

Prof. dr hab. Jacek Kuźnicki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie
ul. Księcia Trojdena 4
02-109 Warszawa
e-mail: jacek.kuznicki@iimcb.gov.pl
tel. (0)22 597 07 06

Warszawa, dn. 31 sierpnia 2020 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Krzemień
pt. *The role of Amot and Amotl1 in the central nervous system*
pod kierunkiem Pana dr. hab. Tomasza Prószyńskiego
oraz promotora pomocniczego Pana dr. Pawła Boguszelewskiego**

Tematyka ocenianej pracy doktorskiej wpisuje się w istotne badania podstawowe, które pomagają zrozumieć mechanizmy chorób mózgu. W szczególności chorób neurologicznych i psychicznych, które są coraz bardziej powszechne, a nie wszystkie dostępne leki okazują się skuteczne w leczeniu. Ponadto, także chorób neurodegeneracyjnych, których głównym czynnikiem ryzyka jest wiek, a które stanowią duże wyzwanie dla współczesnej medycyny, m.in. ze względu na brak skutecznych leków.

Omawiana rozprawa dotyczy badania rozwoju drzewa dendrytycznego oraz jego wpływu na zachowanie się myszy ze szczególnym uwzględnieniem roli białek o nazwie Amot, Amotl1 i Yap1. Prace zespołu promotora rozprawy doktorskiej wskazują, iż w rozwoju tego drzewa biorą udział m.in. Amot i Yap1, a dane literaturowe sugerują, iż mogą one uczestniczyć w procesach prowadzących do zmian patologicznych w mózgu związanych z zaburzeniami ze spektrum autyzmu (ASD), schizofrenią, czy chorobami neurodegeneracyjnymi. Jest zatem w pełni uzasadnione podjęcie badań mających wyjaśnić molekularne mechanizmy odpowiedzialne za procesy prowadzące do rozwoju drzewa dendrytycznego i pokazanie, jak jego niedorozwój wpływa na funkcjonowanie układu nerwowego.

Ogólny opis pracy

Rozprawa ma typową strukturę prac doktorskich i zawiera spis treści, pełną listę stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, krótkie konkluzje i bibliografię. Rozprawa jest napisana w języku angielskim poprawnie i zrozumiale, ale zawiera drobne błędy językowe i typograficzne; ich listę przekazałem bezpośrednio Doktorantce.

Wstęp składa się z czterech części i zawiera informacje o budowie mózgu i neuronów, o połączeniach neuronów oraz roli dendrytów i synaps, a także o zaburzeniach drzewa

dendrytycznego w chorobach mózgu. Autorka opisała też właściwości i funkcje białek rodziny Angiomin, a w szczególności obu form białka Amot i Amotl1. Ponadto, we wstępie zawarte są informacje o udziale tych białek w szlaku sygnałowym Hippo, w rozwoju nowotworów oraz dostępne, choć niezbyt liczne informacje dotyczące ich obecności w układzie nerwowym. W treści pracy Autorka często powołuje się prace z XX wieku, a prace starsze niż 10 lat uznaje niejednokrotnie za opublikowane „recently”. Dobrym rozwiązaniem jest natomiast rozszerzony sposób cytowania prac, tj. podanie nie tylko nazwiska pierwszego autora i roku opublikowania, ale i numeru odnoszącego się do spisu literatury. Wstęp jest zilustrowany głównie rysunkami z prac innych autorów lub z Internetu. Niejasne jest pochodzenie rysunków 7, 8 i 10, a prace, z których pochodzą rysunki 2 i 3 zawierają nazwiska autorów, ale nie ma ich w spisie literatury. Całość Wstępu stanowi dobre wprowadzenie do sformułowania celu pracy.

Cel pracy

Dotychczasowe doniesienia wskazywały na obecność białek Angiomin w mózgu, ale brak było danych na temat ich roli w układzie nerwowym. W związku z tym, Doktorantka za cel swojej pracy obrała wyjaśnienie roli tych białek w tworzeniu struktur i połączeń w mózgu oraz opis potencjalnych zmian w zachowaniu myszy pozbawionych któregoś z tych białek. Cele zostały zawarte w 5 punktach, które szczegółowo opisują to, co znajduje się w części eksperymentalnej. Zaskakującym elementem, mimo, że tytuł tego nie zapowiada, były 2 cele pracy obejmujące również analizę myszy pozbawionych białka Yap1, które łączy się z Amotl1. Wszystkie 5 celów można było jednak przedstawić bardziej spójnie, gdyż w istocie było to stworzenie nowej linii pozbawionej białka Amotl1 (cel A) oraz analiza struktur mózgu w tej linii i wcześniej stworzonych liniach pozbawionych białka Amotl1 lub białka Yap1 (cel B) oraz analiza zachowania się myszy tych trzech linii (cel C). W rzeczywistości Autorka wprowadza jeszcze inny podział wyników pracy, o czym czytelnik przekonuje się, poznając dwie główne części wyników. Jedną to analizę niektórych aspektów dotyczących linii pozbawionych białka Amotl1 lub białka Yap1, a druga część, bardziej rozbudowana, dotyczy linii pozbawionej białka Amotl1.

Materiały i metody to 21 stron szczegółów dotyczących zastosowanych technik badawczych. W kilku tabelach podano dane na temat zastosowanych roztworów, firmowych zestawów, starterów i warunków reakcji PCR dla poszczególnych genów, listę przeciwciał stosowanych w metodzie immunohistochemii oraz Western Blot, analizę komórek Purkiniego *in vivo*, iniekcje wirusów, a także opis zastosowanych testów do analizy behawioru. Opisy te dobrze dokumentują zastosowane metody, co może ułatwić ewentualne powtórzenie opisanych doświadczeń przez innych badaczy. Jest to istotne, gdyż rekomendacje NIH wymagają, aby przed ostatecznym przyjęciem publikacji do druku potwierdzić na odpowiedniej liście, iż wszystkie istotne szczegóły metodyczne zostały podane w Materiałach i metodach. W recenzowanej pracy większość tych informacji została zawarta, ale brakuje np. numeru serii przeciwciał oraz, co bardzo istotne, numeru i daty zgody Komisji Etycznej na wykonanie przeprowadzonych badań. Pod względem redaktorskim ta część

zawiera sporą liczbę błędów typograficznych. Są też niewłaściwie sformułowania, gdyż w białkach nie ma aminokwasów, a są reszty aminokwasowe (3.3.2) oraz niewłaściwie są pokazane liczby dziesiętne, bo choć w języku polskim stosujemy przecinek do oddzielenia całej liczby od jej ułamka, to w języku angielskim używa się kropki.

