

Zielona Góra, 14 grudnia 2023

dr hab. *prof. UZ* Beata Machnicka
Katedra Biotechnologii
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Zielonogórski

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgra Michała Zalasa

pt.: „Ocena fenotypowa myszy niosących mutację punktową genu alfa-II spektryny jako modelu zwierzęcego dla zespołu ataktycznych spektrynopatii neuronalnych”

**wykonanej w Laboratorium Immunologii Nowotworów
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu
pod kierunkiem prof. dra hab. Arkadiusza Miążka**

1. OCENA MERYTORTCZNA PRACY

A. Temat pracy, trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi wartościowe wyniki o charakterze podstawowym stanowiącym obiecujący potencjał aplikacyjny. Przedstawione wyniki uzyskano dzięki kontynuowaniu badań zespoł naukowego promotora pracy prof. dra hab. Arkadiusza Miążka w dziedzinie badania funkcji spektryny w modelu zwierzęcym. Badania te wpisują się w wieloletnie poszukiwania w świecie nauki odpowiednich modeli badawczych do analizy mechanizmów odpowiedzialnych za neuropatie spektrynozależne i może przyczynić się do testowania nowych terapii tych schorzeń.

Spektryny jako wielofunkcyjne białka podbłonowe zaangażowane są w regulację morfologii i właściwości mechanicznych komórek, stanowią również strukturalną platformę do stabilizacji i aktywacji mikrodomen błonowych. Białka te biorą udział w cyklu komórkowym i naprawie DNA, kontrolują aktywację białek transbłonowych, oddziałują z białkami uczestniczącymi w ruchu wewnątrzkomórkowym oraz wraz z aktywną uczestniczą w adhezji i rozprzestrzenianiu się komórek. Opisane w literaturze spektrynopatie mogą być związane z poważnymi chorobami neurodegeneracyjnymi takimi jak ataksja mózdkowa typu 1, ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 5, wczesnodziecięca encefalopatia padaczkowa typu 5 czy syndrom Westa oraz poważnymi zaburzeniami serca, takimi jak wrodzone zaburzenia rytmu, niewydolność serca i prawdopodobnie nagła śmierć sercowa. W ogromnej większości przypadków spektrynopatie pozostają odporne na zastosowane leczenie farmakologiczne.

Założeniem prezentowanej rozprawy stało się stwierdzenie, że patomechanizmy związane z mutacjami spektryn leżące u podstaw spazmów niemowlęcych są wciąż słabo poznane ze względu na brak odpowiednich zwierzęcych modeli badawczych. Złożoność objawów spektrynopatii, poważny stan kliniczny pacjentów a szczególnie często krótki czas życia wynoszący poniżej jednego miesiąca stanowi istotną

trudność kompleksowego badania roli spektryn w ich patogenezie Z tego względu niezwykle potrzebne jest poszukiwanie nowych modeli badawczych pozwalających na dogłębne poznanie funkcji spektryn, znaczenie ich braku w organizmach i w konsekwencji skuteczniejsze leczenie spektrynopatii co stanowi niezwykle aktualne zadanie dla badań biomedycznych.

Rozprawa doktorska mgr Michała Zalasa jest przykładem prac zespołu prof. dra hab. Arkadiusza Miążka zajmującego się analizą modelu zmutowanej myszy, który może pretendować do badania funkcji spektryny w warunkach prawidłowego funkcjonowania i danej patologii, co w konsekwencji pozwoli na poznanie mechanizmów uszkodzenia tego białka i może sugerować rozwój metod skutecznej terapii. Wyprowadzony model badawczy zmutowanych myszy Spna2 R1098Q został wcześniej szczegółowo scharakteryzowany pod kątem obecnej mutacji punktowej w genie kodującym izoformę α II spektryny w pozycji Sptan1 c.3293G>A:p.R1098Q co skutkuje obniżeniem powinowactwa spektryny do kalmoduliny oraz znacząco wzmacnia wrażliwość tego białka na proteolizę kalpainową. Myszy posiadające tę mutację charakteryzowały się niestabilnym chodem, co już na wstępie badań pretendowało je jako potencjalny model do badań nad ataksją z drżeniem.

