Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk

Prof. dr hab. Barbara Zabłocka
Pracownia Biologii Molekularnej

Warszawa, 22.04.2024 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Leny Majchrowicz

pt." Rola czynnika odpowiedzi na surowicę – SRF oraz jego koaktywatorów - MKL1 i MKL2 w regulacji rozwoju neuronów"

wykonanej w Pracowni Neurobiologii, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

promotor dr hab. Katarzyna Kalita-Bykowska, profesor Instytutu Nenckiego PAN

promotor pomocniczy: dr Ewa Liszewska

Celem omawianej rozprawy było zbadanie roli czynnika transkrypcyjnego SRF i jego koaktywatorów: białek MKL1 i MKL2 w regulacji rozwoju neuronów w trzech modelach badawczych in vitro: w hodowli pierwotnych neuronów myszy i szczura oraz neuronów pochodzących z ludzkich komórek iPS. Zagadnienie podjęte przez doktorantkę wynika bezpośrednio z zainteresowań pani promotor, dr hab. Katarzyny Kalita-Bykowskiej, która od lat bada czynniki transkrypcyjne, które mają znaczenie dla rozwoju i życia neuronów. Dużo uwagi poświecą też morfologicznym zmianom plastycznym, które związane są z dojrzewaniem układu nerwowego oraz jego funkcjonowaniem. Można śmiało sugerować, ze odkrycia z udziałem dr hab. Kalita-Bykowskiej roli czynników transkrypcyjnych i ich koaktywatorów w kształtowaniu morfologii neuronów i połączenie tej wiedzy z rozwojem chorób neuropsychiatrycznych mają istotne znaczenie dla współczesnej neurobiologii i medycyny. Skuteczne stawianie czoła wyzwaniom klinicznym wymaga dogłębnego poznania mechanizmów molekularnych leżących u podstaw badanych patologii. Czynnik odpowiedzi na surowice (SRF) jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym w mózgu, który odpowiada z kształtowanie i funkcje neuronów w prawidłowo rozwijającym się ośrodkowym układzie nerwowym, a wydaje się, że jego dysfunkcje wiązane są z chorobami neurologicznymi. Zatem temat podjęty przez Doktorantkę jest rozwinięciem prac promotorki Rozprawy i wpisuje się w linię badań podstawowych prowadzonych w Pracowni Neurobiologii, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

Wyniki doświadczeń przedstawione w recenzowanej pracy wskazują na wpływ czynnika SRF na kształt dendrytów i dojrzewanie kolców dendrytycznych w różnych modelach in vitro, co uzupełnia wiedzę o funkcji tego czynnika w rozwijających się neuronach.

Ocena merytoryczna i formalna rozprawy

Rozprawa przygotowana jest zgodnie z obowiązującymi zasadami dotyczącymi prac doktorskich, które nie są zbiorem opublikowanych artykułów. Doktorantka posługuje się poprawnym stylistycznie językiem, a podczas lektury pracy nie dostrzegłem zasadniczych błędów edytorskich czy uchybień stylistycznych, a nieliczne zasygnalizowane będą w dalszej części recenzji.

Pracownia Biologii Molekularnej
bzablocka@imdik.pan.pl

Monografia liczy 142 strony i ma klasyczny układ. Po stronie tytułowej podano nazwy dwóch grantów, z których były finansowane badania przedstawione w rozprawie, a których kierownikiem była promotor pracy. Następnie w kolejności czytamy spis treści monografii, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz liczącą 5 stron, alfabetyczną lista skrótów stosowanych w rozprawie. Po niej rozpoczyna się rozdział 1 czyli **Wstęp**, który podzielony jest na 14 podrozdziałów, liczy 23 strony i zawiera właściwie wyselekcjonowane informacje naukowe, zilustrowane siedmioma schematami i przejrzystymi rycinami ułatwiającymi śledzenie wywodu Doktorantki. Uwagę zwraca obecność dwóch podrozdziałów poświęconych chorobom neurologicznym. Pierwszy z nich, 1.5, przedstawia ogólny opis kliniczny i dane pozyskane z modeli badawczych, które dotyczą rozwoju drzewka i kolców dendrytycznych, a drugi, 1.14, przedstawia wyniki badania neuronów pochodzących z komórek iPS wyprowadzonych z fibroblastów chorych z zespołem Retta lub łamliwego chromosomu X. Jest to ciekawy zabieg, który, jak rozumiem, ma uzasadnić wykorzystanie ludzkich iPSC w tej rozprawie.

W następnym rozdziale został jasno przedstawiony **cel badań**, a cele szczegółowe doprecyzowują kombinacje układów doświadczalnych aby przybliżyć się do zrozumienia ścieżek poprzez które SRF reguluje rozwój neuronów.

Obszerny, 26 stronicowy rozdział **Materiały i Metody** otwierają tabele pokazujące wszystkie wykorzystywane w pracy odczynniki, enzymy, wektory i przeciwciała. W drugiej części opisane są metody hodowli i transfekcji różnych komórek, produkcji wektorów lentiwirusowych praz reakcji IF i PCR oraz analizy drzewa dendrytycznego: kształtu, struktury i gęstości kolców. Oposy wskazują, że Doktorantka opanowała m. in. metodę zakładania hodowli pierwotnej komórek izolowanych z kory mózgu oraz skutecznych manipulacji genetycznych wieloma różnymi plazmidami i wirusami. W pracy wykorzystano trzy różne modele badawcze: neurony pochodzące z hipokampa osesków myszy transgenicznych przygotowanych do obniżenia ekspresji SRF ($SRF^{flox/flox}$), neurony pierwotne kory mózgu szczura oraz neurony pochodzące z ludzkich komórek iPS. Te ostatnie zostały wyprowadzone przez doktorantkę z iPSC z komórek skóry uzyskanych od zdrowych kobiet i przeprogramowanych w zespole prof. Jacka Jaworskiego w MIBMiK. Zastanawiam się dlaczego badania mechanizmów molekularnych stojących za aktywnością czynnika transkrypcyjnego SRF (miRNA i SNP w MLK1/2) prowadzono odpowiednio na neuronach pierwotnych myszy i szczura, a nie w jednym modelu badawczym?

