

Prof. dr hab. Urszula Wojda  
Kierownik Pracowni Badań Przedklinicznych  
o Podwyższonym Standardzie, Centrum Neurobiologii,  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN  
tel: (4822) 5892578; email: u.wojda@nencki.edu.pl

Warszawa, 04.01.2024 r.

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr farm. Karoliny Serwach

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

wykonanej w Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Promotor: dr hab. Joanna Gruszczyńska-Biegała

Celem ocenianej rozprawy doktorskiej była weryfikacja hipotezy, że białka STIM, zlokalizowane w siateczce endoplazmatycznej i pełniące rolę sensorów  $Ca^{2+}$ , mogą wpływać na proces endocytozy receptorów NMDA (NMDAR) po krótkotrwałej, silnej aktywacji tych receptorów w neuronach kory mózgu szczura. Podjęta tematyka wywodzi się z nurtu badań nad molekularnymi mechanizmami homeostazy i sygnalizacji  $Ca^{2+}$ , jednego z głównych wtórnych przekaźników informacji w komórkach, której pionierem na świecie i w Polsce był prof. Witold Drabikowski (1925-1983). Prof. Drabikowski rozwinął badania białek wiążących  $Ca^{2+}$  typu „EF-hand”, takich jak kalmodulina, w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, a kontynuatorem tych badań w Instytucie Nenckiego, a potem w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej był uczeń prof. Drabikowskiego, prof. Jacek Kuźnicki. Ze szkoły tej wywodzi się także promotor niniejszej rozprawy, dr hab. Joanna Gruszczyńska-Biegała, która wraz z doktorantką mgr Karoliną Serwach skupiła się na stosunkowo niedawno odkrytych białkach STIM, które wraz z białkami ORAI uczestniczą w pojemnościowym napływie  $Ca^{2+}$  (ang. Store-Operated Calcium Entry, SOCE). Identyfikacja mechanizmu SOCE i funkcji białek STIM była niewątpliwie najdonioślejszym odkryciem w dziedzinie badań homeostazy  $Ca^{2+}$  na przestrzeni dwóch ostatnich dekad. Linia badań białek STIM zaprezentowana w niniejszej rozprawie osadzona została w modelu pierwotnych hodowli *in vitro* neuronów kory mózgu szczura, wpisując się w zainteresowania i doświadczenie Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w dziedzinie molekularnych mechanizmów funkcjonowania neuronów.

Podjęty w dysertacji i zrealizowany cel badań jest dobrze uzasadniony, nowatorski i ważny poznawczo, ponieważ poszerza wiedzę na temat regulacyjnych zależności między dwoma kluczowymi elementami sygnalizacji  $Ca^{2+}$  w neuronach, jakimi są białka STIM i receptory NMDA. Jonotropowe

glutaminergiczne receptory NMDA są główną drogą niekontrolowanego napływu  $\text{Ca}^{2+}$  do neuronu w warunkach ekscytotoksyczności, co skutkuje zaburzeniem sygnalizacji  $\text{Ca}^{2+}$  i neurotoksycznością. Wcześniejsze badania zespołu dr hab. Gruszczyńskiej-Biegały wykazały, że białka STIM mogą bezpośrednio oddziaływać z NMDAR oraz zmniejszać napływ  $\text{Ca}^{2+}$  przez te receptory. Istniały zatem solidne podstawy podjęcia badań opisanych w niniejszej dysertacji. Uzyskane wyniki wykazały, że brak białka STIM2, ale nie STIM1, hamuje endocytozę receptora NMDAR wywołaną nadmierną aktywacją NMDAR w neuronach. Autorka postuluje, że wyniki te otwierają zatem możliwości testowania nowej strategii przeciwdziałania ekscytotoksyczności poprzez zależne od białka STIM2 zwiększenie poziomu endocytozy NMDAR i ograniczenie napływu  $\text{Ca}^{2+}$  przez te receptory.

### **Ocena merytoryczna i formalna rozprawy**

Rozprawa przygotowana jest zgodnie z obowiązującymi zasadami dotyczącymi prac doktorskich, które nie są zbiorem opublikowanych artykułów. Dysertacja liczy 98 stron i ma klasyczny układ.