Wykorzystując model myszy Spna2 R1098Q Doktorant, jak można wnioskować z tytułu przedstawionej rozprawy doktorskiej, postawił sobie jako główny cel pracy opis fenotypowy myszy posiadającej mutację punktową genu α -II spektryny jako modelu dla wielu spektrynozależnych ataksji mózdkowych.

Cele te zamierzał osiągnąć poprzez szereg szczegółowych analiz jakimi były:

1. analiza morfotyczna myszy
2. ocena behawioralno-pamięciowa
3. ocena częstotliwości występowania i czasu trwania napadów padaczkowych
4. analiza morfologii krwi myszy oraz odpowiedzi immunologicznej myszy na immunizację owoalbuminą
5. analiza poziomu wydzielania niektórych czynników proangiogennych i cyklu komórkowego fibroblastów płodowych zmutowanych myszy.

B. Uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki i praktyki

W pierwszej części badań, Doktorant dokładnie przeanalizował cechy morfometryczne heterozygotycznych myszy Spna2R1098Q w różnym wieku, badając ich masę, długość (całkowitą, tułowia i ogona) oraz wagę i masę śledziony i porównywał je do myszy typu dzikiego nieniosących mutacji w genie kodującym α -II spektrynę.

Następnie Doktorant przeprowadza szereg testów behawioralnych sprawności motorycznej i siły mięśniowej populacji myszy z mutacją Spna2R1098Q. W tej części badań, mimo przeprowadzenia wielu wartościowych testów (Testu obracającego się wałka, testu koordynacji chodu na siatce z równoległych prętów, testu analizy chodu, testu siły mięśniowej „wire-hang”) i zaobserwowania wielu odchyień od kontroli brak jest szczegółowych wniosków. Autor tę część badań podsumowuje ogólnym stwierdzeniem, że fenotyp zmutowanych myszy dobrze odwzorowuje spektrum kliniczne zaburzeń motorycznych, pamięciowych oraz rozwojowych występujących u pacjentów z dominującymi mutacjami w genie kodującym α -II spektrynę.

W toku dalszych badań Doktorant identyfikował anomalia morfologiczne krwi i sprawdzał, czy wpływają na funkcję układu odporności wrodzonej (mierzonej skutecznością fagocytozy bakterii) i nabytej

(mierzoną swoistą odpowiedzią humoralną i komórkową wobec immunizacji owoalbuminą). Przeprowadzone testy doprowadziły go do wniosku, że odstępstwa w zmniejszonej ilości leukocytów i limfocytów jak i wielkości śledziony nie mają znaczącego wpływu zarówno na układ odporności wrodzonej jak i nabytej.

W kolejnej części prezentowanych wyników Doktorant analizując poziom sekrecji czynników proangiogennych między innymi takich jak: amfireduliny, cyr61, fraktaliny, proliferyny, osteopontyny, serpiny E1 i czynnika płytkowego 4 i cyklu komórkowego fibroblastów płodowych zmutowanych myszy stwierdza, że wykazane zmiany poziomu wydzielania tych czynników przez pierwotne fibroblasty płodowe myszy mogą być związane z występującymi w rozwoju zarodkowym homozygotycznych myszy Spna2R1098Q krwotoków śródczaszkowych. Ten fenotyp Autor wiąże również z obserwowanymi przez niego zmianami w cyklu komórkowym w fazie Go/G₁ i w fazie G₂/M.

