

Prof. dr hab. Jacek Jaworski  
Pracownia Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej  
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej  
Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa

Warszawa, 12 maja 2019 r.

## **Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Zygmun, pt. „Wpływ leków psychotropowych na ekspresję alternatywnych transkryptów w mózgu”.**

### **Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani magistr Magdaleny Zygmun opisuje wyniki badań, których bezpośrednim celem było opisanie zmian ekspresji genów w jądrze pólleżącym przegrody oraz w korze przedczołowej w odpowiedzi na podanie 6 różnych leków psychotropowych (haloperidol, rysperydon, mianseryna, wenlafaksyna, metamfetamina i ketamina). Natomiast celami długofalowymi niniejszej rozprawy były, z jednej strony określenie poziomu ekspresji dotychczas słabo przebadanych form transkryptów, które nie kodują białek, oraz stworzenie nowej klasyfikacji leków psychotropowych w oparciu o sygnatury odpowiedzi na ich podanie na poziomie molekularnym. W swoich badaniach, Doktorantka wykorzystwała sekwencjonowanie nowej generacji jak i zestawy danych uzyskanych przez innych badaczy. W efekcie przeprowadzonych badań i analiz, Doktorantka, doszła do wniosku, iż obserwowane profile ekspresji genów można podzielić na 4 podstawowe grupy a poszczególne leki mają na nie częściowo odmienny wpływ. Ciekawą i oryginalną obserwacją było to, iż w odpowiedzi na badane leki, zwiększa się liczba transkryptów kodujących białka, zaś znacznemu obniżeniu ulega liczba transkryptów niekodujących, w tym przede wszystkim przetworzonych transkryptów. Przedstawione wyniki nie dostarczają ostatecznej odpowiedzi na temat jaka powinna być właściwa klasyfikacja leków psychotropowych w oparciu o dane uzyskane z profilowania genów. Jednak stanowią bardzo obszerny opis zmian ekspresji genów w wybranych strukturach mózgu pod wpływem sześciu badanych leków. Pozwalają stwierdzić, że pomimo tego, iż dane leki są stosowane w podobnych stanach chorobowych ich wpływ na ekspresję genów w mózgu jest różny. Wskazują również, ekspresja, których genów nie będzie stanowiła dobrego dyskriminatora w tworzeniu nowej klasyfikacji leków psychotropowych.

### **Formalny opis rozprawy**

Rozprawa licząca 129 stron maszynopisu ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozprawę rozpoczynają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz liczący 20 stron Wstęp, zawierający 8 głównych podrozdziałów, które wprowadzają czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. Po Wstępie, Doktorantka zamieściła cel główny oraz cele szczegółowe rozprawy a następnie opis materiałów i metod, podzielony na 7 głównych podrozdziałów (14 stron). Wyniki, liczące 25 stron podzielone zostały na 9 podrozdziałów, które można pogrupować w 3 główne części tematyczne dotyczące: opisu wyników eksperymentów RNAseq oraz analiz bioinformatycznych, potwierdzenia obserwowanych zmian przy użyciu alternatywnego podejścia eksperymentalnego (analiza ekspresji wybranych genów) oraz szczegółowego opisu zmian poziomu ekspresji nowo zidentyfikowanej izoforymy Dcl1 – Dcl1-m. Następująca po tym rozdziale osiemnastostronicowa Dyskusja omawia wybrane najważniejsze problemy naukowe rozprawy. Praca doktorska pani mgr Zygmun

kończy się syntetycznym podsumowaniem i wnioskami, wykazem wybranych skrótów, spisem rycin, piśmiennictwem i zestawem tabel uzupełniających.

## Ocena merytoryczna

**Wstęp** ocenianej rozprawy jest syntetyczny i omówione w nim zostały wszystkie zagadnienia konieczne dla zrozumienia celów rozprawy jak i uzyskanych wyników. Pierwszy podrozdział Wstępu dotyczy metod klasyfikacji leków psychotropowych. Kolejne części skupiają się na zagadnieniu regulacji ekspresji genów, zarówno na poziomie ogólnym jak i w kontekście układu nerwowego. Następnie, Doktorantka omówiła dość skrótowo jak metody sekwencjonowania genów pozwalają analizować sieci współregulowanych genów. Koniec Wstępu stanowi powrót do zagadnienia klasyfikacji leków psychotropowych ze szczególnym uwzględnieniem ich molekularnej klasyfikacji i uzasadnienia konieczności jej opracowania. W mojej ocenie lektura Wstępu dobrze wprowadza w zagadnienia opisywane w dalszych częściach doktoratu i nie mam poważniejszych uwag. Jednakże, chciałbym zwrócić uwagę Doktorantki, iż Kandel, Carlsson i Greengard formalnie otrzymali Nagrodę Nobla nie, jak napisała, za badania nad fizjologicznymi podstawami mechanizmów pamięci ale za odkrycia dotyczące transdukcji sygnału w układzie nerwowym. Moją uwagę zwróciło też stwierdzenie w podrozdziale 6 Wstępu (str. 24), że mechanizm działania miRNA w kolcach dendrytycznych polega na modulacji fosforylacji białek. Przyznam, iż jest to dla mnie dość duża nowość, pomimo wieloletniej pracy nad regulacją translacji w dendrytach, mechanizmami regulacji plastyczności strukturalnej oraz pewniej wiedzy na temat działania mikroRNA. Będę wdzięczny za wyjaśnienia w trakcie obrony rozprawy.

