprodukcją białka ORAI1 w neuronach hipokampa samic myszy, stanowią silne przesłanki do podjęcia dalszych badań, a w dalszej perspektywie mogą mieć znaczenie praktyczne w terapii chorób neurologicznych. Postawiona hipoteza, według której jednoczesna nadekspresja białek STIM2 i ORAI1 może prowadzić do podniesienia spoczynkowego poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplazmie neuronów hipokampa została zweryfikowana negatywnie. Nie umniejsza to jednak faktu, iż wyniki zaprezentowane w rozprawie zostały uzyskane w efekcie starannego przeprowadzenia nowoczesnych, trudnych od strony technicznej, doświadczeń, takich jak m. in. rejestracje *whole-cell patch-clamp* ze skrawków pochodzących ze zwierząt w wieku 8 miesięcy. Świadczy to o doskonałym przygotowaniu metodycznym i dużych umiejętnościach doktoranta w zakresie warsztatu badawczego.

Do niedociągnięć w przedstawionej rozprawie należy niezbyt precyzyjne określenie celu pracy, który byłby bardziej przejrzysty, gdyby sformułowano go w postaci kilku konkretnych zadań badawczych. Pozwoliłoby to, moim zdaniem, uniknąć dysproporcji w prezentacji wyników eksperymentów dotyczących efektów nadprodukcji białka STIM1, którym poświęcono osobny rozdział, i doświadczeń dotyczących efektów nadprodukcji białka STIM2, które jedynie skrótowo opisano na początku rozdziału na temat linii transgenicznej myszy Tg(STIM2/ORAI1)lbd. Interpretacji uzyskanych wyników nie ułatwiają rozbieżności w wieku badanych zwierząt, ponieważ w poszczególnych seriach pomiarów elektrofizjologicznych, badane myszy, określane jako dorosłe, były w wieku od ośmiu do 12 miesięcy a obserwacji behawioralnych dokonano na myszach piętnastomiesięcznych. Trudno też bezpośrednio odnieść do wyników doświadczeń elektrofizjologicznych wyniki obrazowania jonów Ca^{2+} , które wykonywano na skrawkach myszy czterotygodniowych. W tekście nie znalazłem informacji, o ile faktycznie wzrasta poziom białek STIM i ORAI w neuronach hipokampa poszczególnych, badanych linii transgenicznych.

Z obowiązku recenzenta chciałbym również zwrócić uwagę, iż padaczki nie zalicza się do grupy chorób neurodegeneracyjnych (str. 32), choć rzeczywiście, związana z padaczką ekscytotoksyczność może przyczyniać się do neurodegeneracji. Błędny jest również pogląd, że rejestracja miniaturowych prądów postsynaptycznych z komórki piramidowej dostarcza informacji na temat aktywności pojedynczej synapsy (str. 64), ponieważ obserwowane prądy są wynikiem aktywności spontanicznej licznych synaps. Błędem jest również określenie synaps używających w charakterze neuroprzekaźnika glutaminianu jako synaps glutaminergicznych (str. 66), podczas gdy w istocie są to synapsy glutaminianergiczne.

Wymienione uwagi mają jednak przede wszystkim charakter edytorski i nie obniżają mojej pozytywnej oceny merytorycznej strony 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. inż. Filipa Maciąga do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