Wyniki

W pierwszej, głównej części wyników Autorka analizowała rolę białek Amot i Yap1 w rozwoju dendrytów, morfologii mózgu i zachowaniu myszy. W szczególności, metodą Western Blot wykazała obecność tych białek w ekstraktach z różnych struktur mózgu myszy P30, a na podstawie immunohistochemii skrawków wskazała synaptyczną lokalizację tych białek *in situ*. Stwierdziła, że ich najwyższy poziom jest w mózdzku, przede wszystkim Yap1. Oba białka były obecne w synapsach neuronów piramidalnych w rejonie CA1 hipokampa oraz komórkach Purkiniego mózdzku. Jedną uwagę krytyczną jest taka, iż Autorka niesłusznie uznaje analizę immunohistochemiczną za badanie lokalizacji *in vivo*, choć w istocie jest to badanie w utrwalonych tkankach, czyli *in situ*.

Następnie Autorka szczegółowo opisała stworzenie dwóch linii nokautowych myszy pozbawionych albo białka Amot, albo białka Yap1 oraz zweryfikowała skuteczność tej procedury. Zaobserwowała, iż myszy bez białka Amot mają znacząco niższą masę ciała od zwierząt dzikich, od urodzenia aż do osiągnięcia dojrzałości. Analiza mózgu 30-dniowych myszy nokautowych obu linii wykazała zmniejszenie mózdzku i na tej części mózgu Autorka skupiła się w dalszych badaniach. Na ich podstawie stwierdziła, iż brak tych białek nie wpływa na wzór foliacji mózdzku, liczbę płatów mózdzku, a nawet na liczbę komórek Purkiniego. Kolejnym etapem prac była analiza warstw w korze mózdzku, która doprowadziła do stwierdzenia, iż warstwa molekularna poniżej szczeliny wstępnej ulega redukcji, natomiast warstwy komórek ziarnistych i komórek Purkiniego są niezmienione. Ze względu na to, że składnikami neuronalnymi tej warstwy są migrujące komórki ziarniste Autorka oznaczyła ich liczbę, stosując przeciwciała na białko NeuN. W mózdzku jest ono obecne jedynie w postmitotycznych komórkach ziarnistych, co umożliwiło ich specyficzną identyfikację. Autorka stwierdziła, iż w mózdzku myszy pozbawionych białka Amot i myszy dzikich jest podobna liczba komórek ziarnistych w analizowanej warstwie. Jednak w przypadku linii bez białka Yap1 było tych komórek znacznie więcej. W opinii Autorki wyniki te sugerowały, że białko Yap1 bierze udział w proliferacji lub migracji komórek ziarnistych mózdzku. Wydaje się, iż udział w proliferacji jest jednak wątpliwy, ponieważ zarówno dane literaturowe, jak i wyniki Autorki wskazują, że mózdzek ulega zmniejszeniu u myszy bez tego białka. Chyba, że przez „udział” Autorka rozumie zahamowanie tego procesu. Bardziej prawdopodobne wydaje się jednak, iż białko Yap1 bierze udział w migracji tych komórek. Szkoda, iż ten wątek nie był rozwijany w pracy, ponieważ Autorka zajęła się innym zagadnieniem, tj. strukturą drzewka dendrytycznego komórek Purkiniego. Decyzja ta wynikała z faktu, iż dendryty tych komórek są zlokalizowane w tej warstwie molekularnej, która zmniejszała się w nieobecności któregoś z tych białek. Wykorzystując transgeniczną linię z ekspresją białek Amot lub Yap1 z białkiem Tomato, Autorka doprowadzała, przez iniekcje konstruktyw wirusowych do mózdzku nowonarodzonych myszy z rekombinazą Cre,

do zahamowania ekspresji tych białek w pojedynczych komórkach Purkiniego z jednoczesnym ich wyznakowaniem na czerwono. Okazało się, że wszystkie mierzone parametry drzewka dendrytycznego były zredukowane w komórkach bez białka Amot. Natomiast w przypadku braku białka Yap1 prawie wszystkie parametry były zredukowane, z wyjątkiem wysokości tego drzewka. Brak tych białek, co stwierdzono w kolejnych doświadczeniach, nie miał wpływu na występowanie markerów synaptycznych w warstwie molekularnej kory mózdzku. Analizie podlegały mózdzki zwierząt 21-dniowych, podczas gdy wcześniejsze badania były wykonywane na myszach starszych, tj. 30-dniowych. Dlaczego tak zdecydowano? Autorka podsumowała tę część badań słuszną konkluzją, iż białka Amot i Yap1 pełnią rolę w organizacji mózdzku, w szczególności wpływają na drzewko dendrytyczne komórek Purkiniego. Tym samym, kolejnym oczywistym etapem pracy była analiza właściwości lokomotorycznych zwierząt pozbawionych białek Amot lub Yap1. W teście *Open Field* nie stwierdzono zmian u 150-dniowych zwierząt nokautowych w porównaniu z myszami kontrolnymi. Jednak inne testy, które wyznaczają zdolność do utrzymania równowagi i koordynację ruchów, jak *RotaRod*, *CatWalk* i *Foot-Fault* jednoznacznie ujawniły negatywny efekt braku białek Amot lub Yap1 na koordynację ruchową. Na tym zakończono jedną z dwóch głównych części pracy.

Druga część dotyczyła roli białka Amotl1, innego białka z rodziny Angiomin, w tworzeniu struktur mózgowych oraz w behawiorze. Autorka potwierdziła, iż Amotl1 jest obecny w strukturach mózgu i jest zlokalizowany w synapsach. Podobnie, jak w poprzedniej części, głównym modelem badawczym były myszy nokautowe. Autorka dokonała kilkietapowej procedury krzyżowania różnych linii, aby doprowadzić do uzyskania myszy pozbawionych tego białka. Szkoda, że Autorka nie podała ile czasu zajęły kolejne etapy, co mogłoby być użyteczną informacją dla innych badaczy, którzy podejmują się podobnych procedur. Co więcej, pokazałoby to potężny zakres prac wykonanych przez Autorkę, a co tylko niektórzy, pracujący z myszami mogą docenić. Po sprawdzeniu skuteczności procedury i stwierdzeniu, że myszy stworzonej linii nie mają ekspresji białka Amotl1, Autorka rozpoczęła opisywanie ich fenotypu. Stwierdziła, że choć masa ciała myszy bez Amotl1 nie różni się od masy ciała zwierząt kontrolnych, to jednak ich mózgi są większe. Było to związane ze zwiększeniem powierzchni komór bocznych. Następnie, opisała różne parametry behawioru tych zwierząt, wykorzystując zestaw typowych oraz specjalistycznych testów. Nie stwierdziła, w przeciwieństwie do wcześniej badanych linii, aby myszy bez Amotl1 wykazywały zaburzenia w koordynacji ruchowej lub miały zmieniony wzór chodu. Natomiast okazało się, iż mają one bardzo ciekawe cechy, np. w teście *Open Field* wykazują zwiększoną aktywność i zmniejszony niepokój. Brak strachu objawił się również, kiedy myszy te były brane do ręki przez eksperymentatora oraz w teście „*marble burying*”, w którym myszy nokautowe chowały mniejszą liczbę kostek niż myszy kontrolne. Autorka w kolejnych doświadczeniach pokazała, że takie zachowanie nie było wyrazem tzw. zachowań repetytywnych. Powstało zatem pytanie, jakie jeszcze inne cechy mają myszy tej linii? Okazało się, iż wykazują one ograniczoną chęć do budowania gniazd i zdolność do budowania takich, jakie budują myszy kontrolne. Cechy te mogą wskazywać na zaburzenia socjalne, co Autorka sprawdziła w tzw. trzykomorowych doświadczeniach.