Podsumowując wyniki przedstawione w swojej dysertacji Autor wysuwa 3 wnioski:

1. fenotyp myszy Spna2R1098Q dobrze odwzorowuje spektrum kliniczne zaburzeń motorycznych, pamięciowych oraz rozwojowych występujących u pacjentów z dominującymi mutacjami genu α -II spektryny (*SPTAN1*).
2. Zidentyfikowana anomalia wielkości śledziony oraz ubytek liczby leukocytów i limfocytów we krwi obwodowej myszy Spna2R1098Q nie wpływa znacząco na funkcję układu odporności wrodzonej (mierzonej skutecznością fagocytozy bakterii) i nabytej (mierzoną swoistą odpowiedzią humoralną i komórkową wobec immunizacji owoalbuminą).
3. Wykazane zmiany w poziomie wydzielania niektórych czynników proangiogennych przez pierwotne fibroblasty płodowe Spna2R1098Q oraz częściowy blok cyklu komórkowego w fazie Go/G₁ i obniżenia odsetka komórek w fazie G₂/M stanowią ważne przesłanki do interpretacji obserwowanych w rozwoju zarodkowym homozygot myszy Spna2R1098Q krwotoków śródczaszkowych.

C. Poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Dysertacja ma układ typowy i liczy 149 stron. Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym i przy użyciu fachowej terminologii z dziedziny. Edycja pracy jest prawidłowa. Niestety w pracy występują liczne błędy stylistycznie, interpunkcyjne oraz literowe, pomyłki w podpisach rycin czy zapożyczenia z żargonu laboratoryjnego. Dodatkowo, czytanie pracy utrudnia jej układ, w którym brak jest jasno przedstawionej na wstępie hipotezy oraz celu/-ów.

2. OCENA METODOLOGICZNA PRACY

A. Dobór literatury, umiejętność wykorzystania źródeł

W swojej dysertacji Doktorant zacytował 119 publikacji, powołując się 3- krotnie na wyniki zespołu, w którym pracował. Cytowane prace dobrane są prawidłowo i przedstawiają najnowsze odkrycia w większości z ostatnich 10-15 lat z zakresu prezentowanego tematu.

B. Poprawność formułowania problemów i hipotez

W pracy brak jest na wstępie jasno sformułowanych hipotez badawczych oraz celu pracy. Sformułowanie głównego założenia pracy pojawia się w części dyskusyjnej pracy co bardzo utrudnia czytanie i recenzję dysertacji. Dopiero na 126 stronie swojej rozprawy Autor stwierdza, że „głównym założeniem pracy doktorskiej były opis i ocena fenotypowa myszy noszących mutacje genu spektryny nieerytrocytarnej (Spna2R1098Q) jako zwierzęcego modelu badawczego dla zespołu spektynozależnych ataksji mózdkowych

(spektrynopatii neuronalnych) diagnozowanych u pacjentów jako zespół West'a, wczesne niemowlęce encefalopatie padaczkowe, ciężkie rozwojowe encefalopatie padaczkowe, spazmy niemowlęce, dziedziczne neuropatie ruchowe, dziedziczne paraplegie spastyczne lub dziedziczne ataksje, a w przypadku wystąpienia mikrodelecji obejmującej gen α -II spektryny rozpoznano dodatkowo występowanie zespołu Ohtahara'y i wczesnej encefalopatii mioklonicznej”. Ze względu na stylistykę językową tej hipotezy trudno ją jasno zinterpretować.

W wyniku przeprowadzonych licznych badań Doktorant sformułował 3 ogólne wnioski, które przedstawił na końcu dysertacji. W związku z brakiem jasno postawionego celu pracy, trudno jednoznacznie ocenić czy są to właściwe odpowiedzi.

C. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania

Modelem użytym w badaniach były myszy oznaczone jako Spna2R1098Q, które powstały w wyniku spontanicznej mutacji punktowej myszy klonu C57BL/6J skutkującej zmianą sensu genu Spna2 (mysiego ortologu ludzkiego genu *SPTAN1*, kodującego α II spektrynę). Zmiana ta prowadzi do tranzycji guaniny na adeninę w pozycji 3293 w sekwencji nukleotydowej, co skutkuje zamianą wysoce konserwatywnej reszty argininowej na glutaminową w pozycji 1098 sekwencji reszt aminokwasowych 10 tego powtórzenia spektrynowego α II spektryny. To powtórzenie spektrynowe zawiera miejsca cięcia dla kalpajny oraz kaspaz oraz miejsce wiązania kalmomoduliny. Myszy posiadające tę mutację charakteryzowały się niestabilnym chodem, co na wstępie badań pretendowało je jako potencjalny model do badań nad ataksją z drżeniem.