Najobszerniejszy (36 stron) rozdział **Wyniki** przedstawia dane doświadczalne zebrane dla weryfikacji założeń pracy. We wszystkich trzech modelach badawczych wykazano, ze manipulacje czynnikiem transkrypcyjnym SRF i jego aktywatorami MLK1/2 zdecydowanie wpływają na kształt drzewa dendrytycznego. Wykazano złożoność regulacji dojrzewania drzewa dendrytycznego, w którym udział biorą liczne mikroRNA oraz modyfikować go mogą polimorfizmy wykryte w genach kodujących koaktywatory MLK1/2.

W pierwszej części wyników bardzo podoba mi się charakterystyka rozwoju neuronów hipokampa myszy w czasie hodowli poprzez immunoblotting białek charakterystycznych

dla dojrzałych komórek: PSD-95, receptorów glutaminianu oraz CamKIIa. Często jest ona pomijana i czas wyboru hodowli do doświadczeń opiera się na danych literaturowych, a hodowle mogą różnić się od siebie. To działanie doktorantki oceniam bardzo dobrze.

W pracy przedstawiono wyniki uzyskane w hodowli neuronów hipokampa myszy dotyczące zmian w ekspresji mikroRNA w warunkach obniżonej obecnosci SRF. Na Ryc. 15 zamieszczono mapę ciepła, która pokazuje, ze obecność niektórych miRNA ulega obniżeniu a innych podwyższeniu w nieobecności SRF. Do dalszych badan wybrano miRNA-132. Potwierdzono badania przesiewowe i pokazano, że w neuronach mysich z obniżonym poziomem SRF ekspresja miRNA-132 uległa obniżeniu. Jednak jego nadekspresja w tych neuronach nie przywróciła „dzikiej" morfologii dendrytów i kolców dendrytycznych. Ciekawa jestem czy badano wpływ innych miRNA o obniżonej ekspresji z listy przedstawionej na Ryc 15. Czy nadekspresja któregoś z nich wpłynęła na morfologię i dojrzewanie dendrytów? Jakie inne skutki komórkowe może mieć obniżenie ekspresji SRF na rozwijające się neurony poza wpływem na rozwój drzewa i dojrzewania kolców dendrtycznych? Z mapy ciepła wynika też że niektórych z badanych miRNA jest więcej w neuronach pozbawionych SRE niż w komórkach prawidłowych. Ciekawa jestem zdania Doktorantki na temat tego wyniku.

W mojej opinii najciekawsza cześć pracy to weryfikacja założenia, ze polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP) i mutacje występujące naturalnie w genach kodujących koakywatory SRE mogą zmienić ich funkcje i wpływać na aktywność transkrypcyjną i dojrzewanie neuronów. Założenie opiera się na powiazaniu występowania SNP ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zaburzeń psychicznych. Ta część badań prowadzona była na neuronach kory mózgu szczura. Szkoda, ze mając model ludzkich neuronów pozyskanych z komórek iPS, nie wykorzystano go do tych doświadczeń, co byłoby logiczną konsekwencją badania ludzkich SNP. Pozostając przy tym ostatnim modelu badawczym, nie jest dla mnie jasne w jakim celu sprawdzano krótkie tandemowe powtórzenia w celu określenia pokrewieństwa osoby – dawcy komórek. Badanie to nie wnosi nowej informacji o funkcji SRE w neuronach. Natomiast wszystkie kontrolne działania dotyczące sprawdzenia zdolności komórek iPS do różnicowania w trzy listki zarodkowe oraz badanie czynników pluripotencji uważam za ważne z racji przedstawienia dowodów na prawidłowe wyniki manipulacji molekularnych w tym skomplikowanym układzie doświadczalnym.

Wracając do SNP w genach kodujących MLK, wykonano szereg doświadczeń dotyczących wpływu poszczególnych, wybranych wariantów białek MLK na właściwości transkrypcyjne SRE, kształt i rozległość drzewa dendrytycznego neuronów kory mózgu szczura, których wyniki można podsumować, że modyfikują badane parametry, ale nie dopatrzyłam się jakiejś konsekwencji w efektach poszczególnych SNP. Np. polimorfizmy R31H oraz P344L w MKL1 nie zmieniają lokalizacji komórkowej i aktywności transkrypcyjnej czynnika ani liczby dendrytów, ale statystycznie istotnie zmniejszają długość dendrytów. Mając świadomość bardzo skomplikowanej sieci regulacji wzrostu i dojrzewania neuronów ciekawa jestem jakie, zdaniem Doktorantki, kolejne doświadczenia można zaprojektować

na podstawie tych wyników aby bardziej wnikliwie powiązać dany SNP z zaburzeniem/ami psychicznymi, i czy to w ogóle jest możliwe.

Dyskusja zajmuje 10 stron i jest odniesieniem uzyskanych wyników do prac innych autorów o zbliżonej tematyce. Struktura Dyskusji odzwierciedla układ rozdziału „Cele pracy". Najwięcej uwagi poświęcono rozwojowi drzewa i kolców dendrytycznych w kontekście porównania wyników własnych z otrzymanymi w innych modelach oraz tkance postmortem. Ciekawa jest tez dyskusja miejsc polimorficznych w MLK i próba powiazania ich lokalizacji w strukturze białka ze skutkiem biologicznym w postaci lokalizacji komórkowej/aktywacji koaktywatora czynnika transkrypcyjnego i wpływowi na ekspresje genu reporterowego.