Wyniki tego typu eksperymentów wydawały się potwierdzać słuszność tej hipotezy i dlatego Autorka przy współpracy z zespołem prof. Eweliny Knapskiej wykorzystała specjalistyczny zestaw umożliwiający bardziej precyzyjne stwierdzenie ewentualnych zaburzeń socjalnych. Wyniki potwierdziły hipotezę, iż myszy pozbawione Amotl1 wykazują fenotyp socjalnego wycofania się. Ponadto, Autorka zaobserwowała, iż miały one częste epizody chodzenia w tył i zwiększone kręcenie się w kółko. Wszystkie te cechy myszy bez Amotl1 wskazywały, iż mają one zachowania charakterystyczne dla pacjentów z zaburzeniami ze spektrum autyzmu (ASD), zespołem łamliwego chromosomu X lub schizofrenią. Celem wyjaśnienia w jaki sposób brak białka Amotl1 wpływa na tak zmienione zachowanie myszy, Autorka wykorzystała technikę rezonansu magnetycznego (MRI). Porównano mózgi myszy nokautowych z mózgami myszy kontrolnych i stwierdzono, iż powierzchnia komór oraz ilość płynu mózgowo-rdzeniowego są u mutantów powiększone. Te wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje (część 4.2.3) odnośnie wielkości komór bocznych i nie jest jasne dlaczego ich nie połączono ze sobą, a pokazano na końcu części doświadczalnej. Wyniki MRI wskazują, iż brak Amotl1 powoduje znaczący wzrost całej objętości mózgu, płynu mózgowo-rdzeniowego oraz struktur korowych.

Ostatnią częścią badań było oznaczenie niektórych metabolitów w mózgu przy użyciu techniki spektroskopii rezonansu magnetycznego (MRS). Autorka zaobserwowała, iż w strukturach hipokampa myszy nokautowych poziom NAA był niższy niż u myszy dzikich, a poziom glutaminy wyższy. Te i wcześniej opisane w pracy cechy myszy pozbawionych białka Amotl1 wskazują zdaniem Autorki, iż mogą być one modelem do badania mechanizmów schizofrenii.

Bardzo pozytywnie oceniam pracę doświadczalną wykonaną przez Autorkę. Praca z kilkoma liniami myszy nokautowych i transgenicznymi, w tym stworzenie własnej linii bez Amotl1 według skomplikowanej strategii, wymagało bardzo dużego nakładu pracy, wiedzy i dobrego planowania. Podobnie, wykonanie różnego rodzaju testów behawioralnych również było trudnym zadaniem. Uzyskane wyniki są wartościowe, dobrze przedstawione i przekonujące. Konkluzje są uzasadnione, a wynik dotyczący fenotypu linii nokautowej Amotl1 jest wyjątkowo interesujący tak pod względem możliwości badawczych, jak i w przypadku uzyskania patentu - pod względem aplikacyjnym. Mysi model o cechach charakterystycznych dla niektórych chorób psychicznych może znaleźć zastosowanie m.in. w poszukiwaniu nowych potencjalnych leków. Do tej części pracy mam jedynie drobne uwagi krytyczne, które dotyczą formy jej przedstawienia o czym napisałem powyżej. Te uwagi nie wpływają jednak na bardzo dobrą ocenę tej części pracy.

Dyskusja

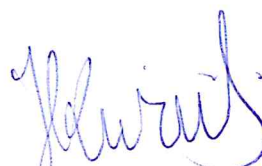
W Dyskusji Autorka dokonuje analizy uzyskanych wyników, dzieląc ją na dwie główne części zgodnie z treścią Wyników. Ponadto, każda z części jest podzielona na jeszcze mniejsze części i pod-części. Choć porządkuje to dyskusję z otrzymanymi wynikami w nawiązaniu do danych literaturowych, tą część pracy oceniam mniej pozytywnie niż pozostałe. Głównie dlatego, iż jest napisana mniej precyzyjnie, a miejscami jest powtórzeniem łączącym informacje ze Wstępu z konkluzjami wyników poszczególnych

etapów pracy. Brakuje natomiast szerszej perspektywy, która łączyłaby wyniki pracy doktorskiej Autorki i zespołu promotora z danymi literaturowymi w odniesieniu do funkcji Amot i Yap1 *in vivo*. Było to celem pracy doktorskiej i choć w istocie prace eksperymentalne w dużej części tego dotyczyły, to dyskusja nie była skoncentrowana na tym aspekcie badań.

Dyskusja dotycząca drugiej części pracy jest ciekawsza, co zrozumiałe, gdyż te informacje dotyczą nieznanych funkcji białka Amotl1. Jednak i w tej części brakuje podsumowania oraz propozycji co dalej tj. jakiego typu badania mogłyby być przeprowadzone na linii myszy wykazujących cechy schizofrenii lub innych chorób psychicznych. Pomocny mógłby być rysunek podsumowujący tą część. Wyniki pracy Autorka podsumowała w postaci krótkich konkluzji, które dotyczą jedynie białek Amot i Amotl1, co jak wcześniej wskazywałem, nie jest spójne z tytułem i celami pracy, ponieważ nie wspomina o białku Yap1.

Podsumowanie

Autorka podjęła ważny i ciekawy temat, uzyskała interesujące wyniki, które mają dużą wartość naukową i potencjalnie aplikacyjną. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Krzemiń spełnia warunki określone w art. 190 pkt. 2 i 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668) oraz Regulaminu Rady Naukowej z 13.04.2018 r. załącznik nr 1 (ze zm. z 06.12.2019 r.). Tym samym, składał do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN wniosek o nadanie Autorce stopnia naukowego doktora. Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie tej pracy, gdyż dotyczy ona ważnego tematu, w którym wykorzystano różne mysie linie modyfikowane genetycznie, w tym linię własną, zastosowano różnorodne techniki behawioralne, doświadczenia wykonano i udokumentowano starannie, a wyniki tej pracy znacząco poszerzają naszą wiedzę w zakresie funkcjonowania układu nerwowego i roli badanych białek.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "J. Kuźnicki".