Istotnym elementem doświadczeń na tym etapie badań był właściwy dobór testów dostosowany do analizowanego problemu. Tu na szczególną uwagę zasługują prowadzone przez Doktoranta badania behawioralno- pamięciowe jakimi były testy sprawności motorycznej i siły mięśniowej, chodu zwierząt oraz rozpoznawania nowych obiektów i ich lokalizacji. Testy zostały przeprowadzone całościowo, zakończone odpowiednią analizą statystyczną i dobrze zilustrowane graficznie.

Autor dysertacji przedstawił również swoje badania z zakresu biologii komórki czy testów immunizacji myszy. Poziom ekspresji badanych białek określał techniką Western blotting po rozdziale elektroforetycznym. Autor na stronie 115 dysertacji rycinę 26 podpisuje również jako Western blotting mimo, że technika ta w istocie jest testem immunoenzymatycznym na macierzach przeciwciał. Opisując tę technikę w rozdziale Materiały i metody Autor wspomina również o rozdziale białek z medium hodowlanego w żelu poliakrylamidowym a następnie barwienie ich srebrem. Nie znalazłam jednak w prezentowanej pracy wyników tego doświadczenia. Ocenę wpływu mutacji na cykl komórkowy wykonał wykorzystując cytometrię przepływową. W testach oceny odpowiedzi immunologicznej na immunizację myszy owoalbuminą zbadał komórkowość śledzion testem ELISPOT (brak dokładnej procedury) oraz odpowiedź humoralną i komórkową

(techniką ELISA). Przedstawione metody zostały dobrane prawidłowo i stanowią standardowe, nowoczesne techniki stosowane w tego typu analizach.

Przeprowadzone badania były wykonywane za zgodą Komisji Bioetycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu nr 78/2018 i 70/2021.

D. Prawidłowość układu pracy i struktury podziału treści

Układ rozprawy doktorskiej Pana Michała Zalasa jest zgodny z normami przyjętymi do tego typu opracowań.

Recenzowana rozprawa składa się z kilku rozdziałów: Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wprowadzenia, Materiałów i Metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków oraz Spisu rycin i tabel i Literatury. Brak jest w rozprawie jasnej hipotezy oraz przedstawienia celu głównego i celów szczegółowych badań.

Rozdział zawierający wprowadzenie jest bardzo obszerny (46 stron). Trudność w czytaniu sprawia jednak fakt, że nie zawiera on żadnej ilustracji przedstawianych zagadnień w formie rycin lub tabel. Rozdział przedstawiający wyniki jest dobrze przygotowany, zawierają właściwie przygotowaną do tego typu wyników dokumentację graficzną i tabelaryczną. Zdarzają się jednak błędy w podpisach rycin lub zbyt niejasne wprowadzenia w przedstawienie wyników np. w analizie białka GFAP (strona 92). Kończącym, bardzo interesującym rozdziałem rozprawy jest Dyskusja, którą Autor przedstawił w bardzo syntetyczny i merytoryczny sposób, zestawiając otrzymane wyniki z najnowszymi doniesieniami naukowymi w dziedzinie. Ten bardzo dobrze przygotowany rozdział stanowi doskonałą bazę do poszerzenia wniosków głównych o szczegółowe wnioski końcowe.

Ponadto, Autor nie umieścił w swojej rozprawie kopii Uchwał Komisji Bioetycznej Komisji Bioetycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu nr 78/2018 i 70/2021 wyrażającej zgodę na prowadzenie badań.

