



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD FARMAKOTERAPII I OPIEKI FARMACEUTYCZNEJ

Warszawa, dn. 10.01.24

dr hab. n. med. Anna Leśniak
Katedra i Zakład Farmakoterapii i Opieki Farmaceutycznej,
Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
e-mail: anna.lesniak@wum.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr farm. Karolina Serwach

pt. „Białka STIM w procesie endocytozy receptorów NMDA
w neuronach kory mózgu szczura *in vitro*”

I. SŁOWO WSTĘPU

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr farm. Karoliny Serwach pt. „Białka STIM w procesie endocytozy receptorów NMDA w neuronach kory mózgu szczura *in vitro*” powstała w Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego (IMDiK) PAN pod kierunkiem dr hab. Joanny Gruszczyńskiej-Biegały, specjalizującej się w badaniach dot. roli białek regulatorowych kanałów wapniowych w ośrodkowym układzie nerwowym w kontekście patofizjologii

chorób neurodegeneracyjnych. Niniejsza rozprawa doktorska powstała we współpracy ze Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych IMDiK PAN oraz z Katedrą i Zakładem Farmakoterapii i Opieki Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM) w ramach projektu grantowego Narodowego Centrum Nauki.

Wraz z postępowaniem cywilizacji i wydłużeniem życia ludzkiego, współczesna medycyna musi borykać się z szerokim spektrum chorób otępiennych. Ich podłoża doszukuje się między innymi w procesach związanych z ekscytotoksycznością, wynikającą z nadmiernej aktywacji receptora NMDA, co prowadzi do neurodegeneracji ośrodków odpowiedzialnych za pamięć i inne procesy kognitywne. Pacjenci cierpiący z powodu chorób neurodegeneracyjnych nie mogą obecnie cieszyć się dostępnością szerokiego wachlarza opcji farmakoterapii. Wiele prób badawczych podjętych w kierunku opracowania antagonistów receptora NMDA jako terapii chorób neurodegeneracyjnych, nie przyniosło zadowalających efektów z uwagi na dualistyczną rolę receptorów NMDA w ośrodkowym układzie nerwowym. Z jednej strony ich nadmierna aktywacja przyczynia się do uszkodzenia neuronów w drodze ekscytotoksyczności a z drugiej jednak strony, aktywacja receptorów NMDA pełni ważną rolę w indukcji plastyczności neuronalnej, istotnej w regulacji procesów pamięciowych i innych funkcji poznawczych. Obecnie jedynym antagonistą receptorów NMDA zarejestrowanym w terapii zaburzeń otępiennych jest memantyna, która preferencyjnie blokuje receptor NMDA w warunkach jego nadmiernej aktywacji bez wpływu na aktywność konstytutywną. Aspekt ten jest kluczowy w kontekście skuteczności i tolerancji terapii. Z uwagi na niezadowalającą dostępność farmakoterapii chorób otępiennych, brak refundacji memantyny, jej wysoki koszt oraz nieskuteczność w otępieniach łagodnych, potrzeby pacjentów nie są w pełni zaspokojone. W związku z tym, istnieje pilna potrzeba poszukiwania nowych mechanizmów, które mogłyby dostarczyć nowych celów terapeutycznych w celu leczenia chorobach otępiennych. Pewną nadzieją są opracowywane leki biologiczne, np. lecanemab i donanemab, które w ostatnich latach uzyskały rejestrację FDA w modyfikacji przebiegu choroby Alzheimera. Jednakże, są to preparaty skierowane przeciwko nadmiernie akumulującemu się białku β -amyloidu w mózgu a choroby otępienne mają podłoża wieloczynnikowe. Akumulacja toksycznych białek może stanowić więc proces wtórny i w związku z tym leczenie z zastosowaniem owych przeciwciał jest objawowe. Dlatego też, poszukiwanie nowych mechanizmów leżących u podłoża chorób otępiennych w starzejących się społeczeństwach zachodnich, stwarza nadzieję na skuteczniejszą terapię oraz wzbogacenie terapii multimodalnej.

Sam fakt podjęcia się przez Doktorantkę tej niełatwej acz jakże istotnej klinicznie tematyki, zasługuje na uznanie. Doktorantka wybrała dziedzinę niełatwą i jednocześnie z dużym potencjałem rozwoju nowych terapii. Kapryśny układ NMDA jako potencjalny terapeutyczny cel molekularny, wielokrotnie w przeszłości nastęrczał badaczom wielu trudności a jego sekrety nie są jeszcze w pełni odkryte. Doktorantka jednak podjęła wyzwanie i moim zdaniem wyszła z niego obronną ręką. Wszystkie załączone komentarze i sugestie względem pracy w żaden sposób nie umniejszają jej wartości a są raczej efektem dużego zainteresowania pracą i dalszym rozwojem badań w tym kierunku.