Prof. dr hab. Jacek Kuźnicki
Członek rzeczywisty PAN



Kraków, 28.08.2020

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Krzemień

p.t. „The role of Amot and Amotl1 in the central nervous system”

wykonanej w Pracowni Synaptogenezy

Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

pod opieką dr. hab. Tomasza Prószyńskiego i dr. Pawła Boguszewskiego

Moją ocenę chciałbym rozpocząć w sposób zbliżony do tego jak rozpoczyna się sama rozprawa. A mianowicie, od mózgu i fundamentalnego stwierdzenia, że koordynuje on pracę wszystkich narządów, kontroluje poruszanie, przetwarza informacje pochodzące od zmysłów, odpowiada za pamięć, zdolność uczenia się i każdy inny element naszej świadomości. U podłoża wszystkich tych procesów leży plastyczność neuronalna, która odpowiada za poprawne wykształcenie każdej z funkcji mózgu oraz co najistotniejsze, umożliwia adaptację zachowania do wymogów okoliczności. Stąd też badania mechanizmów kierujących plastycznością neuronalną potencjalnie mogą doprowadzić do zrozumienia, jak elementarne procesy zachodzące na poziomie komórek mogą przekładać się na zmiany w działaniu całego organizmu i powstawanie złożonych zachowań, a w końcu samej świadomości. Rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Krzemień opisuje obszerne badania nad rolą jaką odgrywają w plastyczności neuronalnej agiomotyna, blisko spokrewnione z nią białko Amotl1 oraz regulowane przez nie białko Yap, składnik kaskady Hippo. Należy podkreślić, że wcześniejsze przesłanki wiązały aktywność tych białek z regulacją cytoszkieletu, proliferacją komórek oraz kontrolą rozwoju narządów, niemniej ich działanie w komórkach nerwowych nie było jak dotąd dobrze poznane. Dlatego też bez wahania stwierdzam, że wybrane zagadnienie badawcze ma fundamentalne znaczenie, a uzyskane wyniki są istotnym wkładem w nasze rozumienie mechanizmów kontrolujących działanie mózgu. Najlepszym zaś tego potwierdzeniem jest fakt, że część wyników przedstawionych w rozprawie znalazło się w publikacji z 2019 roku, która otrzymała nagrodę zespołową im. Jerzego Konorskiego za najlepszą pracę z dziedziny neurobiologii wykonaną w Polsce.

Przedstawiona do oceny praca została przygotowana w języku angielskim, liczy ponad 137 stron i ma klasyczny układ z podziałem na Wstęp, Cele Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję i Bibliografię (pozwolę sobie na przekład wszelkich określeń na język polski). Praca zawiera również wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim, które zwięźle opisują przeprowadzone badania. W pracy są dość liczne błędy językowe, ale język jest zrozumiały i nie utrudnia zrozumienia opisywanych wyników. Wstęp rozwija trzy wątki; pierwszy bardzo ogólny, jest wprowadzeniem do funkcjonowania mózgu. Następnie podjęte jest rozważenie zależności pomiędzy zaburzeniami w plastyczności neuronalnej i chorobami mózgu. Trzecim tematem podjętym we Wstępie jest wprowadzenie w badania nad działaniem agiomotyny.

Szczególnie interesujący wydał mi się drugi z wątków, gdyż jest zręcznym wskazaniem obserwacji potwierdzających zależności między zaburzeniami plastyczności neuronalnej i zmianami w zachowaniu, zaburzeniami zdolności poznawczych czy też procesami związanymi z neurodegeneracją. Trzecia z części jest koniecznym wprowadzeniem do wcześniejszych badań nad agiomotynami, opisującym zwięźle ich odkrycie, trójkę genów należącą do tej rodziny, niektóre ich izoformy oraz szereg mechanizmów z nimi związanych, w tym znaczenie w angiogenezie. Przechodząc wreszcie do początku, pierwsza z części Wstępu zrobiła na mnie nieco mieszane wrażenie. Z jednej strony respekt budzi bardzo ambitny zamysł rozpoczęcia rozprawy od ogólnego wprowadzenia do funkcji mózgu, z drugiej jednak nie jest to płynnie powiązane z późniejszą Dyskusją, ani też nie dostarcza kontekstu dla wykorzystanej metodyki lub prezentowanych wyników. Dodatkowo nie jestem pewien, na ile zasadne było wprowadzenie w tej części niektórych rycin, jak na przykład Ryc. 3, która jest fragmentem większej ilustracji z doniesienia o projekcie re-klassyfikacji komórek mózgu w oparciu o indywidualne profile transkrypcji, morfologię i profile aktywności. W tekście Wstępu odniesienie do Ryc.3 pojawia się w kontekście zróżnicowania rodzajów komórek w mózgu, bez zagłębiania się w informacje z odnośnika. Zamykając tę część oceny chciałbym też odnieść od cytowanego piśmiennictwa, które jest bardzo obszerne (244 pozycje) i szczególnie rozbudowane w kontekście samych agiomotyn, co oczywiście jest jak najbardziej zasadne.

Jako cel pracy postawione jest zbadanie roli agiomotyn i powiązanego z nimi białka Yap1 w rozwoju mózgu oraz ewentualnych zaburzeń, spowodowanych ich genetyczną inaktywacją. Jako część celu wskazane jest też wytworzenie genetycznie modyfikowanych zwierząt będących modelem do badań nad rolą agiomotyn. Uważam że cel postawiony jest nieco zbyt ogólnie i trochę zbyt mocno kładzie nacisk na aspekty metodyczne.

Najtrudniejszą do podsumowania w recenzji częścią rozprawy była dla mnie Metodyka. Zróżnicowanie i zaawansowanie przedstawionej metodyki jest wprost nieporównywalne z czymkolwiek, z czym spotkałem się wcześniej. Dosłownie brak mi tutaj słów aby opisać, jaka jest skala ambicji i jak ogromny nakład pracy musiał zostać wykonany w celu realizacji pracy. Podczas badań wytworzono przez krzyżowanie kilka nowych szczepów genetycznie modyfikowanych zwierząt, stosowano warunkowe mutacje wywołane za pomocą wirusów wyrażających Cre, przeprowadzone zostały złożone analizy oparte o barwienie immunofluorescencyjne, obserwowano zachowanie zwierząt w kilkunastu paradygmatach behawioralnych i wykorzystano rezonans magnetyczny od kompleksowej analizy anatomii mózgu. Jeszcze raz chciałbym podkreślić, że nakład pracy jaki został włożony w przeprowadzenie opisanych doświadczeń znacznie przekracza moje wyobrażenie o tym, co jest możliwe podczas realizacji pracy doktorskiej. Muszę jednak zastrzec się nałożonym obowiązkiem recenzenta i wskazać kilka uwag krytycznych. Niektóre drobne elementy metodyczne wydały mi się dość nietypowe, jak na przykład spektrofotometryczne oznaczanie białka w homogenacie, metoda podania wirusa do mózdzka u ośesek myszy, skąpy opis strategii wytworzenia genetycznie modyfikowanych zwierząt (np., czy były hodowane kongenicnie? Jaki był genotyp SynCre?) oraz badań behawioralnych (poziom oświetlenia areny?), czy też stosowanie równoległe odchylenia standardowego i błędu standardowego średniej w analizie statystycznej. Niemniej chciałbym raz jeszcze podkreślić, że rozdział „Materiały i Metody” jest zapisem wielkiego rozmachu badań przeprowadzonych w doktoracie i mogę wskazać jedynie na niewielkie niedociągnięcia w tej części pracy.

