

Warszawa, 16.10.2020

Dr hab. Katarzyna Radwańska  
Pracownia Molekularnych Podstaw Zachowania  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polskiej Akademii Nauk

### **Ocena rozprawy doktorskiej**

***pt.: „Rola białek STIM i ORAI w wybranych aspektach fizjologii neuronów”***  
wykonanej przez **mgr. Filipa Maciąga**

w Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego,  
Laboratorium Neurodegeneracji Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i  
Komórkowej w Warszawie

pod kierunkiem promotora **prof. dr hab. Jacek Kuźnicki**  
oraz promotora pomocniczego **dr inż. Łukasza Majewskiego**.

Regulacja komórkowej homeostazy jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) jest jednym z kluczowych procesów biologicznych wpływających na działanie komórek. Ścisła kontrola jonów  $\text{Ca}^{2+}$  zachodzi we wszystkich typach komórek i pozwala między innymi na regulację wewnątrzkomórkowych kaskad przekazywania sygnału, ekspresji genów czy cyklu komórkowego. Jedną z głównych ścieżek napływu  $\text{Ca}^{2+}$  z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do cytoplazmy jest tzw. pojemnościowy napływ wapnia (SOCE), w czasie którego uwalniane są jony  $\text{Ca}^{2+}$  z magazynów siateczki śródplazmatycznej, co powoduje dodatkowy napływ tych jonów ze środowiska zewnątrzkomórkowego przez tak zwane kanały pojemnościowe. Neurony, jako komórki pobudliwe, dodatkowo zdolne są do wytworzenia potencjału czynnościowego w konsekwencji gwałtownego napływu  $\text{Ca}^{2+}$  poprzez aktywację kanałów wapniowych zależnych od napięcia. Ponadto, glutaminian może aktywować receptory jonotropowe przepuszczalne dla jonów wapnia, takie jak receptory NMDA czy niektóre receptory AMPA. Neurony posiadają

zatem wiele mechanizmów regulujących napływ  $\text{Ca}^{2+}$  z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Do niedawna pojemnościowy napływ  $\text{Ca}^{2+}$  nie był uważany za kluczowy dla tego typu komórek. Jednakże, w ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień naukowych potwierdzających obecność w neuronach białek regulujących pojemnościowy napływ  $\text{Ca}^{2+}$ , jak i wykazujących znaczenie pojemnościowego napływu  $\text{Ca}^{2+}$  dla funkcjonowania komórek nerwowych. Co ważne, najnowsze badania łączą zaburzenia tego procesu z etiologią wielu schorzeń neurodegeneracyjnych, w tym etiologią padaczki czy choroby Alzheimerera. Rozumienie funkcji pojemnościowego napływu  $\text{Ca}^{2+}$  dla procesów fizjologicznych i patofizjologicznych komórek nerwowych jest jednak dalekie od pełnego zrozumienia. Zatem badania mechanizmów molekularnych, regulujących proces SOCE, są niezwykle ważne i mogą zaowocować nowymi drogami terapii chorób, które stają się coraz bardziej widoczne w starzejącym się społeczeństwie. Praca doktorska mgr. Filipa Maciąga doskonale wpisuje się w ważny nurt badań, których celem jest zrozumienie wpływu homeostazy wapniowej na funkcjonowanie komórek nerwowych. Podjęcie przez Doktoranta tego tematu badań ma istotne znaczenie poznawcze i potencjał aplikacyjny.

Celem niniejszej pracy było określenie roli białek STIM oraz ORAI, regulujących wpływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z siateczki śródplazmatycznej, w komórkach nerwowych; a w szczególności, w regulacji homeostazy wapniowej, transmisji synaptycznej i plastyczności synaptycznej. W swoje pracy Doktorant zastosował badania hodowli neuronów oraz linie myszy transgenicznych z podwyższoną ekspresją białek STIM1 lub ORAI1 w neuronach mózgu, a także transgeniczną linię STIM2/ORAI1. Zastosowano pomiary elektrofizjologiczne *ex vivo* lokalnych potencjałów polowych oraz funkcji pojedynczych komórek metodą *patch-clamp*, a także obrazowania jonów wapnia z użyciem sond fluorescencyjnych Fura-2 AM oraz Fura-4F AM. Wykazano, że białko ORAI1 reguluje częstotliwość epileptycznych wyładowań międzynaapadowych oraz prądów pobudzających (mEPSC) oraz odpowiedzi wapniowe w polu CA1 hipokampa dorosłych samic. Nie zauważono zaburzeń homeostazy wapniowej w linii myszy z podwyższoną ekspresją białka STIM1. Zaburzenia obserwowane w transgenicznej linii myszy Tg(STIM2/ORAI1)Ibd przypominały te obserwowane u myszy z podwyższoną ekspresją białka ORAI1. O wysokim poziomie przeprowadzonych badań świadczy fakt, że zostały one opublikowane w czterech pracach w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku oddziaływania; oraz to, że badania te zostały wykonane w ramach projektu badawczego finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (MAESTRO NCN nr: 2011/02/A/NZ3/00144). Ponadto

doktorant jest współautorem 2 innych artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach Cells i Biochemical and Biophysical Research Communications.