Cenne jest też zamieszczenie po Dyskusji rozdziału **Podsumowanie i Wnioski,** gdzie w 6 punktach przedstawione są osiągnięcia pracy , po których następuje wniosek końcowy. Rozdział jest przejrzysty nie ma w nim nadinterpretacji. **Bibliografia** jest bardzo obszerna (25 stron), uwzględnia artykuły opublikowane zarówno w ostatnich pięciu latach jak i odnośniki do wcześniejszych prac. Na końcu zamieszczono spis **dorobku naukowego Doktorantki**. Część przedstawionych w Rozprawie wyników została już opublikowana w prestiżowych czasopismach.

Proporcja poszczególnych części pracy jest odpowiednia. Rozprawa w przejrzysty sposób dostarcza wszystkich informacji pozwalających na ocenę oryginalności i istotności rozwiązanego problemu naukowego, ogólnej wiedzy Doktorantki w uprawianej dziedzinie i umiejętności prowadzenia i dyskusji badań naukowych.

Uwagi edycyjne i językowe

Praca przygotowana jest starannie. Autorka sprawnie posługuje się naukowym językiem. Można wskazać tylko kilka niedociągnięć:

- PSD to po polsku zagęszczenie postsynaptyczne bowiem *Gęstość* to wielkość fizyczna czyli masa właściwa – stosunek masy pewnej ilości substancji do zajmowanej przez nią objętości.
- Często stosowanym terminem, w różnych odmianach stylistycznych jest określenie „istotnie statystyczny" (np. str. 87) zamiast sformułowanie statystycznie istotny.
- Brak legendy do ryciny 31 d), str 95

Podsumowanie

Wysoko oceniam przedstawioną do oceny dysertację. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego poznawczo i wymagającego metodycznie problemu naukowego. Rzetelnie przeprowadzone badania, z zastosowaniem złożonego warsztatu metodycznego i odpowiednich kontroli, doprowadziły do uzupełnienia dotychczasowej wiedzy o roli czynnika transkrypcyjnego SRF i jego koaktywatorów MLK1 i 2 w rozwijających się neuronach. Uzyskane wyniki mają w większości oryginalny charakter. Co

ważne, rezultaty badań inspirują do formułowania kolejnych pytań, odkrywają zatem nowe horyzonty poznawcze.

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 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr inż. Leny Majchrowicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

prof. dr hab. Małgorzata Kajta
Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki
Zakład Farmakologii
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
e-mail: kajta@if-pan.krakow.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Leny Majchrowicz

„Rola czynnika odpowiedzi na surowicę – SRF *oraz jego koaktywatorów* – MKL1 *i* MKL2 *w regulacji rozwoju neuronów”*

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY

Rozprawa doktorska mgr inż. Leny Majchrowicz powstała pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Kality-Bykowskiej, profesor Instytutu Nenckiego PAN (Promotor) i dr Ewy Liszewskiej (Promotor pomocniczy) w Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie liczącego 142 strony opracowania, w którym wyodrębniono typowe rozdziały, jakimi są: *Streszczenie* w j. polskim i angielskim, *Spis skrótów*, *Wstęp*, *Cele pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Podsumowanie i wnioski* oraz *Bibliografia*. Dodatkowym elementem opracowania jest wykaz publikacji stanowiących *Dorobek naukowy Doktorantki*, w którym wskazano 2 artykuły zawierające wyniki przedstawione w rozprawie: Roszkowska i wsp. 2022 (*Cell Mol Life Sci*) oraz Liszewska i wsp. 2021 (*Stem Cell Res*). W spisie cytowanego piśmiennictwa znalazło się 377 publikacji, głównie anglojęzycznych. Struktura przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej w pełni odpowiada przyjętym standardom.

Z informacji na temat źródeł finansowania podjętych badań wynika, że były nimi 2 granty Narodowego Centrum Nauki zdobyte przez dr hab. Katarzynę Kalitę-Bykowską w konkursach SONATA BIS i OPUS, odpowiednio, na projekt pt. *Rola białka serum response factor (SRF) w regulacji plastyczności homeostatycznej* oraz projekt pt. *Rola białek MKL w regulacji ekspresji genów, rozwoju synaps i chorób neurorozwojowych*.

Dotychczasowy dorobek publikacyjny Autorki rozprawy obejmuje 7 artykułów naukowych opublikowanych na przestrzeni 6 lat w czasopismach: *Cell Mol Life Sci* (Roszkowska i wsp. 2022), *Stem Cell Res* (Liszewska i wsp. 2021), *Dis Aquat Org* (Satora i wsp. 2022), *Free Radic Biol Med* (Sołek i wsp. 2022), *Environ Res* (Sołek i wsp. 2018),

Toxicology (Sołek i wsp. 2017) oraz *Electrotechnical Rev* (Koziorowska i wsp. 2017). Łączny współczynnik wpływu (*Impact Factor*) wynosi niemal 27, co potwierdza rzetelność prowadzonych badań i współgra z rozwojem naukowym Doktorantki.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY

Streszczenie/*Abstract* w sposób niezwykle jasny przedstawia ideę badań podjętych przez Doktorantkę oraz najważniejsze wyniki, które są tożsame z wynikami badań opisanymi w rozdziale *Wyniki*. W nawiązaniu do tytułu rozprawy, oś badań stanowi czynnik odpowiedzi na surowicę (SRF) i jego koaktywatory, MKL1 i MKL2. Natomiast głównym celem badań jest ustalenie, w jaki sposób SRF i jego koaktywatory MKL wpływają na powstawanie i dojrzewanie drzew i kolców dendrytycznych.