Wyniki pracy podzielone są na dwie obszerne części. Pierwsza z nich poświęcona jest badaniom nad rolą agiomotyny i *Yap1* w rozwoju mózgu i ewentualnych konsekwencjach dla zachowania. Badania przedstawione w tej części w istotnej mierze zostały opisane w publikacji Rojek KO, Krzemień J, Doleżyczek H, Boguszewski PM, Kaczmarek L, Konopka W, et al. (2019) *Amot* and *Yap1* regulate neuronal dendritic tree complexity and locomotor coordination in mice. *PLoS Biol* 17(5): e3000253. W pierwszej kolejności zaprezentowane zostają bardzo ogólne cechy fenotypowe myszy selektywną delecją *Amot* lub *Yap1* w komórkach wyrażających synapsynę (spowolniony przyrost wagi i mniejsza waga mózgu), po czym dalsze badania skupione były już na samym mózdzku. Jako uzasadnienie przytoczona jest ekspresja Cre, ale nie jestem do końca przekonany tym argumentem; właściwszym byłaby ocena wydajności rekombinacji. Dodatkowo zaburzenia w rozwoju mózdzku nie dają bezpośredniego wyjaśnienia dla ogólnie spowolnionego rozwoju. Dalej zaprezentowane zostały badania przeprowadzone nad efektem braku agiomotyny lub *Yap1* na morfologię mózdzka. Doktorantka zaobserwowała że obie mutacje powodują zmianę grubości warstwy drobinowej mózdzka, nie zaburzając jednak jego ogólnej budowy anatomicznej. Obie mutacje zaburzały również strukturę drzew dendrytycznych komórek Purkiniego, a u zwierząt z inaktywacją *Yap1* dodatkowo zaobserwowane zostały zmiany w dystrybucji komórek ziarnistych. Wprowadzone mutacje miały też wpływ na zachowanie zwierząt. W obu przypadkach zaobserwowano pogorszenie umiejętności utrzymania się zwierząt na obracającym się pręcie i zmiany w koordynacji ruchu (kadencji kroków). Mam trzy uwagi krytyczne do tej części pracy. Po pierwsze, poszczególne analizy przeprowadzone są na zwierzętach w różnym wieku; o ile dobrze zrozumiałem na myszach w wieku kilku tygodni przeprowadzono badania na morfologią neuronów, na dorosłych zwierzętach badania behawioralne, a w jednym przypadku wskazano zmianę wagi mózdzka u zwierząt w wieku około 5 miesięcy. Dodatkowo, nie jest dla mnie do końca jasnym, czy w badaniach wykorzystywano zwierzęta obu płci, czy też tylko samce. Druga kwestia to względnie skromny opis wyników behawioralnych. System CatWalk ocenia >100 parametrów zachowania zwierząt, zaprezentowanych jest 6 (3 jeśli zignorujemy podział na przednie i tylne kończyny). Co więcej nie jest oczywistym, czy zmiany w koordynacji są powiązane z zaburzonym działaniem mózdzka, czy też mogą być spowodowane efektem braku agiomotyny lub *Yap1* w innych częściach mózgu. W końcu trzecią kwestią jest żal natury osobistej. Mój wzrok pogarsza się, tak więc Rycina 22 była dla mnie prawdziwym wyzwaniem. Niezależnie od tego zauważam, że wiele z rycin w tej części pracy jest identycznych w części z ilustracjami zamieszczonymi w publikacji (np. Ryc. 13 z Fig.1 i 3).

Druga część Wyników opisuje wytworzenie i charakteryzację fenotypu zachowań zwierząt z pełną inaktywacją genu *Amotl1* („KO”). Najpierw pokazana jest analiza ekspresji *Amotl1* w mózgu oraz komórkach nerwowych hipokampa w hodowli. Następnie opis wytworzenia szczepu z delecją w genie *Amotl1*, w którym nie zaobserwowano zmian wagi dorosłych zwierząt, niemniej waga mózgu u mutantów była znamienne większa, co wiązało się ze zwiększoną objętością komór bocznych. Mutacja spowodowała również zmiany w zachowaniu zwierząt, w tym zmienioną ruchliwość w otwartym polu, mniejszą skłonność do zakopywania budzących lęk przedmiotów oraz budowania gniazd i zmienione zachowania związane z oddziaływaniami społecznymi. Całość wyników zamyka analiza zmian anatomicznych w mózgu myszy z inaktywacją *Amotl1* przeprowadzona za pomocą obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (MRI). Mam kilka uwag względem tej części pracy. Po pierwsze, porównując pierwszą i drugą część wyników dostrzegam, że różnią się one metodycznie i stawiają nacisk na charakteryzację zupełnie różnych fenotypów. Drugą kwestią jest układ przedstawionych badań. Nie jest dla mnie zrozumiałym dlaczego badania z wykorzystaniem MRI

umieszczone są na końcu, podczas gdy wydają się naturalną kontynuacją wyniku pokazanego na Ryc. 31. Wreszcie mam kilka zastrzeżeń do przeprowadzonych testów behawioralnych i konkluzji wyciąganych z obserwowanych zachowań. Dla przykładu analiza zachowania w kolistym otwartym polu (Ryc. 33 i Ryc. 34)-wyniki pokazane na panelach A i B ryciny 33 trudno mi ze sobą pogodzić; przypuszczam, że nastąpiła omyłkowa zamiana opisów. Co ważniejsze, ewentualna zwiększona aktywność w otwartym polu nie jest tożsama z patologiczną hiperaktywnością. Problematyczna jest również dla mnie ocena, czy zwierzęta były mniej skłonne do zachowań związanych z lękiem. Na rycinie 34A nie ma zaznaczonego podziału areny, a profil pokazany w dolnej części może sugerować ogólnie zmniejszoną eksplorację. Dodatkowo bez wskazania natężenia oświetlenia wynik jest trudny w interpretacji. Jak rozumiem Ryc. 43 jest dalszą analizą tych samych danych? Dlaczego analiza „cofania się” przeprowadzona jest oddzielnie?