Dane uzyskane w toku realizacji projektu doktorskiego zostały wcześniej częściowo opublikowane w dwóch pracach doświadczalnych (w 2021 i 2023 roku). Obie prace zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR o wysokim współczynniku wpływu IF oraz dużej liści punktów MNiSW. Pierwsza praca doświadczalna opublikowana została w 2021 roku w czasopiśmie *Scientific Reports* (IF – 4,6; 140 pkt MNiSW) w której mgr Michał Zalas jest drugim autorem a kolejna w 2023 roku w *Brain Sciences* (IF – 3,33 i 100 pkt MNiSW). W tej pracy Doktorant jest pierwszym autorem. Według informacji zawartych w publikacjach Doktorant był w nich odpowiedzialny odpowiednio, w pierwszej: za testy koordynacji oraz wyniki Western blot, a w drugiej za metodologię, walidację, przeprowadzenie analiz, wizualizację oraz napisanie manuskryptu.

E. Uwagi i propozycje

Pracę doktorską mgra Michała Zalasa uważam za bardzo dobrą i interesującą. Przedstawiony cykl badań jest dobrze zaplanowanym zadaniem badawczym pozwalającym na ocenę fenotypową myszy Spna2R1098Q jako modelu dobrze odwzorowującego spektrum kliniczne zaburzeń motorycznych, pamięciowych oraz rozwojowych występujących u pacjentów z dominującymi mutacjami genu α -II spektryny (*SPTAN1*).

Doktorant przygotowując swoją dysertację nie ustrzegł się jednak błędów i nieścisłości.

1. Podstawową uwagą do przedstawionej rozprawy doktorskiej jest brak jasno sprecyzowanej hipotezy badawczej oraz celu/ów badań. Bardzo proszę Doktoranta o jasne ich przedstawienie w czasie swojej prezentacji podczas obrony pracy doktorskiej.
2. Z przedstawionych wyników, bardzo ciekawie przedyskutowanych w ostatnim rozdziale rozprawy można wysnuć szereg wniosków szczegółowych. Bardzo proszę o przedstawienie ich również podczas obrony pracy doktorskiej.
3. Proszę Autora o korektę i uzupełnienie podpisów pod ryciną 5, 6, 15, oraz 26.
4. Metody badawcze użyte w rozprawie doktorskiej zostały opisane w rozdziale Materiały i metody. Brak jest jednak wyników dotyczących rozdziału białek z medium hodowlanego w żelu poliakrylamidowym a następnie barwienie ich srebrem. Proszę o wyjaśnienie lub przedstawienie tego wyniku.

Ponadto, po lekturze przedstawionej dysertacji pojawiło się zagadnienie, które chciałabym poddać dyskusji w trakcie wystąpienia:

Autor twierdzi we wniosku końcowym, że „wykazane zmiany w poziome wydzielania niektórych czynników proangiogennych przez pierwotne fibroblasty płodowe Spna2R1098Q oraz częściowy blok cyklu komórkowego w fazie G_0/G_1 i obniżenie odsetka komórek w fazie G_2/M stanowią ważne przesłanki do interpretacji obserwowanych w rozwoju zarodkowym homozygot myszy Spna2R1098Q krwotoków śródczaszkowych”. Bardzo proszę o taką interpretację, bo niestety nie znalazłam jej w części dyskusyjnej rozprawy.

Analizując wyniki badań Doktoranta, ich zakres jak również znaczenie dla badań podstawowych nad funkcją spektryn oraz terapią spektrynopatii neuronalnych, stwierdzam że praca doktorska pod tytułem „Ocena fenotypowa myszy niosących mutację punktową genu *alfa-II spektryny* jako modelu zwierzęcego dla zespołu ataktycznych spektrynopatii neuronalnych” Pana mgra Michała Zalasa spełnia warunki określone w ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce - (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 z późn. zm.).

W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgra Michała Zalasa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik Katedry Biotechnologii
Instytutu Nauk Biologicznych

dr hab. Beata Machnicka, prof. UZ