Praca doktorska mgr. Filipa Maciąga została przedstawiona w formie tradycyjnego opracowania liczącego 105 stron, z typowym układem obejmującym spis treści, spis rycin, wykaz skrótów i opublikowanych prac, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo oraz opinię Komisji Etycznej. Spis piśmiennictwa liczy 192 pozycje. Liczba, zakres i jakość wykorzystanego przy pisaniu dysertacji piśmiennictwa świadczy o rzetelnym przygotowaniu Doktoranta do podjętego tematu badawczego.

*Wstęp* (str. 17-33) zawiera odpowiednie podrozdziały posiadające logicznie sformułowane podtytuły. We wstępie zawarto informacje na temat pojemnościowego napływu wapnia (SOCE) oraz znaczenia SOCE w komórkach niebudliwych. Ponadto podsumowano wiedzę na temat białek STIM i ORAI, a w szczególności na temat roli tych białek w neuronach i ich funkcji w chorobach neurodegeneracyjnych. Wstęp napisany jest niezwykle starannie i ciekawie. Ta część pracy zawiera także estetyczne ilustracje, które podsumowują wiedzę na temat: mechanizmów odpowiedzialnych za wewnątrzkomórkową homeostazę wapnia w neuronach, z uwzględnieniem procesów aktywujących białka STIM i ORAI; oraz budowy domenowej białek STIM1 oraz STIM2 i ich oddziaływania z białkami ORAI. Rozdział jest dobrze przemyślanym wprowadzaniem do problematyki badawczej rozprawy.

W rozdziale drugim- *Założenia i cel pracy* (str. 36) - Doktorant starał się przedstawić cel swoich badań. Cel wyznaczony przez Doktoranta, czyli „Określenie roli białek STIM oraz ORAI w komórkach nerwowych”, jest jednak nazbyt ogólny. W mojej ocenie zabrakło tu precyzyjnie sformułowanych, a zatem testowalnych, problemów lub hipotez badawczych. Zawarte zostały za to informacje (na temat linii myszy transgenicznych), które mogły by być jedynie w sekcji opisującej materiały i metody.

Rozdział *Materiały i metody* (str. 37-58) przedstawia warunki przeprowadzonych doświadczeń oraz stosowane metody badawcze. Opis procedur jest zrozumiały, wyczerpujący i ciekawy, zaś zakres użytych metod imponujący. Doktorant pokusił się nie tylko o opisanie aspektów czysto praktycznych metod, ale także ich historii stosowania, podstaw teoretycznych oraz ograniczeń. Ten aspekt rozdziału zasługuje na szczególną pochwałę, gdyż świadczy o tym, że Doktorant stosował niezwykle trudne metody badawcze bardzo krytycznie i świadomie.

Rozdział ten nie zawiera niestety informacji na temat zasad konstrukcji grup eksperymentalnych oraz przeprowadzonych analiz statystycznych. Informacje te są konieczne do rzetelnej oceny jakości prowadzonych badań i obowiązkowe w tekstach opisujących wynik badań naukowych.

*Wyniki* badań przeprowadzonych przez mgr. Filipa Maciąga (str. 59-85) przedstawione są klarownie, zarówno jeśli chodzi o ich opis jak i prezentację na 8 rycinach zbiorczych. Za silną stroną przedstawionych doświadczeń uważam porównania częstotliwości epileptycznych wyładowań międzynapadowych (Ryc. 6) i pobudzającego przekąźnictwa synaptycznego (Ryc. 7) między samcami i samicami linii Tg(ORAI1)Ibd. Podejście to jest jak najbardziej zgodne z obecnymi trendami badań neurobiologicznych, a ponadto dało bardzo ciekawe wyniki- zaburzenia obu procesów widoczne są jedynie u samic. Szkoda jednak, że w rozprawie nie zawarto informacji na temat analizy poziomu białka ORAI1 u samic i samców. Nie podano także informacje czy takie analizy były kiedykolwiek przeprowadzone. Ten prosty eksperyment mógłby wyjaśnić obserwowane różnice fizjologiczne.