Dyskusja wyników badań podzielona jest w sposób analogiczny do Wyników. Po krótkim wprowadzeniu dyskutowane są oddzielnie części wyników poświęcone agiomotynie/Yap1 i Amotl1. Nacisk postawiony jest na opis kontekstu literaturowego przeprowadzonych badań, szlaków przekazywania sygnałów powiązanych z agiomotynami oraz rozważania nad podobieństwem uzyskanego fenotypu do efektów innych mutacji genów. W drugiej części dyskusji podjęta jest również odważna próba zestawienia fenotypu myszy z inaktywacją Amotl1 z objawami psychozy. Całość robi wrażenie znakomitego odczytania doktorantki, biegłości w szerokiej dziedzinie mechanizmów wpływających na neuroplastyczność. Na samym początku odczuwalny jest też rozmach stylistyczny podobny do pierwszej części Wstępu, opis wykorzystania genetycznie modyfikowanych zwierząt w badaniach nad neuropatycznością wyprowadzany jest wprost z prac Capecchiego (i innych mu współczesnych). W tym przypadku nie wskazuję tego jako krytyki, chcę raczej podkreślić nieszablonowe podejście i ambicję.

Ogólnie, rozprawa doktorska robi ogromne wrażenie i właśnie to określenie moim zdaniem najlepiej do niej pasuje. Odczuwalny jest ogrom ambicji, złożoności metodycznej badań i nakładu włożonej pracy. Raz jeszcze podkreślę, że uzyskane wyniki są istotnym wkładem w rozwój badań nad mechanizmami kierującymi plastycznością neuronalną. W odpowiedzi na niniejszą recenzję prosiłbym o odniesienie się do dwóch kwestii:

1. Jaka jest specyficzność komórkowa ekspresji SynCre u zwierząt transgeniczných i w przypadku podania wirusów?
2. Czy w analizach budowy anatomicznej mózgu myszy Amotl1 KO z wykorzystaniem MRI zaobserwowano zmiany w budowie lub objętości opuszki węchowej?



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 pkt. 2 i 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (t.j. Dz. U. z 2020, poz. 85 ze zm.) oraz Regulaminu Rady Naukowej z 13.04.2018 r. Załącznik nr. 1 (ze zm. z 06.12.2019 r.). Wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Joanny Krzemień do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Niewątpliwie, w niniejszej recenzji nie szczędziłem uwag, ale uznałem, że jakość pracy jest na tyle oczywista, iż nie zostaną one przyjęte jako negatywna ocena badań. Jeszcze raz chciałbym stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani Joanny Krzemień jest zapisem wielkiej ambicji naukowej, a uzyskane wyniki były częścią publikacji, która została wyróżniona najważniejszą nagrodą przyznawaną w Polsce dla prac naukowych z obszaru neurobiologii. Wpływ uzyskanych wyników na stan wiedzy i dalsze kierunki prowadzonych badań jest niezaprzeczalny. Dlatego też składam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem,

Dr hab. Jan Rodriguez Parkitna

Kierownik Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Smętna 12, 31-343 Kraków, tel.: +48 12 6623328, e-mail: janrod@if-pan.krakow.pl



Do recenzji pozwalam sobie dołączyć szereg drobniejszych uwag, które nie mają wpływu na przedstawioną ocenę pracy.

1. Liczne błędy językowe:

- a. Niewłaściwe używanie dopełniacza saksońskiego („s”). Na przykład na stronie 18, 5 linia od dołu „individuals” zamiast „individual’s” i w wielu innych miejscach.
- b. Błędy odmiany trzeciej osoby czasowników, na przykład strona 12, 13 linia od góry, „distinguish” zamiast „distinguishes” i w wielu innych miejscach.
- c. Błędne użycie przedimków („articles”). Na przykład strona 17, 7 linijka od dołu, moim zdaniem bez przedimka nieokreślonego przed „highly” zdanie traci sens.
- d. Błędne użycie słów. Na przykład „percentage” zamiast „percent” (strona 13), „mice behavior” zamiast „murine” lub „mouse” (wiele razy) albo „carrier” zamiast „career”.

Nie jestem ekspertem w zakresie języka angielskiego, ale moim zdaniem praca zawiera też znaczną liczbę błędów gramatycznych.

2. Na stronie 7, w spisie skrótów, niektóre raczej nie wymagają wprowadzenia, za to brak szeregu innych. Na przykład, Glu czy Gln są standardowymi nazwami aminokwasów (i najczęściej zapisywane z pierwszą dużą i kolejnymi małymi literami). „Da” jest jednostką. Z reguły nie wprowadza się skrótu PCR. Brak za to na przykład BSA. RIPA rzeczywiście oznacza „radioimmunoprecipitation assay”, ale bez dodania „buffer” trochę traci sens. Rozwinięcie skrótu CREB na stronie 18 określiłbym jako nieszablonowe.
3. Pisownia nazw genów mysich powinna być w *kursywie* na przykład *Yap1*.
4. Pisownia nazw szczepów odbiega od rekomendowanych. Na przykład, *Yap1 fl/fl*; *SynCre* jako minimum brak jest genotypu Cre. Często stosuje się składnię *Yap1^{SynCre}*. Określanie tej linii jako „knockout” jest nieściśle. Linia wyrażająca białko tdTomato (Tomato jest innym białkiem) to prawdopodobnie tak zwana „Ai14”.
5. Na stronie 90, w podpisie do ryciny 31 wskazane są inne zwierzęta kontrolne dla paneli C i E niż na samej rycinie.
6. Na stronach 63-64, przy analizie wyników pokazanych na Rycinie 16C powinna zostać zastosowana dwuczynnikowa ANOVA.
7. Na Rycinie 35 brak oznaczeń paneli, które użyte są w tekście. Dodam też, że przedstawiony na niej test behawioralny jest w mojej ocenie bardzo arbitralny.
8. Zważywszy na możliwości Eco-Hab przedstawione wyniki są bardzo małym wycinkiem danych (Rycina 41).

Katowice / 15.09.2020

Centrum Medycyny
Doświadczalnej

40-752, Katowice
ul. Medyków 4
<http://cmd.sum.edu.pl/>

KIEROWNIK
prof. dr hab. n. med.
Jarosław Barski

tel.: (+48 32) 208 85 93
fax: (+48 32) 208 88 31

jbarski@sum.edu.pl

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 208 85 93
tel.: (+48 32) 208 88 32
fax: (+48 32) 208 88 31

cmd@sum.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Krzemień:**„The role of Amot and Amotl1 in the central nervous system”.**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy badań nad rolą białek z grupy angiomiotyn Amot1 oraz Amotl1 w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN).

Oceniana dysertacja powstała pod opieką promotorską Pana dr hab. Tomasza J.