II. WARTOŚĆ NAUKOWA

Co prawda, badania ostatnich lat wskazują na rolę białek STIM w regulacji homeostazy wapniowej w komórkach neuronalnych, jednakże niniejsza rozprawa doktorska przedstawia nieopisaną jak dotąd w literaturze kluczową rolę białka STIM2 w bezpośredniej indukcji endocytozy receptora NMDA i hamowania jego nadmiernego pobudzenia i w efekcie ekscytotoksyczności. Jednocześnie, Doktorantka udowodniła brak istotnego zaangażowania białka STIM1 w tym procesie, który nie był do końca jasny ora wskazała nowy kierunek badań.

III. UWAGI OGÓLNE I OCENA FORMALNA

Rozprawa doktorska posiada klasyczny układ, typowy dla tego rodzaju prac. Podział treści pomiędzy poszczególne rozdziały jest bardzo dobrze wyważony. Starannie przygotowany **wstęp** zawiera skondensowane i najistotniejsze informacje, wprowadzające Czytelnika w poruszaną tematykę. Piękne i bardzo profesjonalne ilustracje stanowią dodatkowy atut, który nie tylko cieszy oko, ale świadczy też o dbałości o szczegóły i staraniach Doktorantki aby Czytelnik wyniósł jak najwięcej z lektury wstępu. Moim subiektywnym zdaniem, ilustracja przedstawiająca również proponowany przez Doktorantkę mechanizm endocytozy receptora NMDA przy udziale białka STIM2, byłaby przysłowiową wisienką na torcie. Chociaż jej brak, zachęca do odwołania się do najnowszej publikacji Doktorantki o wysokim współczynniku oddziaływania $IF = 8$, opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie *Cellular and Molecular Life Sciences* wydawnictwa Springer. Oprócz owej pracy, w skład rozprawy doktorskiej wchodzi również dwie prace przeglądowe w których Doktorantka widnieje jako pierwszy autor.

Sekcja **streszczenie** zawiera najważniejsze wyniki rozprawy. Jedna drobna uwaga dotyczy fragmentu na str. 13, akapicie 4, gdzie Doktorantka opisując różnice w efekcie

białka STIM1 i STIM2 na proces internalizacji receptora NMDA używa stwierdzenia, że wyciszenie genu *Stim2* nie obniżało immunoreaktywności receptora NMDA ani amplitudy prądu jonowego, podczas gdy wyciszenie *Stim1* nie miało wpływu w porównaniu do komórek typu dzikiego. Oczywiście, ten aspekt staje się jasny w dalszej części rozprawy, niemniej jednak w pierwszej chwili Czytelnik może odnieść wrażenie, że skoro użyte jest sformułowanie, o braku obniżenia amplitudy prądu jonowego w przypadku wyciszenia *Stim2*, może to również oznaczać nasilenie przewodnictwa kanału i osłabienie endocytozy.

Zarówno cel główny jak i cele szczegółowe zostały jasno określone a ich realizacji odpowiadają poszczególne podrozdziały sekcji „Wyniki”. Sekcja **materiałów i metod** swobodnie pozwala na zapoznanie się z zastosowanymi technikami i umożliwia powtórzenie doświadczeń przez inne zespoły badawcze. Dopatrzyłam się jedynie braku rozwinięcia skrótu odczynnika „BAPTA” w Tabeli 2. Wyniki zostały opisane starannie w ładnej oprawie graficznej i z uwzględnieniem założonych celów. Niektóre wykresy (np. na Ryc. 17) mogłyby być nieco większe. W **dyskusji** Autorka odnosi wyniki swoich badań do najnowszych prac badawczych w większości z ostatnich 5 lat. Spis **bibliografii** wskazuje, że Doktorantka swobodnie porusza się w swojej tematyce i na bieżąco śledzi najnowsze doniesienia literaturowe.

Praca zawiera tylko 1 **wniosek** końcowy, który w moim odczuciu stanowi bardziej wynik. Wnioski mogłyby być bardziej rozbudowane i wskazywać, że białka STIM2, lecz nie STIM1 mogą stanowić potencjalny cel molekularny w terapii zaburzeń neurodegeneracyjnych lub z uwagi na swoje zaangażowanie w proces endocytozy. Co prawda, takie stwierdzenie przewija się w pracy, jednak moim zdaniem zasługuje na swoją oddzielną sekcję.