Po stronie tytułowej podano nazwy grantów, z których były finansowane badania przedstawione w dysertacji, a także nazwy dwóch pracowni, z którymi prowadzono badania we współpracy. Następnie zamieszczono spis publikacji Doktorantki, ze wskazaniem na trzy artykuły, dwa przeglądowe oraz jeden doświadczalny, które weszły w skład dysertacji i, co warto zaznaczyć, w których doktorantka była pierwszym autorem. Artykuły te opublikowano w uznanych czasopismach z listy JCR, w tym praca doświadczalna ukazała się w renomowanym piśmie *Cellular and Molecular Life Sciences* (IF 8,0).

Po spisie treści zamieszczono alfabetyczny wykaz skrótów, a następnie dwa streszczenia, w języku polskim i angielskim. Po streszczeniach znajdujemy opis innowacyjności rozprawy, co jest zabiegiem rzadko spotykanym i w mojej ocenie raczej zbędnym, gdyż treści tam zawarte stanowią w dużej mierze powtórzenie informacji podanych w streszczeniu. Bardzo dobrze napisany jest natomiast *Wstęp*, który liczy 18 stron i zawiera właściwie wyselekcjonowane informacje naukowe, podane w odpowiedniej kolejności, a także zilustrowane pięcioma przejrzystymi rycinami autorstwa doktorantki. Pierwsza część *Wstępu* wprowadza czytelnika w mechanizmy utrzymywania homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$  w komórkach nerwowych, w tym pojemnościowego napływu  $\text{Ca}^{2+}$  i roli białek STIM w tym procesie. Następnie omówiono i porównano budowę białek STIM1 i STIM2 oraz ich występowanie i funkcje w ośrodkowym układzie nerwowym. W drugiej części *Wstępu* autorka scharakteryzowała budowę podjednostkową receptorów NMDA, ich występowanie i rolę w ośrodkowym układzie nerwowym, a następnie omówiła biosyntezę NMDAR w komórce neuronalnej, transport NMDAR do synapsy i proces endocytozy NMDAR obecnych w błonie komórkowej. Tekst opisuje wyczerpująco przesłanki uzasadniające podjęty cel badań, który sformułowano w wyodrębnionym rozdziale wraz ze wskazaniem celów szczegółowych pracy.

Opis materiałów i metod (18 stron) jest zwięzły, a zarazem kompletny i umożliwiający powtórzenie eksperymentów. Na uwagę zasługuje bogaty arsenał metodyczny precyzyjnie dobrany do odpowiedzi na poszczególne pytania badawcze. Warsztat ten obejmuje m.in. metody prowadzenia pierwotnych hodowli neuronów kory mózgu szczura, metody badania kolokalizacji komórkowej i oddziaływania białek, takie jak znakowanie immunofluorescencyjne komórek i ich analiza z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej, izolowanie frakcji synaptosomalnej, koimmunoprecypitację,

immunoblotting i metodę ELISA. Ponadto w badaniach zastosowano metodę wyciszania ekspresji genów (knock down) w oparciu o interferencję RNA (RNAi) obejmującą przygotowanie wektorów lentiwirusowych do wyciszania ekspresji genów STIM1 i STIM2 na drodze transdukcji neuronów. Ponadto wykonywano pomiary elektrofizjologiczne metodą *whole cell patch-clamp*.

Wyniki (18 stron) przedstawiono klarownie i udokumentowano trzynastoma rycinami. W pierwszym etapie wykazano internalizację podjednostek receptora NMDAR (GluN1, GluN2A, GluN2B) po krótkotrwałej (15 minut), silnej (50  $\mu$ M NMDA i 100  $\mu$ M glicyna) aktywacji NMDAR, przy braku internalizacji STIM1 i STIM2. Zastosowano w tym celu biotynylację białek powierzchniowych błony komórkowej i oznaczanie immunoreaktywności białek we frakcji białek biotynylowanych w porównaniu z lizatami komórkowymi. Podobną analizę wykonano dla frakcji synaptosomalnej. Następnie potwierdzono endocytozę podjednostek NMDAR wykazując kolokalizację tych podjednostek z markerem wczesnych endosomów EEA1. Stosując metodę *patch-clamp* wykazano ponadto, że krótkotrwała, silna stymulacja NMDAR skutkuje obniżeniem amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR. Kolejnym etapem było zbadanie, jak endocytoza NMDAR wywołana zastosowaną silną, krótkotrwałą stymulacją NMDAR wpływa na oddziaływania NMDAR z białkami STIM. W warunkach kontrolnych bez stymulacji wykazano koimmunoprecypitację oraz kolokalizację białka STIM2, ale nie STIM1, z podjednostkami GLUN2A i GluN2B NMDAR. Stymulacja NMDAR powodowała wzrost oddziaływań STIM2 z jedną z podjednostek NMDAR, GLUN2B, przy braku takich oddziaływań dla STIM1. W trzecim etapie badań wyciszono ekspresję genów kodujących białka STIM z zastosowaniem metody RNAi i wektorów lentiwirusowych z konstrukcjami shRNA, a następnie zbadano wpływ wyciszenia na proces endocytozy NMDAR po krótkotrwałej, silnej stymulacji NMDAR. Stwierdzono, że obniżenie poziomu białka STIM2 poprzez RNAi, ale nie obniżenie poziomu STIM1, hamuje internalizację GluN1, GluN2A i GluN2B zarówno z błony komórkowej, jak i z frakcji synaptosomalnej, a także nie prowadzi do obniżenia amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR. Tym samym wykazano nową funkcję STIM2 jako czynnika wymaganego do endocytozy NMDAR w warunkach krótkotrwałej, silnej aktywacji tego receptora.