Prószyńskiego przy współpracy z promotorem pomocniczym Panem dr Pawłem

Boguszewskim. Badania, które stały się podstawą tej rozprawy zostały przeprowadzone w Pracowni Synaptogenezy Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Jak zaznaczono na drugiej stronie dysertacji opisane w niej wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie PLOS Biology jako praca zatytułowana „Amot and Yap1 regulate neuronal dendritic tree complexity and locomotor coordination in mice”.

Decyzją Kapituły Konkursowej, opublikowana praca została wyróżniona nagrodą zespołową im. Jerzego Konorskiego za najlepszą pracę z dziedziny neurobiologii wykonaną w Polsce w 2019 roku.

Wsparcie finansowe dysertacji stanowiły środki przyznane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu OPUS.

Recenzowana praca ma klasyczną formę monografii, składa się ze 137 stron i jest podzielona 7 typowych dla tego rodzaju opracowań rozdziałów i podrozdziałów. Praca została zredagowana w języku angielskim.

Pierwszą część pracy stanowi tabela wyjaśniająca znaczenie wszystkich skrótów użytych w tekście. W dalszej kolejności następują streszczenia w języku angielskim i polskim, a po nich rozdział „Introduction” będący wprowadzeniem do tematyki stanowiącej treść dysertacji. Rozdział ten jest dość obszerny i zawiera dużo bardzo podstawowych informacji na temat organizacji i struktury OUN, które można by pominąć, mając na uwadze gremium, zaangażowane w powstanie i ocenę tej rozprawy doktorskiej.

Moim zdaniem wskazane byłoby zamieszczenie we wstępie podstawowych informacji na temat systemów rekombinacji tkankowo specyficznej między innymi w systemie Cre-loxP. Ten aspekt metodyki badawczej jest zapewne mniej znany nawet wśród ekspertów w dziedzinie neurobiologii. Z redakcyjnego punktu widzenia mam w tym miejscu jeszcze jedną uwagę, dotyczącą całej monografii i sposobu umieszczania podpisów pod rycinami. Część podpisów została automatycznie przeniesiona na następną stronę, gdzie nieomal zlewa się z tekstem poniżej. Myślę, że można by tego uniknąć przesuując przynależące do tych podpisów ryciny.

W drugim rozdziale „Aim of the study” doktorantka wskazała w jasny sposób cele naukowe jakie przyświecały jej podczas realizacji przewodu doktorskiego.

W rozdziale numer 3 „Materials and methods” znajduje się szczegółowy opis wszelkich aspektów metodycznych związanych z częścią eksperymentalną rozprawy. Autorka zamieszczając dane dotyczące zwierząt doświadczalnych wykorzystanych w eksperymentach nie wyjaśniła jednak, dlaczego grupą kontrolą były (czy też mogły być) zwierzęta ze standardowej linii hodowlanej C57Bl/6. Ta informacja jest kluczowa, szczególnie w przypadku badań wykorzystujących metody behawioralne. Istotną część rozdziału 3 stanowi podrozdział 3.9 „Behavioral assessments, w którym to doktorantka szczegółowo opisuje metody i testy behawioralne wykorzystane podczas analizy zachowania zwierząt. Oceniający nie znalazł natomiast informacji na temat organizacji czasowej tych badań, pozwalającej na uniknięcie wzajemnych oddziaływań poszczególnych testów na siebie. Być może do każdego z testów wykorzystano oddzielne grupy zwierząt, choć to wydaje się mało prawdopodobne ze względu na „zasadę redukcji” wskazującą na konieczność ograniczenia liczby zwierząt w eksperymencie. Brak też informacji na temat ogólnej liczby zwierząt wykorzystanych do badań. W trakcie analizy rodzajów testów badających motorykę zwierząt pojawia się też pytanie, dlaczego zwierzęta z genotypem Amotl1 badano przy pomocy testu „footprint assay”, a nie na urządzeniu CatWalk? Mam też pytanie do doktorantki, dlaczego zrezygnowała z drugiej części testu trójkomorowego, w którym zwierzę badane ma za zadanie rozróżnienie pomiędzy osobnikiem znanym i nieznanym?

Poza tymi drobnymi wątpliwościami i uwagami rozdział „Materiał i metody” został opracowany bardzo starannie i przygotowuje czytelnika rozprawy na przejście do rozdziału 4 „Results”. Rozdział ten jest najbardziej obszerną częścią spośród wszystkich rozdziałów dysertacji i jest precyzyjnym opisem wyników, bogato ilustrowanym grafiką mikroskopową oraz wykresami ułatwiającymi interpretację wyników badań. Zastosowana metodyka pozwala nie tylko na jakościową, ale i ilościową analizę materiału badawczego. Bardzo cennym uzupełnieniem metodyki badań behawioralnych, a co za tym idzie źródłem dodatkowych informacji jest zastosowanie

nowatorskiego systemu Eco-Hab, będącego autorskim rozwiązaniem pracowników Instytutu Biologii Doświadczalnej. W pierwszym z podrozdziałów doktorantka opisuje wyniki otrzymane na podstawie eksperymentów otrzymanych podczas analizy zwierząt z mutacjami w genach Amot i Yap1.

Zamieszczone tutaj schematy ilustrujące wykorzystanie systemu rekombinacji Cre/loxP, uzupełniają informacje, których brak w części wstępnej. Doktorantka opisuje w sposób systematyczny najpierw zmiany na poziomie molekularnym i morfologicznym, by następnie przejść do części poświęconej badaniom behawioralnym. Wstępne badania morfologii mózgowia wskazały, na mniejszą jego masę, przy czym dalsza analiza wykazała, iż przyczyna tego wyniku jest mniejsza masa mózdzku. To skierowało uwagę doktorantki w kierunku głębszej analizy tej części mózgowia. Dokładne badania morfologii kory mózdzku wykazały zmiany w prawidłowej morfologii tej struktury na poziomie tkankowym i komórkowym, a to z kolei zdefiniowało dobór testów behawioralnych opisanych w dalszych częściach tego podrozdziału. Przeprowadzone testy dotyczyły więc ogólnej aktywności ruchowej, zbadanej w teście otwartego pola oraz sprawności lokomotorycznej w testach na urządzeniu Rotarod, w systemie CatWalk i teście Foot-Fault. Zadaniem recenzenta nie jest oczywiście cytowanie wyników uzyskanych przez doktorantkę, natomiast podczas lektury dysertacji nasunęły się pytania, które być może będą wskazówką do dalszej analizy wychodowanych modeli transgeniczných. Pierwsze pytanie dotyczy możliwości potwierdzenia zaburzenia uczenia motorycznego w wyniku zmian morfologicznych i funkcjonalnych w mózdzku. Nasuwałoby się tutaj kilka możliwości, a mianowicie przeprowadzenie „foot-fault test” przez kilka kolejnych dni, przeprowadzenie „elevated runway test” przez kilka kolejnych dni i zbadanie jakości zjawiska LTD. Celem precyzyjniejszego zdefiniowania źródła zaburzeń koordynacji ruchowej można by było też rozważyć wyłączenie ekspresji Amot i Yap1 w sposób specyficzny dla komórek Purkiniego lub komórek ziarnistych, wykorzystując technologie Cre/loxP.

