



Prof. dr hab. Ludmiła Żylińska
Zakład Neurochemii Molekularnej
Katedra Biochemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny
ul. Mazowiecka 6/8
92-215 Łódź

Łódź, 04. 01. 2024

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Serwach
p.t. „Rola białek STIM w transporcie receptorów NMDA w kolcach dendrytycznych
szczurzych neuronów korowych”,

Promotor pracy: prof. Joanna Gruszczyńska - Biegała

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Serwach dotyczy wyjaśnienia jednego z mechanizmów regulujących komórkowy system homeostazy wapniowej, a mianowicie udziału białek STIM w funkcjonowaniu receptorów NMDA. W neuronach, charakteryzujących się intensywnymi przepływami jonów wapnia, obecne są różnorodne systemy kontrolujące zarówno wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , jak i usuwanie tych jonów z cytozolu. Fizjologiczne stężenie Ca^{2+} wewnątrz komórki w stanie spoczynkowym wynosi ~ 100 nM i jest o 4 rzędy wielkości niższe w porównaniu z przestrzenią pozakomórkową, co pozwala na utrzymanie gotowości komórki do reakcji na depolaryzację. Wzrost cytozolowego poziomu Ca^{2+} może następować poprzez napływ z zewnątrz komórki poprzez kanały wapniowe, oraz uwalnianie z wewnątrzkomórkowych magazynów, takich jak siateczka śródplazmatyczna i mitochondria. Interesującym procesem jest napływ jonów wapnia ze środowiska zewnątrzkomórkowego zależny od poziomu opróżnienia magazynów w siateczce śródplazmatycznej, określany jako pojemnościowy napływ wapnia (tzw. SOCE) i jest on inicjowany przez specyficzne białka sensorowe zlokalizowane w ER - STIM1 i STIM2. Oligomeryzacja tych białek, a następnie transport do błony plazmatycznej, gdzie wraz z białkami ORAI tworzą aktywny kanał wapniowy, uruchamia napływ Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. W świetle aktualnych danych, SOCE stanowi istotny proces w formowaniu plastyczności synaptycznej.

Zagadnienia związane z obecnością STIM w komórkach nerwowych oraz udział tych białek w regulacji SOCE od wielu lat były intensywnie badane w zespole prof. Joanny Gruszczyńskiej- Biegała, która ma na swoim koncie wiele znaczących osiągnięć w tej tematyce. W przypadku komórek neuronalnych rola procesu SOCE jest przedmiotem

szeroko prowadzonych badań dotyczących stanów fizjologicznych, jak również stanów z zaburzeniami homeostazy wapniowej, obecnymi w chorobach neurodegeneracyjnych takich, jak choroba Parkinsona, Alzheimerera, Huntingtona, niedokrwienie mózgu oraz w procesie starzenia. Warto nadmienić, że stany patologiczne w układzie nerwowym związane są z dysfunkcją wielu funkcjonalnych białek, w tym także tych zaangażowanych w regulację homeostazy wapniowej, dlatego celowym wydaje się poszukiwanie potencjalnych powiązań między poszczególnymi partnerami sygnalizacji neuronalnej. Szczególną funkcję pełni neuroprzebieżnikowy układ glutaminianergiczny, zaś jonotropowy receptor kwasu glutaminowego – NMDA, odgrywa niewątpliwie istotną rolę w procesach fizjologicznych i w warunkach patologicznych.

Pod opieką prof. Joanny Gruszczyńskiej - Biegała Doktorantka postanowiła zbadać oddziaływanie pomiędzy białkami STIM a jednym z aktywniejszych jonotropowych receptorów glutaminianergicznych - NMDAR, stawiając jako cel pracy wyjaśnienie udziału takiego kompleksu w warunkach endocytozy NMDAR wywołanej ich krótkotrwałą, silną aktywacją w neuronach kory mózgu szczura *in vitro* oraz sprawdzenie czy i w jaki sposób białka STIM wpływają na ten proces.

Rozprawa mgr Karoliny Serwach ma kształt klasycznej dysertacji, z podziałem na 7 rozdziałów, a całość pracy obejmuje 98 stron. Doktorantka zamieściła na początku pracy wykaz swoich 5 publikacji, w tym 4 jako pierwszy autor, alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz opis innowacyjności rozprawy. Wszystkie niezbędne dane wyjaśniające zasadność podjętego tematu zostały bardzo rzeczowo i logicznie przedstawione na 19 stronach części teoretycznej, w czym wielce pomocne było 5 rycin oraz tabela, obrazujące przejrzyście dość złożone zagadnienia związane z funkcjonowaniem badanych białek. Mamy więc krótką charakterystykę systemów zaangażowanych w regulację homeostazy wapniowej w komórkach nerwowych, opis procesu pojemnościowego napływu wapnia oraz udział białek STIM i ORAI, a także charakterystykę receptorów NMDA wraz z ich metabolizmem.

W oparciu o dane podane we Wstępie, Doktorantka wyznaczyła główny cel swojej pracy w podziale na 4 cele szczegółowe, które konsekwentnie realizowała oraz opisała w części doświadczalnej. Warunki przeprowadzanych doświadczeń podane na 18 stronach rozdziału „Materiał i metody” stanowią wręcz idealny wzór opisu stosowanych procedur. Bogata paleta zastosowanych najnowocześniejszych metod badawczych z zakresu technik hodowlanych, immunologicznych, biologii molekularnej, mikroskopii konfokalnej i pomiarów elektrofizjologicznych wymagała niewątpliwie zarówno wielkiej wiedzy, jak i umiejętności ich użycia.