Dyskusja zajmuje 9 stron i stanowi odniesienie uzyskanych wyników do prac innych autorów o zbliżonej tematyce. Struktura *Dyskusji* odzwierciedla układ rozdziału „Wyniki”. Do drobnych niedociągnięć w tej części należy zaliczyć powtarzanie pewnych informacji i interpretacji. Szkoda też, że odkrytego nowego mechanizmu promowania endocytozy NMDAR przez STIM2 po nadmiernej aktywacji receptorów NMDAR nie zilustrowano podsumowującą ryciną. Cenne jest natomiast zamieszczenie po *Dyskusji* rozdziału „Podsumowanie” (w punktach) i końcowego wniosku. Spis piśmiennictwa jest bardzo obszerny (10 stron), uwzględniający artykuły opublikowane w ostatnich pięciu latach. Na końcu zamieszczono spis rycin i spis tabel.

Proporcja poszczególnych części pracy jest odpowiednia. Rozprawa ma przejrzystą konstrukcję i w syntetyczny sposób dostarcza wszystkich informacji pozwalających na ocenę oryginalności i istotności rozwiązane problemu naukowego, ogólnej wiedzy doktoranta w uprawianej dziedzinie i umiejętności prowadzenia badań naukowych. Praca napisana jest w sposób zwięzły, a zarazem ciekawy.

## Uwagi

1. Wniosek końcowy można było sformułować nieco ostrożniej, ponieważ praca nie dostarcza bezpośrednich dowodów na „zwiększenie endocytozy” NMDAR pod wpływem np. nadekspresji białka STIM2.
2. W rozdziale „Dyskusja” autorka stwierdza, że białko STIM2 jako regulator endocytozy nadmiernie aktywowanych NMDAR mogłoby stanowić punkt uchwytu leków w terapii chorób neurodegeneracyjnych, w których występuje zjawisko ekscytotoksyczności. Zabrakło mi krytycznej analizy tego potencjalnego podejścia terapeutycznego ze zwróceniem uwagi na trudności, jakie można napotkać na drodze jej rozwoju, zwłaszcza związane z innymi funkcjami białka STIM2 i możliwością wystąpienia skutków ubocznych.
3. Jakie mogą być ewentualne zalety proponowanej terapii w oparciu o zwiększoną endocytozę NMDAR w porównaniu do stosowania antagonistów receptora NMDA, takich jak stosowana obecnie w praktyce klinicznej choroby Alzheimera memantyna?
4. Wyciszenie ekspresji genu kodującego STIM2 nie tylko skutkowało zahamowaniem internalizacji NMDAR po krótkotrwałej, silnej stymulacji, ale nawet prowadziło do wzrostu poziomu niektórych z podjednostek NMDAR zarówno we frakcji błony komórkowej (ryc. 16) jak i we frakcji synaptosomalnej (ryc. 17). Jaka może być tego przyczyna?
5. Na ryc. 8. immunoblot dla GluN2A pokazuje dwa prążki tego białka w lizatach komórkowych i jeden we frakcji białek powierzchniowych. Także we frakcji synaptosomalnej przeciwciała przeciw GluN2A wykryło jeden prążek (ryc. 9). Dalej, na ryc. 14A immunoblot przedstawiający immunoreaktywność podjednostki GluN2A wskazuje obecność jednego prążka tego białka w lizatach komórkowych we wszystkich ścieżkach (scrRNA, shStim1C i shStim1D), podczas gdy na ryc. 14B analogiczny immunoblot obecność dwóch prążków. Podobne różnice widoczne są także na ryc. 17; immunoblot GluN2A wykazuje obecność głównie jednego prążka na ryc. 17A i dwóch prążków na ryc. 17B. Czy i jak można to wytłumaczyć?
6. Czy były próby kolokalizacji podjednostek receptora NMDAR z innymi markerami endocytozy, poza markerem wczesnych endosomów EEA1, takimi jak inny marker wczesnych endosomów, białko Rab5?
7. W pracy znajdujemy informację, że doświadczenia z zastosowaniem metody *whole cell patch clamp* wykonano w Katedrze i Zakładzie Farmakoterapii i Opieki Farmaceutycznej WUM. Nie jest jasne, czy doświadczenia te wykonała sama doktorantka, czy są one włączone jako ważny dla interpretacji całości pracy wynik uzyskany przez współpracowników/współautorów artykułu doświadczalnego opublikowanego w *Cell Mol Life Scie*.