Na 24 stronach *Wstępu* znalazły się podrozdziały poświęcone m.in. budowie i funkcji neuronów, drzewa dendrytycznego i kolców dendrytycznych, budowie synaps i plastyczności, a dalej chorobom związanym z zaburzeniami rozwoju drzewa dendrytycznego i kolców dendrytycznych (spektrum autyzmu, zespół łamliwego chromosomu X, zespół Retta, schizofrenia, choroba dwubiegunowa), czynnikowi SRF i jego koaktywatorom MKL, aż po modelowanie zaburzeń rozwoju i dojrzewania neuronów z użyciem hodowli pierwotnych neuronów gryzoni i ludzkich neuronów pochodzących z iPSC. Ostatni podrozdział dotyczy modelowania chorób neurologicznych w oparciu o komórki wywiedzione z iPSC, zwłaszcza zespołu łamliwego chromosomu X, autyzmu, schizofrenii i zespołu Retta. Na tym etapie (str. 37) do rozprawy wkradła się drobna niekonsekwencja polegająca na zamiennym użyciu określenia „spektrum autyzmu/ASD" i „autyzm", mimo iż obydwa pojęcia nie oznaczają dokładnie tego samego zaburzenia. *Wstęp* został zilustrowany 7 rycinami, które przedstawiają w schematyczny sposób m.in. budowę neuronu, rozwój komórki nerwowej i formowanie drzewa dendrytycznego, kształty, rozwój i dojrzewanie kolców dendrytycznych, budowę białka SRF i jego koaktywatorów MKL oraz zależną od nich regulację transkrypcji. Ponadto *Wstęp* zawiera tabelę z wykazem polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w obrębie ludzkich genów *MKL1* i *MKL2*, co zostało powiązane z chorobami neurorozwojowymi, takimi jak schizofrenia, mikrocefalia czy spektrum autyzmu.

Ten pierwszy rozdział rozprawy doktorskiej został napisany bardzo ładnym i trafiającym w sedno językiem. Czyta się go z przyjemnością, ponieważ Doktorantka bardzo sprawnie przeprowadza czytelnika przez meandry wiedzy od całkiem ogólnej do bardzo szczegółowej. Uzasadnia przy tym w sposób przekonujący wybór przedmiotu badań. Z obowiązku recenzenta wymieniam kilka drobnych potknięć językowych: str. 18, w zdaniu „*Filopodia to postać kolców dendrytycznych .... we wczesnych etapach rozwoju*" sugeruję zamienić wyraz „we" na „na". Na tej samej stronie jest „10 %" a powinno być „10%"; str. 27, pierwsze zdanie w podrozdziale 1.8 jest niezrozumiałe, przypuszczalnie z powodu braku przecinka; str. 29, w tytule podrozdziału 1.9 „*Potranskrypcyjna regulacji ekspresji genów z udziałem mikroRNA*" powinno być „regulacja"; str. 30, w zdaniu „*Na poziomie komórkowym oba białka zlokalizowane są w ciele komórki i dendrytach, zaś ich obecność potwierdzono*

również w kolcach dendrytycznych …" sugeruję zamienić „zaś" na „przy czym"; str. 35, zdanie „*Potwierdzenie specyficznego dla zaburzenia fenotypu komórek uzyskanych z iPSC pacjentów jest kluczowe samego jej modelowania*" nie jest w pełni zrozumiałe.

Kolejnym rozdziałem są *Cele pracy*, które zostały sformułowane jako: **I.** Określenie roli czynnika transkrypcyjnego SRF i jego koaktywatorów, MKL1 i MKL2, w regulacji rozwoju mysich i szczurzych neuronów w hodowli *in vitro*. **II.** Ustalenie, czy wyciszenie czynnika SRF wpływa na budowę ludzkich neuronów pochodzących z iPSC. Natomiast szczegółowe cele badawcze obejmują: **a.** zbadanie wpływu SRF na dojrzewanie drzewa dendrytycznego i kolców dendrytycznych w mysich neuronach *in vitro*; **b.** weryfikację udziału mikroRNA-132 w regulacji kształtu kolców dendrytycznych w neuronach pozbawionych SRF; **c.** sprawdzenie, czy zmiany pojedynczych nukleotydów w genach *MKL1* i *MKL2* wywierają wpływ na funkcje kodowanych przez nie białek; **d.** ustalenie, w jakim stopniu SRF reguluje kształtowanie drzewa dendrytycznego w pochodzących z komórek iPSC ludzkich neuronach. W tych szczegółowych celach, w punktach b i c, brakuje informacji precyzującej pochodzenie neuronów. Szkoda również, że Doktorantka nie pokusiła się o sformułowanie hipotezy badawczej, co pozwoliłoby już na tym etapie zasugerować kierunek spodziewanych zmian.

Postęp w generowaniu myszy z nokautem *Srf* i jego koaktywatorów umożliwił identyfikację nowych genów regulowanych przez SRF w obrębie układu nerwowego, a także wskazał na znaczenie tego czynnika w rozwoju mózgu i plastyczności oraz powiązał go m.in. z epilepsją, reakcją na stres i uzależnieniem od narkotyków (Tabuchi i Ihara, 2022; *Neurochem Res*). Najnowsze badania prowadzone na Uniwersytecie Stanforda (we współpracy z 3 innymi ośrodkami naukowymi) dowodzą, że podczas mielinizacji OUN cytoszkielet oligodendrocytów jest regulowany przez SRF, a nokaut genu kodującego ten czynnik powoduje wzrost ekspresji genów związanych ze starzeniem i chorobami neurodegeneracyjnymi (Iram i wsp. 2024; *PNAS*). Zważywszy że zarówno starzenie populacji, jak i choroby zwyrodnieniowe mózgu stanowią poważne problemy cywilizacyjne, cele rozprawy doktorskiej związane z rolą białka SRF i jego koaktywatorów MKL są adekwatne do wyzwań stawianych współczesnej medycynie i nauce.