Kolejny rozdział „Wyniki” zawiera rezultaty opisane na 19 stronach, udokumentowane w postaci 12 rycin. Badania Doktorantki obejmowały 4 główne etapy. Pierwszy, to prace prowadzone w celu wyjaśnienia, czy w warunkach krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR dochodzi do endocytozy tych receptorów. Drugi etap to analiza

oddziaływać białek STIM z podjednostkami receptora NMDA w warunkach endocytozy. W kolejnym etapie Doktorantka zbadała wpływ wyciszenia ekspresji genów kodujących białka STIM na poziom podjednostek NMDAR, stosując transdukcję odpowiednimi wirusami, zaś w ostatnim etapie pracy oceniany był wpływ białek STIM na proces endocytozy NMDAR w warunkach blokowania ekspresji białek STIM.

Do najistotniejszych obserwacji należy zaliczyć wykazanie, że:

- aktywacja NMDAR obniżała immunoreaktywność podjednostek GluN1, GluN2A i GluN2B, zwiększała kolokalizację tychże podjednostek z antygenem wczesnych endosomów (EEA1), a także obniżała amplitudę całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR,
- w przeciwieństwie do białka STIM1, białko STIM2 ulegało koimmunoprecypitacji oraz kolokalizacji z podjednostkami GluN2A i GluN2B, a ponadto interakcja STIM2/GluN2B wzrastała po krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR.

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie wniosku, że w warunkach silnej aktywacji NMDAR występowanie bezpośrednich oddziaływań STIM2 z podjednostkami GluN2A i GluN2B poprzez wzrost endocytozy wykazuje efekt ochronny przed nadmiernym napływem Ca^{2+} do komórki, co niewątpliwie stanowi oryginalne osiągnięcie Doktorantki. Wniosek ten poparty został także wynikami z serii doświadczeń, w których wyciszano ekspresję białek STIM, stosując szereg dobrze przemyślanych układów kontrolnych (neurony typu dzikiego i neurony transdukiowane scrRNA). Dodatkowo, w przeprowadzonych badaniach zastosowano wiele specyficznych inhibitorów oraz markerów, pozwalających na uzyskanie precyzyjnej i wiarygodnej odpowiedzi, zaś bardzo rzetelna dokumentacja naukowa wyników potwierdza wagę uzyskanych rezultatów.

Na 10 stronach „Dyskusji” mgr Karolina Serwach konfrontuje uzyskane wyniki z dostępnymi danymi literaturowymi, jednocześnie wskazując na potencjalne znaczenie własnych obserwacji. Chciałabym podkreślić zastosowaną przez Doktorantkę w Dyskusji formę odsyłaczy do poszczególnych wyników ułatwiających zrozumienie, celowość i interpretację poszczególnych doświadczeń, co jest niewątpliwym ukłonem w stronę czytelnika.

Wykaz piśmiennictwa obejmujący 150 pozycji zawiera dobrze dobrane dane literaturowe, zaś końcową część rozprawy stanowią spis rycin i tabel. Z punktu widzenia formalnego i edytorskiego praca przygotowana jest z dużą starannością i napisana wyjątkowo poprawną polszczyzną. Niewątpliwie godnym szczególnego podkreślenia jest ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę.

Z obowiązku recenzentki muszę wspomnieć o drobnych nieścisłościach oraz uwagach do rozprawy, a mianowicie:

- w wykazie skrótów termin PMCA powinien być przetłumaczony jako plazmatyczna Ca^{2+} -ATPaza,
- we wstępie warto było może wymienić także „najmłodszą siostrę” spośród pomp wapniowych, a mianowicie SPCA (*secretory pathway Ca^{2+} -ATPase*) występującą w aparacie Golgiego i współdziałającą w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych
- czasem automatyczny korektor Word próbuje ulepszyć tekst i tak fosforylację zamienił na fosforyzację.

Przy tak bogatym zestawie wyników o niezwykle istotnym znaczeniu nie tylko poznawczym, lecz być może potencjalnie użytecznym w przyszłości, powyższe uwagi nie wpływają na ocenę rozprawy. Obszerny materiał doświadczalny, bogaty warsztat metodyczny, bardzo dobrze udokumentowane i opublikowane oryginalne wyniki badań oraz zdolność do ich krytycznej analizy świadczą o doskonałym przygotowaniu Autorki do samodzielnej pracy naukowej. Doktorantka wykazała się umiejętnością zdefiniowania problemu badawczego, który wskazuje również kierunek przyszłych badań. Wyjaśnienie molekularnych oddziaływań STIM2/NMDAR byłoby niewątpliwie kluczowe dla odpowiedzi, czy możliwa jest taka zmiana ekspresji tego białka *in vivo*, która niwelowałaby przyczyny stanów patologicznych. Uzyskane wyniki są nowatorskie, a wyciągnięte przez Doktorantkę wnioski są w pełni uzasadnione.

Podsumowując, w mojej ocenie mgr Karolina Serwach podjęła bardzo interesujący i perspektywiczny temat, zrealizowała postawione sobie cele badawcze dobierając warsztat metodyczny zgodny ze standardami stosowanymi w tej dziedzinie nauki i wykazując znakomite przygotowanie merytoryczne. Przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630), dlatego z przyjemnością przedstawiam wniosek Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Karoliny Serwach do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie uwzględniając fakt, że większość przedstawionych wyników została opublikowana w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu i wysokim współczynniku oddziaływania wnoszę o wyróżnienie rozprawy.