**Cele rozprawy.** Jako główny cel pracy Doktorantka postawiła sobie „określenie alternatywnych wariantów genów, niekodujących RNA, oraz mechanizmów regulatorowych, których aktywacja jest powiązana z farmakologicznymi właściwościami leków psychotropowych”. Dodatkowo sformułowane zostały 3 cele szczegółowe dobrze odzwierciedlające kierunki badań podjętych w dalszej części rozprawy. Z obowiązku recenzenta, zwrócę uwagę, na dość niefortunne sformułowanie celu nr 3, czyli potwierdzenie istnienia wcześniej nieznanymi wariantów. Jeśli coś wcześniej nie było znane, to w mojej ocenie trzeba to najpierw odkryć a dopiero później potwierdzić.

**Materialy i Metody.** Wszystkie metody niezbędne do realizacji założonych celów zostały w mojej ocenie opisane w sposób dokładny i zrozumiały osób dysponujących odpowiednim doświadczeniem i umiejętnościami. Na szczególne podkreślenie oraz pochwałę zasługuje interesujące podejście do analizy danych w oparciu o porównanie danych uzyskanych z przez Doktorantkę z danymi sekwencjonowania z pojedynczych komórek nerwowych. Warto też podkreślić, iż w swojej rozprawie doktorantka wykorzystwała nowoczesne metody badania ekspresji genów, w tym sekwencjonowanie nowej generacji pozwalające na uzyskanie dużo szerszego obrazu zmian ekspresji genów niż wciąż jeszcze stosowane mikromacierze.

**Wyniki.** Pierwsza, część rozdziału Wyniki opisuje porównanie wpływu podania poszczególnych leków na profile ekspresji genów uzyskane przy użyciu sekwencjonowania nowej generacji oraz analizy bioinformatyczne. Doktorantka, w pierwszej kolejności, określiła proporcje poszczególnych klas transkryptów ulegających zmianie pod wpływem leków w porównaniu do zwierząt naiwnych. Analiza ta, pozwoliła stwierdzić, iż główne grupy zmieniających się transkryptów stanowią transkrypty kodujące białka oraz tzw. transkrypty przetworzone (odpowiednio wzrost i spadek). Dodatkowo, Doktorantka zbadała odsetek genów, których ekspresja była regulowana lekami, pod kątem występowania

alternatywnych izoform, jak również alternatywnych miejsc startu transkrypcji i końca transkryptu. Kolejne analizy uzyskanych danych pozwoliły wykazać, iż transkrypty o zmiennych profilach ekspresji można pogrupować w 4 zasadnicze grupy, którym możliwe było przypisanie czynników transkrypcyjnych, najprawdopodobniej odpowiedzialnych za obserwowane zmiany (np. w przypadku grupy 1, receptor glukokortykoidów oraz ZMIZ1). Dzięki temu grupowaniu, możliwe było stwierdzenie, iż poszczególne leki w różnym stopniu wpływają na poszczególne grupy transkryptów (np. w przypadku grupy 2 i kory przedczołowej silny efekt miał haloperidol zaś w korze przedczołowej metamfetamina). Kolejnym etapem analiz była próba określenia, jaki typ komórek odpowiada za zmiany ekspresji poszczególnych grup transkryptów w odpowiedzi na leki. W tym celu, Doktorantka porównała uzyskane przez siebie dane z wynikami sekwencjonowania pojedynczych komórek kory wzrokowej, opublikowane wcześniej przez Tasic i wsp (2016). Jest to bardzo ciekawy zabieg, stosowany coraz częściej w przypadku, kiedy nie dysponujemy sami możliwością wykonania tzw. „single-cell sequencing”. W efekcie, Doktorantka stwierdziła, iż transkrypty przynależące do grupy 1 najprawdopodobniej były regulowane w komórkach glejowych, podczas gdy grupy 2 w neuronach pobudzających. Mam jednak pytanie do Doktorantki, na ile na jej wyniki może mieć wpływ fakt, iż dane sekwencjonowania pojedynczych komórek dotyczyły kory wzrokowej. Szczególnie, porównanie z komórkami jądra półleżącego wydają mi się narażone na problemy interpretacyjne związane z inną lokalizacją w mózgu. Poniekąd, własne wyniki Doktorantki wskazują, iż odpowiedź komórek w korze różni się od efektów profilowania jądra półleżącego przegrody.