IV. UWAGI MERYTORYCZNE

Doktorantka w swoich badaniach udowodniła, że potrafi posługiwać się szeregiem technik biologii molekularnej i komórkowej, aby zrealizować zamierzone cele badawcze. Doktorantka posłużyła się modelem pierwotnej hodowli neuronów kory mózgu szczura krótkotrwanie stymulowanych NMDA i glicyną w celu indukcji endocytozy receptora. Następnie, określiła rolę białek STIM1 i STIM2 w tym procesie poprzez zastosowanie metody wyciszania odpowiednich genów oraz metod immunoprecypitacji. Doktorantka z sukcesem potwierdziła rolę białka STIM2 w hamowaniu nadmiernej aktywacji receptora NMDA poprzez pomiar amplitudy prądu jonowego z zastosowaniem czasochłonnych metod

elektrofizjologicznych. W rozprawie pojawia się koncepcja mówiąca, że białka STIM2 mogą okazać się dogodnym celem molekularnym w terapii chorób neurodegeneracyjnych.

Po lekturze rozprawy, nasuwają mi się następujące przemyślenia:

1. W związku z tym, że choroby neurodegeneracyjne o podłożu spichrzeniowym lub innym, w których aktywacja układu NMDA najprawdopodobniej ma charakter chroniczny, czy zaangażowanie białek STIM 1 i 2 w procesy endocytozy wykazane podczas krótkiej, intensywnej stymulacji receptora NMDA, można przełożyć na procesy zachodzące podczas przewlekłej aktywacji tego receptora? Może w dalszych badaniach warto byłoby ocenić rolę białek STIM w neuronach izolowanych z mózgu myszy APP? Zwłaszcza, że białko APP przyczynia się do nieprawidłowości w przewodnictwie receptorów NMDA. Myślę, że rozprawa doktorska powinna zawierać rozdział poświęcony ograniczeniom przeprowadzonych badań.
2. Niewykluczone też, że w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych i chronicznej aktywacji układu NMDA, powstają alternatywne warianty splajsingowe białek STIM o zróżnicowanej funkcji. Czy zdaniem Doktorantki taki proces mógł zajść również w jej badaniach?
3. Czy w świetle wyników pokazujących zaangażowanie białka STIM2 w hamowanie nadaktywności receptora NMDA można by uznać, że byłyby dobrym celem dla profilaktyki, bądź leczenia zaburzeń przebiegających z krótkotrwałą, przemijającą aktywacją receptora NMDA jak np. udar niedokrwienny? Myślę, że ciekawym byłoby poruszenie tego aspektu w dyskusji. Zwłaszcza, że tylko 10% pacjentów kwalifikuje się do terapii rekombinowanym aktywatorem plazminogenu z uwagi na jedynie 3-godzinne okno terapeutyczne.
4. Istotnym aspektem przyszłościowego zastosowania białek STIM2 jako farmakoterapii jest ich brak niekorzystnego wpływu na procesy pamięciowe. Doktorantce w pracy udało się udowodnić, że białko to hamuje aktywność receptora NMDA, gdy ten jest silnie aktywowany i w związku z tym ryzyko negatywnego wpływu na procesy plastyczności neuronalnej jest niewielkie. Tą cechą powinien się właśnie charakteryzować obiecujący lek antagonizujący nadmierne pobudzenie układu NMDA. Bardzo istotnym aspektem byłoby więc określenie wpływu indukowanej STIM2

endocytozy receptora NMDA na plastyczność neuronalną, w tym ilość i kształt kolców dendrytycznych.

5. Uzupełnieniem badań i potwierdzeniem losów kompleksu STIM2-GluN2A byłoby określenie czy GluN2A ulega degradacji czy np. pakowany jest do endosomów recydingowych.
6. Interesującym aspektem byłoby także zbadanie molekularnego podłoża interakcji STIM2 i receptora NMDA i czy interakcja ta nie zachodzi poprzez fosforylację Tyr842.

V. WNIOSKI KOŃCOWE

Doktorantka w swojej pracy wykazała się dojrzałością naukową poprzez dokładne sformułowanie celów i odpowiednie dobranie metod badawczych do ich zrealizowania. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter innowacyjny ponieważ prezentuje dotychczas nieznaną wiedzę z zakresu roli białka STIM2 w procesie endocytozy receptora NMDA. Tym samym spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w zasadach przeprowadzania czynności w postępowaniach doktorskich uchwalonych przez Radę Naukową IMDiK 19 września 2019 r. i zmodyfikowane 28 listopada 2019 r. i 23 stycznia 2020 r. W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgr farm. Karolina Serwach do dalszych etapów postępowania w celu nadania jej tytułu doktora. Jednocześnie z uwagi na pionierski charakter badań, wnioskuję do Rady Naukowej IMDiK o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku,



dr hab. n. med. Anna Leśniak