Rozdział *Materiały i metody* liczy 28 stron a w podrozdziale *Materiały i ich pochodzenie* zawiera szczegółowy wykaz różnego rodzaju odczynników, wektorów plazmidowych, enzymów restrykcyjnych, przeciwciał (z podaniem miana) i gotowych zestawów do analiz molekularnych z uwzględnieniem nazw producentów. Zostały w nim również wymienione zwierzęta doświadczalne, które scharakteryzowano jako: oseski szczurów szczepu Wistar, oseski myszy szczepu C57BL/6J i oseski myszy szczepu $SRF^{flox/flox}$. Z kolei w podrozdziale *Metody* opisano m.in. pierwotne hodowle neuronów mysich i szczurzych, wyprowadzanie, hodowlę i różnicowanie ludzkich iPSC w neurony, formowanie kul zarodkowych, a także mutagenezę ukierunkowaną, konstrukcję/produkcję wektorów lentiwirusowych zawierających konstrukt shRNA dla genu *Srf*, transfekcję i transdukcję neuronów oraz wyciszanie genu *Srf* w ludzkich i mysich neuronach. Dopełnieniem tego podrozdziału są informacje na temat analizy krótkich tandemowych powtórzeń, analizy integracji wirusa z genomem iPSC, pomiaru aktywności transkrypcyjnej, reakcji RT-PCR i qPCR, western blot, jak również wykonanych

barwień immuno-fluorescencyjnych, analiz struktury i gęstości kolców dendrytycznych, kształtu drzewa dendrytycznego, a w końcu analizy statystycznej danych i opracowania wyników. Rozdział został uzupełniony: 2 schematami tj. schematem różnicowania iPSC w neuralne komórki macierzyste metodą podwójnego hamowania białek SMAD oraz schematem obróbki zdjęć do analizy drzewa dendrytycznego; 7 tabelami zawierającymi m.in. sekwencje starterów z wprowadzonymi mutacjami w genach *MKL1* i *MKL2*, sekwencje oligonukleotydów do skonstruowania plazmidu kodującego shRNA dla genu *Srf*, wykazy plazmidów zastosowanych do produkcji lentiwirusów i wyciszenia genu *Srf*, jak również sekwencje starterów do analizy ekspresji transgenu wirusowego i czynników pluripotencji w iPSC.

Wachlarz metod służących osiągnięciu przez Doktorantkę wytyczonych celów badawczych budzi moje uznanie, choć zdaję sobie sprawę, że kompetencjami w stosowaniu zaawansowanych metod z zakresu biologii komórki, biologii molekularnej, inżynierii genetycznej, klonowania i biotechnologii molekularnej dzieliły się z Doktorantką Panie Promotor i Promotor pomocniczy. Mój autentyczny podziw budzą wymagające benedyktyńskiej wręcz pracowitości analizy morfologii kolców dendrytycznych i drzewa dendrytycznego, a także będące nadal ogromnym wyzwaniem (pomimo intensywnych wysiłków) doświadczenia wykonane na hodowlach ludzkich neuronów wyprowadzonych z iPSC. Wszystkie analizy i pomiary posiadają właściwe układy odniesienia i kontrole, co wskazuje na rzetelne przygotowanie Doktorantki do samodzielnego prowadzenia badań. Z uwag krytycznych dotyczących rozdziału *Materiały i metody*, opis analizy krótkich tandemowych powtórzeń (podrozdział 3.2.9, str. 56) jest nad wyraz lakoniczny. Z drobnych błędów, trochę razi konsekwentnie rozdzielna pisownia cyfry/liczby i znaku % np. 1 % SDS zamiast poprawnego 1% SDS (podrozdział 3.2.17, str. 63).

Liczący 37 stron rozdział *Wyniki* zawiera opis rezultatów doświadczeń wykonanych w oparciu o hodowle pierwotne neuronów myszy (A) i szczura (B) oraz neuronów ludzkich wyprowadzonych z iPSC (C).

A. <u>Doświadczenia przeprowadzone na pierwotnych hodowlach neuronów hipokampa myszy dostarczyły informacji na temat</u>:

   i. Poziomu białek NR1, GluR1, GluR2, PSD95 i CamKIIα oraz tempa formowania się kolców dendrytycznych i rozwoju drzewa dendrytycznego w różnych dniach hodowli *in vitro* (wizualizacja w oparciu o białko GFP).

   ii. Obniżenia poziomu białka SRF oraz zmniejszenia gęstości, wydłużenia i zmiany kształtu kolców dendrytycznych w komórkach hipokampa myszy $SRF^{f/f}$ z delecją genu *Srf* w obecności rekombinazy Cre (po transfekcji *Cre*).

   iii. Spadku liczby zakończeń dendrytycznych, skrócenia całkowitej długości dendrytów i mniejszej złożoności drzewa dendrytycznego w neuronach z obniżonym poziomem SRF.

   iv. Spadku ekspresji wybranych mikroRNA tj. miR-132-3p i miR-212-3p w neuronach z obniżonym poziomem białka SRF (analiza mikromacierzy i qRT-PCR).

v. Braku zależności pomiędzy zwiększonym poziomem miR-132 (mimic-132) a gęstością, długością i kształtem kolców dendrytycznych w neuronach z obniżonym poziomem SRF.

B. Doświadczenia przeprowadzone na pierwotnych hodowlach neuronów kory mózgowej szczura dostarczyły informacji na temat:

i. Wpływu zamiany pojedynczych nukleotydów na subkomórkową lokalizację białek MKL1 i MKL2 oraz aktywność transkrypcyjną (tylko niektóre warianty MKL2 spowodowały spadek lokalizacji jądrowej i rozproszonej, w MKL1 zamiana proliny na leucynę w pozycjach 2 i 244 hamowała aktywność transkrypcyjną, w MKL2 zamiana cysteiny na argininę w pozycji 647 hamowała aktywność transkrypcyjną).

ii. Wzrostu liczby zakończeń dendrytycznych i całkowitej długości dendrytów w neuronach z nadekspresją/nadprodukcją MKL1 i MKL2.

iii. Wpływu zamiany pojedynczych nukleotydów w konstruktach MKL1 i MKL2 na liczbę zakończeń dendrytycznych, całkowitą długość dendrytów, a także kształt i pole powierzchni drzewa dendrytycznego (wszystkie warianty MKL1 i 2 warianty MKL2 spowodowały skrócenie całkowitej długości dendrytów, tylko 1 wariant MKL1 zmniejszył gęstość zakończeń dendrytycznych).