W pozostałych częściach Wyników Doktorantka skupiła się na potwierdzeniu zmian ekspresji wybranych genów przy pomocy metody RT-PCR i analizie ekspresji alternatywnych wariantów tych genów. Krótko można podsumować, iż w dużej mierze przeprowadzone eksperymenty potwierdziły wyniki sekwencjonowania. Natomiast dużo uwagi Doktorantka poświęciła genowi *Dclk1*. Badania te wykazały, iż leki różnicowo indukują ekspresję poszczególnych izoform *Dclk-1*. Ponadto, Doktorantka odkryła nową izoformę *Dclk-1* – *Dclk1-m*. Transkrypt ten był wykrywany sondami 3 i 4, które nie powinny były wykrywać innych transkryptów. Dlatego nie jest dla mnie jasne, dlaczego wyniki uzyskane dla tych sond (np. porównanie NAc, siła efektów MIA i RISP, Ryc. 23) są różne (podobnie Ryc. 24). Ostatni podrozdział Wyników zatytułowano „Potencjalne funkcje nowo wykrytego wariantu *Dclk1*”. Niestety w mojej ocenie tytuł jest nieadekwatny do zawartości. W opisywanych badaniach podjęto próbę stwierdzenia, czy *Dclk1-m* koduje produkt białkowy, która zresztą nie doprowadziła do ostatecznej konkluzji. W tym kontekście zastanawia mnie dlaczego analizowano lizaty białkowe z prądkowa po podaniu mianseryny chociaż, wyniki przedstawione na rycinie 23 sugerują, iż dużo wyższą zmianę w poziomie transkryptu obserwowano w przypadku podania tego leku w korze przedczołowej?

Jednak pomimo moich uwag krytycznych, badania opisane w podrozdziale Wyniki dostarczają wielu istotnych i ciekawych informacji w kontekście rozumienia molekularnych efektów działania leków psychotropowych.

**Dyskusja.** Dyskusja przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej pani mgr Zygmunt pokazuje, iż Doktorantka posiada dużą wiedzę i zdolność trafnego podsumowania uzyskanych wyników na tle istniejącej wiedzy. Posiada też, sporą dozę krytycyzmu, pozwalająca jej określić ograniczenia uzyskanych przez nią wyników do stworzenia nowego rodzaju klasyfikacji leków psychotropowych. Natomiast chciałbym się odnieść do dwóch drobnych kwestii poruszonych w Dyskusji. W pierwszym akapicie tego rozdziału (str. 71) Doktorantka podjęła próbę odpowiedzi na pytanie czy efekty podania leków myszom będą

użyteczne w kontekście ludzi. Muszę stwierdzić, że następnie Doktorantka udziela odpowiedzi na zupełnie inne pytanie tzn. dlaczego mysz jest wygodnym modelem eksperymentalnym. Z kolei, na stronie 87 Doktorantka stwierdza, iż jej zdaniem badania ekspresji izoform *Delc1* nie powinny być prowadzone w modelach *in vitro*. Myślę, że ze względu na ograniczoną dostępną wiedzę jest to wniosek dość pochozny. Fakt, iż w dwóch czy trzech badaniach nie uwzględniających różnego typu komórek nerwowych w hodowli z pełnym profilowaniem przez okres około 4 tygodni nie można tego stwierdzić. Co więcej, argumenty zawarte przez Doktorantkę na temat nieadekwatności badania komórek nerwowych *in vitro*, oparte są błędnym założeniu, iż komórki pobrane z embrionalnego mózgu nie są w stanie dojrzeć w hodowli *in vitro*. W tym kontekście, chciałbym zwrócić Doktorantce uwagę na bardzo ważną pracę Dąbrowskiego i wsp. (2003) wskazującą, iż profile ekspresji genów neuronów hipokampa dojrzewających w hodowli *in vitro* można bardzo dobrze odnieść, wręcz z dokładnością co do dnia, do profili ekspresji genów w mózgu dojrzewającym postnatalnie. A zatem fakt, iż komórki zostały wyizolowane przed urodzeniem nie oznacza, iż nie nadają się one do studiowania biologii molekularnej, komórkowej i fizjologii dojrzałych komórek nerwowych.

### Ocena edytorskiej strony rozprawy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest przygotowana w przeważającej części starannie i Doktorance udało się uniknąć większej liczby błędów edytorskich. Jednak, pomimo tego, iż zwykle nie komentuję potknięć edytorskich nie mogę przejść do porządku dziennego nad pierwszymi dwoma stronami Dyskusji. Tu w mojej ocenie Doktorantka nie dołożyła należytej staranności gdyż liczba błędów edytorskich jest zatrważająca. Druga uwaga krytyczna jest taka, iż w wielu miejscach rozprawy nie podano rozwinięć stosowanych skrótów (np. nazw czynników transkrypcyjnych). Często ich wyjaśnienie, nie znajduje się też w wykazie skrótów zawartym na końcu rozprawy.

### Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Magdaleny Zygmut spełnia wymagania określone odpowiednimi przepisami. Wyniki zostały uzyskane za pomocą adekwatnych metod i przyczyniły się do poszerzenia naszej wiedzy na temat wpływu leków psychotropowych o różnym mechanizmie działania na ekspresję genów w mózgu, co stanowi istotny wstęp dla lepszej klasyfikacji tych leków i ich skuteczniejszego stosowania. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Instytut Farmakologii PAN o dopuszczenie pani mgr Magdaleny Zygmut do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Jacek Jaworski