Drugi z podrozdziałów części opisującej wyniki, podrozdział 4.2 dotyczy procesu powstawania zwierząt transgeniczných z wyłączoną ekspresją Amotl1 oraz ich analizy. Doktorantka precyzyjnie pokazała sposób w jaki powstała linia transgeniczna wykorzystana w późniejszej analizie, a następnie po potwierdzeniu skuteczności zastosowanej rekombinacji materiału genetycznego przechodzi do analizy morfologicznej OUN oraz analizy behawioralnej zwierząt. W przeciwieństwie do zwierząt analizowanych w pierwszym podrozdziale, zwierzęta pozbawione Amotl1 nie wykazywały zaburzeń koordynacji ruchowej w zastosowanych testach, natomiast test otwartego pola wskazał na obniżoną lękliwość tych zwierząt oraz podwyższoną aktywność ruchową. Taki wzorec zachowania zasugerował doktorantce inny dobór testów behawioralnych, zastosowanych w tej części eksperymentów. Przeprowadzona analiza zachowania koncentrowała się na testach badających interakcje socjalne,

zachowanie kompulsywne i stereotypię ruchową, tak aby wychwycić zaburzenia charakterystyczne np. dla schorzeń spektrum autystycznego. Nie chcąc powtarzać szczegółowego opisu wyników zawartego w dysertacji ograniczę się do stwierdzenia, iż przeprowadzone testy behawioralne wykazały zaburzone interakcje socjalne przy braku stereotypii ruchowej. Interesującym uzupełnieniem informacji dotyczących charakterystycznych cech zachowania zwierząt z zablokowaną ekspresją *Amotl1* jest rejestracja wideo dostępna na platformie internetowej. Rozwój technik multimedialnych oraz możliwości prezentacji wyników badań, nieosiągalne w drukowanej wersji dysertacji są bardzo cennym uzupełnieniem, szczególnie dla eksperymentów, dla których bezpośrednia obserwacja jest najcenniejsza. Podczas analizy morfologicznej mózgowia tej grupy mutantów zastosowano też nowoczesną metodę przyżyciową jaką jest obrazowanie rezonansu magnetycznego. Wprawdzie podobne wyniki można by w tym przypadku osiągnąć klasycznymi metodami histologicznymi jednak zastosowanie techniki MRI pozwala na szybsze otrzymanie wyników i pozwala też na zachowanie do dalszych eksperymentów cennych modeli transgenicznych. Doktorantka wykorzystała ponadto metodę spektroskopii rezonansu magnetycznego co pozwoliło na określenie poziomu metabolitów mózgowia i scharakteryzowanie fenotypu mutantów *Amotl1* w kierunku zbliżonym do cech schizofrenii. Dodatkowym, pozytywnym aspektem stosowania tych metod badawczych jest redukcja liczby zwierząt wykorzystanych w eksperymencie. Po rozdziale opisującym wyniki następuje ich omówienie w części „Discussion”. W rozdziale tym doktorantka przeprowadziła gruntowną i systematyczną analizę wyników, porównując je z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi przez inne grupy badawcze. Doktorantka posługuje się biegle szerokim spektrum piśmiennictwa, co podkreśla dodatkowo ostatnia część pracy, „References”, zawierająca 244 pozycje. Informacje zawarte w dyskusji jak i wnioski zawarte w części 6 – „Concluding remarks” są próbą wyciągnięcia wniosków z otrzymanych wyników przy jednoczesnym wskazaniu na wartości translacyjne badań pozwalające być może w przyszłości na praktyczne wykorzystanie danych eksperymentalnych w tworzeniu strategii terapeutycznych schorzeń neurologicznych i psychiatrycznych. Wnioski jakie nasuwają się po lekturze tej dysertacji bez wątplenia wspierają tezę, iż u podłoża wielu schorzeń z tej grupy leżą zaburzenia rozwojowe OUN, których rezultatem są nieprawidłowo zbudowane i nieprawidłowo funkcjonujące połączenia interneuronalne.

Uwagi końcowe.

Niewątpliwie wartość pracy podnosi fakt, iż jej wyniki zostały częściowo opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku oddziaływania.

Z obowiązku mojej funkcji jako recenzenta mam jednak kilka pytań i uwag do doktorantki:

- Tytuł pracy sugeruje moim zdaniem, iż modele transgeniczne stworzone dla obu tych czynników zostaną przeanalizowane podobnym arsenałem metodycznym przez co powstanie bardziej systematyczny i jasny obraz wyników, wykluczający cechy fenotypowe, świadczące o braku czy występowaniu zaburzeń na podstawie testów, a nie tylko wnioskowania. Czy silny fenotyp motoryczny w przypadku Amot1 wyklucza współistnienie zaburzeń lękowych czy socjalnych i stąd brak badań w tę stronę u tych zwierząt?
- Czy zaburzenia lękowe i socjalne charakteryzujące zwierzęta z knockoutem Amot1 wykluczają (być może bardziej subtelne) zaburzenia motoryczne. W tym kontekście proszę o odniesienie się do kwestii czy „chodzenie tyłem” jest zaburzeniem koordynacji ruchowej, czy nie jest?
- Dlaczego badania MRI nie zastosowano w przypadku wszystkich modeli zwierzęcych wykorzystanych w badaniach?
- Doktorantka słusznie dostrzega niedoskonałość metodyczną modeli transgenicznych wykorzystywanych w pracy, gdyż są tu mutacje o charakterze ogólnym, co ogranicza możliwości wnioskowania co do źródła obserwowanych zaburzeń. Czy w przypadku kontynuacji badań planowane jest wykorzystanie zwierząt o bardziej zawężonej ekspresji rekombinazy Cre?

Powyższe uwagi i pytania nie mają na celu poddania w wątpliwość wartości przeprowadzonych badań i wartości rozprawy doktorskiej będącej ich wynikiem.

Jest ona bardzo znaczącym przyczynkiem do badań nad powiązaniem budowy i funkcji OUN na poziomie molekularnym i komórkowym ze zmianami fenotypowymi charakterystycznymi dla schorzeń o charakterze neurologicznym i psychiatrycznym.

Przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668) oraz Regulaminu Rady Naukowej z 13.04.2018 roku, z załącznikiem nr. 1 (ze zm. z 06.12.2019 roku), w związku z czym wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Joanny Krzemień do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Joanny Krzemień.

KIEROWNIK
Centrum Medycyny Doświadczalnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
prof. dr hab. n. med. Jarosław Barski