C. Doświadczenia przeprowadzone na neuronach ludzkich wyprowadzonych z iPSC dostarczyły informacji na temat:

i. Obniżenia poziomu białka SRF w neuralnych komórkach macierzystych (NSC) po wyciszeniu genu *Srf* z użyciem shRNA, co skutkowało obniżeniem poziomu SRF w neuronach.

ii. Wzrostu liczby zakończeń (shSRF1, shSRF2) i łącznej długości (shSRF1) dendrytów w neuronach z obniżonym poziomem SRF.

iii. Zmiany kształtu drzewa dendrytycznego (analiza Scholla, pole powierzchni, liczba przecięć dendrytów) w neuronach z obniżonym poziomem SRF.

Doświadczenia na neuronach ludzkich zostały poprzedzone uzyskaniem 2 linii iPSC tj. ELE10 i ELE30, potwierdzeniem obecności genów i markerów pluripotencji oraz braku zanieczyszczeń mykoplazmą, a także analizą krótkich tandemowych powtórzeń (STR) służącą wykazaniu zgodności profili DNA komórek iPSC i ludzkich fibroblastów, które uległy przeprogramowaniu w iPSC. Wykonano również analizę ekspresji transgenu pochodzącego z wirusa użytego do przeprogramowania fibroblastów i stwierdzono brak ekspresji kasety przeprogramowującej w liniach iPSC, co było efektem pożądanym.

Przy wielości parametrów i analiz, doceniam tabele nr 10 i 11, które łączą określone warianty MKL1 i/lub MKL2 z upośledzeniem transkrypcji i kształtem drzewa dendrytycznego w neuronach kory mózgowej szczura. Na tym etapie lektury nasuwa się pytanie, w jakim stopniu wywołane niedoborem SRF zmiany dotyczące kolców dendrytycznych (Ryc. 14) są uzależnione od zmian związanych z drzewem dendrytycznym (Ryc. 18). Moje zastrzeżenia budzi opis ryciny nr 10, w myśl którego w kolejnych dniach hodowli następuje wzrost poziomu

białek charakterystycznych dla dojrzałych neuronów. Moim zdaniem należało doprecyzować, że chodzi o wzrost w odniesieniu do 5. i/lub 7. DIV, ponieważ np. poziom białka NR1 nie wzrasta między 15 a 17 DIV, zaś obniża się między 17 a 21 DIV. Rycina nr 37c nie jest w pełni zrozumiała, ponieważ, mimo iż opis ryciny to sugeruje (str. 103-104), nie ma na niej zaznaczonych statystycznie istotnych różnic. W ostatnim zdaniu na str. 104 sugeruję zamienić wyraz „spadku" na „zmniejszeniu".

Rozdział *Dyskusja* liczy 11 stron i zawiera 6 podrozdziałów odnoszących się do zastosowanych modeli badawczych oraz uzyskanych na ich podstawie wyników. Autorka rozprawy umiejętnie opisuje własne dokonania i konfrontuje je z odkryciami innych badaczy. Potwierdzenie właściwego doboru modelu w kontekście badań innych naukowców jest ze wszech miar słuszne. Jednak odwołując się do własnej publikacji tj. Roszkowska i wsp. 2022 Doktorantka pomija lub też niewystarczająco podkreśla informację o zawartych w niej własnych oryginalnych wynikach tożsamych z wynikami zawartymi w niniejszej rozprawie. W tym rozdziale szczególnie dobre wrażenie wywarła na mnie próba wytłumaczenia przeciwnych zmian wywołanych deficytem SRF w neuronach hipokampa myszy (Ryc. 18; spadek liczby zakończeń dendrytycznych, skrócenie całkowitej długości dendrytów) oraz w neuronach ludzkich wyprowadzonych z iPSC (Ryc. 37; wzrost liczby zakończeń dendrytów, wydłużenie łącznej długości dendrytów). Z uwag krytycznych, w zdaniu na str. 107: „*Wpływ SRF na zmniejszenie liczby kolców dendrytycznych w mysim modelu zaobserwowano również w badaniach przeprowadzonych przez Stritt i Knoll (2010)"* brakuje doprecyzowania, że chodzi o wpływ niedoboru SRF (ang. *conditional SRF ablation*). Na str. 107 4-krotne cytowanie tej samej publikacji tj. Roszkowska i in., 2022, niemal zdanie po zdaniu jest niefortunne.

Rozdział *Podsumowanie i Wnioski* budzi mój niedosyt z dwóch powodów. Po pierwsze, w podsumowaniu nie uwzględniono doświadczeń związanych m.in. z białkami NR1, GluR1, GluR2, PSD95 i CamKIIα (charakterystyka dojrzewania mysich neuronów hipokampa w hodowli *in vitro*) oraz mikroRNA (zwłaszcza miR-132 i miR-212-3p). Po drugie, mimo uzyskania oryginalnych wyników, wnioski sformułowano nad wyraz oszczędnie i nie pokuszono się o przedstawienie ich w formie schematu.