## Uwagi edycyjne i językowe

Praca przygotowana jest bardzo starannie, z dyscypliną dla słowa pisanego. Autorka sprawnie posługuje się naukowym językiem. Można wskazać tylko kilka drobnych uchybień:

1. Receptory NMDAR w błonie komórkowej są policzalne, zatem mówimy o ich liczbie, nie ilości. (np. str. 34, 35).

2. Częstym błędem w niniejszej rozprawie, jak też w wielu innych rozprawach, jest stosowanie jako nazwy metody terminu „Western blot”. Tymczasem metoda to Western blotting (lub immunoblotting), zaś „Western blot” to pojedyncza membrana. (Należy jednak docenić, że Autorka uniknęła innego częstego błędu, jakim jak termin „izolacja białek”, prawidłowo stosując jako nazwę tego procesu „izolowanie białek”).
3. Termin „receptory glutaminianergiczne” (Streszczenie, str. 12) wydaje się błędem edycyjnym. Zgodnie ze Słownikiem Biologii Komórki wydanym przez Polską Akademię Umiejętności mówimy o receptorach glutaminergicznych.
4. W kilku miejscach w rozdziale „Materiały i metody” występują skróty myślowe: np. str. 45, „...zawieszano w 200 µl sterylnej Milli-Q” – powinno być „wody Milli-Q”; str. 46, „poddawano traktowaniu 50 µM NMDA...” powinno być „...roztworem 50 µM NMDA...”; str. 47, „...wirowano z prędkością 17 000 xg, 15 minut, 4°C...” powinno być „...w temperaturze 4°C..”.
5. Wystąpiło kilka błędów interpunkcji.

### Podsumowanie

Mimo kilku uwag krytycznych, wysoko oceniam przedstawioną do oceny dysertację. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego poznawczo i wymagającego metodycznie problemu naukowego. Precyzyjnie zaplanowane i rzetelnie przeprowadzone badania, z zastosowaniem złożonego warsztatu metodycznego i odpowiednich kontroli, doprowadziły do odkrycia nowego mechanizmu regulacji endocytozy NMDAR z udziałem białka STIM2. Uzyskane wyniki mają w większości nowatorski, oryginalny charakter. Co ważne, rezultaty badań inspirują do formułowania kolejnych pytań, odkrywając zatem nowe horyzonty poznawcze.

Dysertacja cechuje się bardzo dobrą organizacją obszernego materiału. Doktorantka potrafi z dużą sprawnością przedstawić wyniki badań i zinterpretować je w świetle istniejącej literatury. Lektura dysertacji nie pozostawia wątpliwości, że pani Karolina Serwach zdobyła rozległą wiedzę i wysoką sprawność eksperymentalną, a także zdolności krytycznej analizy danych, co zapewnia Jej swobodę w podejmowaniu wymagających wyzwań naukowych i umożliwia prowadzenie samodzielnych badań.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN o dopuszczenie mgr Karoliny Serwach do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

Wnioskuję jednocześnie o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej ze względu na jej wysoką wartość merytoryczną.



Prof. dr hab. Urszula Wojda