Niestety w rozdziale *Wyniki* podano jedynie bardzo okrojone informacje na temat przeprowadzonych analiz statystycznych danych, a część z nich wydaje się błędna. Żaden z opisanych eksperymentów nie jest opatrzony informacjami na temat statystyki testów, a wartość P jest podana na większości rycin jedynie w sposób przybliżony (na przykład \*  $P < 0.05$ ), podczas gdy w mojej ocenie standardem staje się podawanie dokładnej wartości P. Do analizy danych uzyskanych na temat indukowanych odpowiedzi wapniowych (Ryc. 5 B i C) użyto testów t-studenta, podczas gdy dane te mają strukturę typową dla dwuczynnikowej analizy wariancji. Wielkość grup eksperymentalnych jest często bardzo niska ( $n=3$ ) (Ryc. 5A i B), a ponadto są to dane z pojedynczych szkiełek i jednej hodowli, gdy dla badań *in vitro* za powtórzenie biologiczne raczej uważa się hodowlę, a nie szkiełko. Do oceny długości interwałów między wyładowaniami epileptycznymi (Ryc. 6) użyto testu t-studenta, gdzie skrawek z mózgu był użyty jako powtórzenie biologiczne. Tu znowu nie mogę się zgodzić z wyborem analizy statystycznej przez Doktoranta. Tego rodzaju dane (o ile mają rozkład Gaussowski) powinny być analizowane zagnieżdżonym testem t, gdzie mysz jest powtórzeniem biologicznym, a skrawek powtórzonym pomiarem. Błąd ten powtórzył się przy ocenie miniaturowych prądów pobudzających (Ryc. 7B), pobudzającego oraz hamującego przekąźnictwa synaptycznego i indukowanych zmian odpowiedzi wapniowych (Ryc. 8, 9, 11, 12, tu ze względu na strukturę danych zalecana by była dwuczynnikowa ANOVA). Na rycinie 10, ocena procesu SOCE została wykonana jedynie dla 3

skrawków w grupie kontrolnej i brak informacji na temat analizowanej liczby zwierząt. Brak całkowicie informacji na temat przeprowadzonych testów i ich wyników dla analiz lokalnych potencjałów polowych (Ryc. 13). Tu należałoby przeprowadzić analizę wariancji z powtórzonymi pomiarami dla zwierzęcia (nie skrawka!), jako powtórzenia biologicznego.

*Dyskusja* jest zwięzła i skoncentrowana wokół wyników. Sposób posługiwania się danymi pochodzącymi z literatury tematu, i zestawienie ich z wynikami badań własnych, świadczy o dojrzałości i przenikliwości Doktoranta. W kontekście dyskusji procesu SOCE w regulacji funkcji synaps glutaminianergiczných, badanych przez Doktoranta, zabrakło mi jedynie wspomnienia o aparatach kolców dendrytycznych (ang. *spine apparatus*). Jest to szczególny rodzaj siateczki śródplazmatycznej wnikającej do kolców dendrytycznych, na których ulokowane są synapsy glutaminianergiczne. Ze względu na budowę kolców - czyli dużą głowę i wąską, długą szyję - należy pamiętać, że są to struktury biochemicznie izolowane od dendrytu i ciała komórki. Szyja kolca bardzo ogranicza dyfuzję białek i jonów między kolcem i ciałem komórki. Dlatego też, zakładałabym, że dla plastyczności synaps glutaminianergiczných znaczenia mają przede wszystkim lokalne jony wapnia i siateczka śródplazmatyczna znajdujące się we wnętrzu kolca dendrytycznego. Warto jednocześnie pamiętać, że jedynie 30% kolców zawiera siateczkę śródplazmatyczną. Zatem analizy wewnątrzkomórkowych poziomów wapnia i funkcji synaps u zwierząt z nadekspresją białek STIM i ORAI, przeprowadzone przez Doktoranta, możliwe, że dotyczyła różnych przedziałów komórkowych.

Poza powyższymi komentarzami ważniejszych uwag krytycznych wobec rozprawy nie mam. Moim zdaniem, przedstawiony w rozprawie zarówno opis aktualnego stanu wiedzy jak i badań własnych, dyskusja wyników jak i część eksperymentalna są dobrze zredagowane. Na pochwałę zasługuje również strona techniczna, edytorska i językowa pracy.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej mgr. Filipa Maciąga stwierdzam, że ma ona wysoki poziom merytoryczny. Uwagi krytyczne przedstawione w recenzji nie wpływają na moją pozytywną ocenę wyników przedstawionych w rozprawie. Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2014 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego

Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Katarzyna Radwańska  
Pracownia Molekularnych Podstaw Zachowania  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polskiej Akademii Nauk