PODSUMOWANIE i WNIOSEK KOŃCOWY

W mojej opinii głównym osiągnięciem Doktorantki jest wykazanie, że: **I.** Czynnik SRF warunkuje prawidłowy rozwój i dojrzewanie kolców dendrytycznych oraz formowanie drzew dendrytycznych, przy czym niedobór SRF może spowodować: **a.** spadek liczby zakończeń dendrytycznych, skrócenie całkowitej długości dendrytów i zmniejszenie złożoności drzewa dendrytycznego, jak to zaobserwowano w postnatalnych neuronach hipokampa myszy, względnie **b.** wzrost liczby zakończeń dendrytów i wydłużenie łącznej długości dendrytów, co stwierdzono w neuronach ludzkich wyprowadzonych z iPSC. **II.** Nadprodukcja koaktywatorów SRF, jakimi są MKL1 i MKL2, stymuluje liczbę zakończeń dendrytycznych i całkowitą długość dendrytów. **III.** Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w genach *MKL1* i/lub *MKL2* zmieniają subkomórkową lokalizację kodowanych przez nie białek, hamują transkrypcję,

skracają całkowitą długość dendrytów i zmniejszają gęstość zakończeń dendrytycznych w neuronach kory mózgowej szczura.

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Leny Majchrowicz oceniam bardzo wysoko, a nieliczne uwagi krytyczne, które przytaczam z obowiązku recenzenta, nie umniejszają wartości badań i dokonanych odkryć naukowych. Wyniki badań są wysoce oryginalne i wiarygodne, ponieważ zostały uzyskane z wykorzystaniem zawansowanych technologii i zachowaniem najwyższych standardów. Aktualność badań i ich potencjalny wkład w zrozumienie patofizjologii chorób neurorozwojowych na poziomie regulacji drzew i kolców dendrytycznych nie budzą zastrzeżeń.

Rozprawa doktorska mgr inż. Leny Majchrowicz pt. *„Rola czynnika odpowiedzi na surowicę – SRF oraz jego koaktywatorów – MKL1 i MKL2 w regulacji rozwoju neuronów"* spełnia wymagania określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr inż. Leny Majchrowicz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Kraków, 6 maja 2024 r.

Małgorzata Kajta

UNIVERSITY
OF WARSAW

Faculty of Biology
Department of Animal Physiology
Magdalena Dziembowska, PhD

30 kwietnia 2024

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Leny Majchrowicz pt.
“Rola czynnika odpowiedzi a surowicę-SRF oraz jego koaktywatorów - MKL1 i MKL2 w regulacji rozwoju neuronów”.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Leny Majchrowicz została wykonana pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Kality-Bykowskiej, profesor Instytutu Nenckiego PAN oraz dr Ewy Liszewskiej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie.

Prawidłowy rozwój mózgu jest możliwy dzięki realizacji programu genetycznego w którym czynniki transkrypcyjne i ich koaktywatory takie jak SRF czy MKL1 i MKL2 odgrywają kluczową rolę. W swojej pracy doktorskiej mgr inż. Lena Majchrowicz wykazała udział czynnika transkrypcyjnego SRF w regulacji dojrzewania komórek nerwowych, a specyficznie w rozwoju drzewa dendrytycznego oraz kolców dendrytycznych. Udowodniła też wpływ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w koaktywatorach MKL1 i MKL2 na ich aktywność transkrypcyjną oraz potencjał regulacji rozwoju neuronów w hodowli *in vitro*.

Praca ma klasyczną budowę i składa się ze wstępu, rozdziału opisującego metody, wyniki oraz z dyskusji. Bibliografia zawiera 337 cytowań. Jako osobne rozdziały zostały wydzielone Cel pracy oraz Podsumowanie i wnioski. Praca zawiera wymagane streszczenie w języku angielskim i polskim.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest napisana jasnym, zrozumiałym językiem dzięki czemu czytelnik nie ma problemu z jej śledzeniem. We **Wstępie** Autorka wprowadza czytelnika w tematykę pracy opisując aktualny stan wiedzy na temat

molekularnych mechanizmów morfogenezy wypustek neuronalnych i rozwoju drzewa dendrytycznego oraz ich zaburzenia w chorobach neurorozwojowych, schizofrenii czy spektrum autyzmu.

Oddzielne rozdziały poświęca autorka charakterystyce czynnika transkrypcyjnego SRF oraz koaktywatotom z rodziny MKL, opisując szczegółowo ich budowę strukturalną i funkcje poszczególnych domen. Duża część wstępu poświęcona jest opisowi modeli wykorzystywanych do badań rozwoju neuronów *in vitro*, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych iPSC. W tej części pracy zabrakło mi nieco szerszego omówienia regulacji ekspresji genów przez mikroRNA, ze szczególnym uwzględnieniem miR-132, którego regulację i funkcję w rozwoju kolców dendrytycznych Autorka badała w swojej pracy.

Poza tą drobną uwagą uważam, że Wstęp w sposób wystarczający wprowadza czytelnika do zagadnień opisanych w wynikach.

Sekcja **Materiały i Metody** jest dostatecznie wyczerpująca, a jednocześnie odpowiednio zwięzła i nie mam do niej uwag krytycznych. Autorka opisała użyte metody w taki sposób, że z pewnością dałoby się powtórzyć wykonane doświadczenia, a przy tym odniosłam wrażenie ze dokładnie je rozumie. Praca jest bogata metodycznie i widać ze do jej wykonania autorka musiała opanować zaawansowane metody hodowli i transfekcji komórek nerwowych, ich obrazowania w mikroskopie konfokalnym a także podstawowe metody biologii molekularnej. Na szczególną uwagę zasługuje opanowanie metod wyprowadzania i hodowli ludzkich komórek iPS.

Wyniki są opisane w sposób klarowny a eksperymenty zaplanowano z należytą starannością i troską o odpowiednie kontrole. Pierwsza część tego rozdziału pokazuje zmiany w poziomie ekspresji białek synaptycznych w trakcie rozwoju hodowli komórek hipokampa. Przedstawione na Rycinie 10 wyniki analizy western blot są wyjątkowo słabej jakości. Być może warto byłoby jednak pokusić się o analizę densytometryczną aby oszacować jakiego rzędu wzrost ilości białek synaptycznych towarzyszy rozwojowi neuronów mysich w hodowli *in vitro*.

Hodowle neuronów hipokampalnych prowadzone przez Autorkę zostały także przetestowane pod względem rozwoju drzewa dendrytycznego i kolców dendrytycznych. W hodowlach uzyskanych z myszy SRF flox/flox doktorantka wyciszała ekspresję białka SRF poprzez transfekcję Cre rekombinazy, a następnie badała wpływ tego wyciszenia na

plastyczność strukturalną kolców dendrytycznych. Wyciszenie SRF zmniejszało gęstość i zwiększało długość kolców dendrytycznych. Aby uzyskać wgląd w molekularne przyczyny obserwowanych zmian, Autorka przeanalizowała zmiany poziomu ekspresji mikroRNA wywołane obniżonym poziomem białka SRF. Co ciekawe, znacznemu obniżeniu uległ poziom miR-132, który jest znany z wpływu na kształt kolców dendrytycznych, a jego nadekspresja w neuronach prowadzi do zmiany kształtu kolców dendrytycznych w kierunku kolców grzybkowatych.

W doświadczeniach Autorki pracy nadekspresja miR-132 w neuronach kontrolnych i z obniżonym poziomem SRF nie wywołała żadnego efektu na gęstość, długość lub kształt kolców dendrytycznych. Mój niepokój budzi zwłaszcza brak wpływu miR-132 na kształt kolców dendrytycznych w warunkach kontrolnych. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować (i przedstawić podczas obrony) doświadczenie, w którym dałoby się skontrolować czy użyty do nadekspresji miR-132 mimic jest funkcjonalny w neuronach?

Następnie Autorka pracy opisuje wpływ wyciszenia ekspresji białka SRF co spowodowało znaczne zmniejszenie złożoności drzewa dendrytycznego. Uważam, że rozdział ten powinien się znaleźć bezpośrednio za rozdziałem opisującym wpływ wyciszenia SRF na morfologię kolców dendrytycznych, gdzie wyraźnie brakowało tych danych.

Dalsza część pracy dotyczy koaktywatorów MKL1 i MKL2 w sekwencji których opisano tzw. single nucleotide polymorphisms (SNPs), czyli zmiany sekwencji DNA, których występowanie koreluje z takimi chorobami jak schizofrenia czy spektrum autyzmu (ASD). Niektóre z nich mogą wpływać na zmianę sekwencji aminokwasowej a co za tym idzie struktury i funkcji białka. Autorka pracy przedstawia wybrane warianty na Rycinie 19, nie opisuje jednak w jaki sposób zostały one wyselekcjonowane. W podpisie pod tą ryciną warianty oznaczone są jako „miejsca mutacji" co jest nieprawidłowym użyciem nomenklatury. Dalsze badania wpływu wybranych SNP wykazały ze warianty w MKL1 miały zmniejszoną aktywność transktywacyjną w teście lucyferazy a dla MKL2 zmianę zaobserwowano jedynie dla wariantu C647R. W neuronach, nadprodukcja wariantów odpowiadających badanym polimorfizmom w genach MKL1 i MKL2 wiązała się zarówno ze spadkiem jak i wzrostem złożoności drzewa dendrytycznego. Uzyskane wyniki dla jasności przedstawiono w tabeli.

Ostatnia część wyników dotyczy wpływu czynnika transkrypcyjnego SRF na dojrzewanie drzewa dendrytycznego ludzkich neuronów uzyskanych w wyniku różnicowania komórek iPSC (indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste). Co ciekawe uzyskane wyniki wskazują, że wyciszenie SRF prowadzi do zwiększenia złożoności drzewa dendrytycznego i powstawanie dodatkowych krótkich odgałęzień dendrytów. Potwierdza to

częściowo wyniki doświadczeń uzyskanych na mysich hodowlach komórek hipokampalnych. Bardzo ciekawy wydaje mi się model wspólnej hodowli komórek ludzkich i szczurzych. Czy uzyskane neurony ludzkie w czasie hodowli wykształciły kolce dendrytyczne i być może połączenia synaptyczne? A jeśli tak czy można przeprowadzić analizę ich kształtu?
Opisane w tej części pracy doświadczenia są zaplanowane przeprowadzone w sposób wzorowy z odpowiednią ilością kontroli różnicowania komórek iPS.

Dyskusja, która liczy 11 stron jest sprawnie napisana i świadczy o dojrzałości naukowej Autorki. Analiza i dyskusja uzyskanych wyników dowodzą, że Doktorantka potrafi nie tylko właściwie zaplanować eksperymenty i zastosować odpowiednie techniki do ich wykonania, ale także prawidłowo zinterpretować dane eksperymentalne, porównać z wynikami uzyskanymi przez innych oraz zaproponować prawdopodobny mechanizm badanych zjawisk. Dyskusję uważam za wyczerpującą.

Przedłożona mi do oceny **rozprawa doktorska** mgr inż. Leny Majchrowicz **prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.** Uzyskane przez Autorkę pracy wyniki są oryginalne i wskazują na ważną rolę czynnika transkrypcyjnego SRF oraz jego koaktywatorów MKL1 i MKL2 w rozwoju i organizacji drzewa dendrytycznego oraz kolców dendrytycznych. W związku z tym w mojej ocenie **przedstawiona rozprawa doktorska spełnia kryterium oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.** Ponadto na podstawie zaprezentowanych w rozprawie wyników badań mogę stwierdzić, że **Doktorantka wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.**

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca doktorska mgr inż. Leny Majchrowicz spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Leny Majchrowicz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora i popieram wniosek o nadanie jej stopnia naukowego doktora.

dr hab. Magdalena Dziembowska, prof. ucz

Magdalena Dziembowska

Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego