

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

Warszawa, 13 czerwca 2022 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Anny Lech, pt. „Wpływ interakcji macierzy zewnątrzkomórkowej, białek adhezyjnych i proteaz na plastyczność GABAergicznej transmisji hamującej w hipokampie”.

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Przedmiotem rozprawy pani mgr Anny Lech było, jak napisano w tytule określenie funkcji metaloproteiny MMP-3, integrzyn zawierających podjednostki $\beta 1$ i $\beta 3$ oraz interakcji białkowych neuroliginy-2 w zjawisku w plastyczności synaps GABAergicznych w hipokampie. Plastyczność synaptyczna jest zjawiskiem pozwalającym synapsom dostosować swoją siłę do zmieniającej się aktywności neuronalnej. Zjawisko to leży u podstaw tak kluczowych procesów, jak uczenie się i formowanie pamięci. Od dziesięcioleci neurobiolodzy poświęcali się rozpracowaniu fizjologicznych, komórkowych i molekularnych mechanizmów plastyczności synaps pobudzających, wykorzystujących glutaminian jako neuroprzekaźnik. Jednak ostatnia dekada w neuronauce dobitnie wskazała, że pełne zrozumienie funkcjonowania układu nerwowego i jego patologii wymaga również równie pełnego poznania mechanizmów plastyczności synaps hamujących. W efekcie wykazano, iż neurotransmisja GABAergiczna podlega, podobnie jak ta glutamatergiczna, długotrwałemu wzmocnieniu i osłabieniu. Jednocześnie zaczęto odkrywać współzależności pomiędzy plastycznością obu typów neurotransmisji. Jednak, ze względu na fakt, iż badania nad plastycznością synaps hamujących rozpoczęły się relatywnie niedawno, wciąż aspekty molekularne tego zjawiska są słabo poznane. To stanowiło motywację Doktorantki do podjęcia badań, które w mojej ocenie można zaliczyć do bardzo nowatorskich i będących w czołówce kluczowych zagadnień współczesnej neurobiologii. W efekcie pani mgr Lech, po raz pierwszy wykazała kluczową rolę MMP-3 oraz interakcji neureksyny z neuroliginą-2 w zjawisku długotrwałego wzmocnienia synaps GABAergicznych. Uzyskane wyniki mają przede wszystkim znaczenie dla poznania mechanizmów molekularnych niedawno odkrytego i słabo poznanego typu plastyczności synaptycznej. Warto jednak wspomnieć, iż zaburzenia stosunku transmisji pobudzającej i hamującej wydają się być jedną z istotnych przyczyn licznych nieprawidłowości funkcjonowania układu nerwowego i w efekcie licznych schorzeń np. padaczki, autyzmu i chorób neuropsychiatrycznych. Stąd uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki na pewno zainspirują badania w kierunku określenia zaburzeń, opisanych przez Doktorantkę, mechanizmów w wybranych patologiach układu nerwowego i ich potencjalnej terapii.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 153 strony maszynopisu ma układ raczej typowy. Rozpoczynają ją streszczenia w języku polskim i angielskim, cele pracy, wykaz skrótów oraz dość obszerny

liczący 45 strony Wstęp, zawierający 8 głównych podrozdziałów, które wprowadzają czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Po Wstępie, Doktorantka zamieściła opis materiałów i metod, podzielony na 14 głównych podrozdziałów (18 stron). Wyniki, liczące 40 stron podzielone zostały na 3 główne podrozdziały. Dwa pierwsze dotyczą odpowiednio mechanizmów molekularnych zjawisk długotrwałego wzmocnienia w synapsach GABAergicznym i depotencjacji synaps glutamatergicznych. Natomiast część trzecią stanowią szczegółowe wartości p dla wszystkich testów statystycznych zastosowanych w analizie uzyskanych wyników. Tego rozwiązania nie uważam za wygodne dla czytelnika i moim zdaniem bardziej użyteczne byłoby podanie tych danych w podpisach do rycin lub w tekście. Po Wynikach następują 6 stronicowe Podsumowanie i Dyskusja. Następnie zamieszczone zostały kolejno wykaz tabel, wykaz rycin oraz dorobek publikacyjny doktorantki. Praca doktorska pani mgr. Lech kończy się wykazem piśmiennictwa.

Ocena merytoryczna

Cele rozprawy. Jako główny cel pracy Doktorantka postawiła sobie „*określenie elementów synapsy bezpośrednio zaangażowanych w indukcję i utrzymanie długotrwałego wzmocnienia w synapsach GABAergicznym (iLTP) hipokampa*”. W ramach celu głównego sformułowane zostały trzy hipotezy badawcze dotyczące zależności iLTP od MMP-3, oddziaływania neureksyna-neurolegina-2 oraz aktywacji wybranych integrin. Dodatkowym celem było określenie udziału MMP-3 w zjawisku depotencjacji synaps pobudzających. W mojej opinii główny cel rozprawy został sformułowany nieco zbyt szeroko i dopiero szczegółowy opis, co Doktorantka miała na myśli, pozwala stwierdzić, iż doktorat będzie dotyczył roli z góry już określonych elementów synapsy, jak też powiązać konieczność równoległego badania zjawisk iLTP i depotencjacji. Natomiast hipotezy badawcze zawarte w tym rozdziale w mojej opinii sformułowane są prawidłowo, logicznie i adekwatnie do zawartości rozprawy.

Wstęp ocenianej rozprawy jest bardzo obszerny i omówione w nim zostały wszystkie zagadnienia konieczne dla zrozumienia celów rozprawy, jak i uzyskanych wyników. Pierwszy podrozdział Wstępu jest poświęcony badanej strukturze – formacji hipokampa, jej anatomii i funkcji. Druga część Wstępu opisuje pojęcie synapsy i organizację molekularną synaps glutaminianegricznym oraz GABAergicznym. Podrozdziały od 3 do 5 w sposób bardzo szczegółowy wprowadzają zagadnienia różnych rodzajów plastyczności synaptycznej. Pozostałe części skupiają się na omówieniu rodziny białek MMP, integrin i kompleksu neureksyny i neurolegin oraz ich roli w organizacji synaps, procesach plastyczności oraz uczeniu się i formowaniu pamięci. Lektura Wstępu nie pozostawia wątpliwości co do rozległej wiedzy Doktorantki. Jednak, choć czyta się go z zainteresowaniem, nie jestem przekonany, iż wszystkie podane informacje są na pewno niezbędne. Być może ograniczenie się do informacji rzeczywiście niezbędnych dla zrozumienia pracy doktorskiej uczyniłoby Wstęp bardziej syntetycznym i ułatwiło odnalezienie kluczowych faktów w trakcie analizowania wyników i lektury dyskusji. Z drugiej strony, w tym rozbudowanym Wstępie zabrakło mi klarownego podkreślenia czego tak naprawdę nie wiadomo i argumentów przemawiających za podjęciem proponowanych badań. Z drobniejszych uwag, czasem podane informacje mogłyby być bardziej konkretne, co nie zmuszałoby czytelnika do

odwoływania się do piśmiennictwa. Przykład może stanowić zdanie na str. 32: „*Co więcej, badania, z wykorzystaniem transgenicznym organizmów z upośledzonym genem kodującym kolibistynę potwierdziły.....*”. Informacja o jakie konkretnie organizmy i modyfikacje genetyczne chodzi byłaby bardzo cenna w tym miejscu. Podobny przykład można znaleźć na stronie 42 gdzie mowa o białkach GEF dla GTPaz Rap1 i Rap2. Ponieważ, większość GTPaz jest regulowana przez wiele białek GEF, podanie ich nazw ukonkretniłoby przekaz. Na stronie 54, gdzie omawiane są substraty MMP-9 w plastyczności, z pewnym zdziwieniem odnotowałem, że wymieniono tylko ICAM5 odkryty przez prof. Conant, choć prace z laboratorium prof. Leszka Kaczmarka, które niewątpliwie powinny być znane Doktorantce, wskazują na szereg innych substratów w tym β -dystroglikan, pro-BDNF czy nektynę-3, z których wszystkie wydają się mieć znaczenie w omawianym kontekście.

Materiały i Metody. Wszystkie metody niezbędne do realizacji założonych celów zostały w mojej ocenie opisane w sposób wystarczający do powtórzenia wykonanych procedur przez osoby dysponujące odpowiednim doświadczeniem i umiejętnościami. Na szczególne podkreślenie oraz pochwałę zasługują wykorzystane techniki elektrofizjologiczne, szczególnie, że te dotyczące synaps GABAergicznym są mniej rozpowszechnione i wymagają perfekcyjnego warsztatu badawczego. Oprócz technik elektrofizjologicznych Doktorantka wykorzystwała w pracy techniki mikroskopii konfokalnej i analizy obrazu do oceny zmian struktury synaps. Do tej części mam kilka uwag. Zaczę może od liczby analizowanych komórek i tego, co uznawano za N . W przypadku analizy hodowli neuronalnych z jednego szkiełka analizowano od 2 do 3 komórek a jako N traktowano pojedyncze szkiełko. Nie jest jasne, ile szkiełek pochodziło z tej samej hodowli i ile hodowli wykonano niezależnie. Nawet jeśli szkiełko traktowano jako pojedyncze powtórzenie biologiczne, co nie do końca jest przez wszystkich akceptowane, gdyż traktują oni szkiełka z tej samej hodowli, jako powtórzenia techniczne, to analiza tylko 2-3 komórek/szkiełko w moim przekonaniu niekoniecznie musi odzwierciedlać zmiany w całej, zawsze dość zróżnicowanej, populacji komórek/synaps w danym preparacie. Podobna uwaga dotyczy analizy skrawków hipokampa. Moja druga uwaga odnosić się do analizy kolokalizacji z użyciem maksymalnej projekcji w przypadku skrawków hipokampa. O ile w przypadku hodowanych neuronów, można uznać, iż synapsy są „dwuwymiarowe” o tyle w skrawkach zachowana jest struktura trójwymiarowa i spłaszczenie obrazu w osi Z może generować nieistniejącą kolokalizację, ponieważ dwa punkty mogą być położone w tej samej pozycji względem osi X-Y ale w innych względem osi Z. Dlatego, prawdopodobnie lepiej byłoby w tym wypadku analizować kolokalizację w poszczególnych sekcjach optycznych lub w całej zebranej objętości bez spłaszczenia obrazu, co umożliwia np. program Imaris. W końcu zastanawia mnie, czy intensywność fluorescencji punktów uzyskanych w efekcie wygenerowania masek oceniano na obrazach surowych czy po zastosowaniu tzw. „threshold”. W tym drugim przypadku istnieje ryzyko zniekształcenia wyników i moim zdaniem powinno się za wszelką cenę unikać takiego podejścia.

Wyniki. Pierwsza część tego rozdziału dotyczy badań nad rolą MMP-3 w zjawisku iLTP i towarzyszącym iLTP zmianom struktury synaps GABAergicznym. W efekcie pani mgr Lech

wykazała, iż zahamowanie MMP-3 ale nie MMP-9 ma negatywny wpływ na wystąpienie iLTP oraz przeciwdziała zwiększeniu wielkości synaptycznych klastrów gefirynowych w jego trakcie. Jednocześnie podanie do hodowli neuronalnych rekombinowanego MMP-3 było wystarczające, aby zwiększyć wielkość tych klastrów nawet przy braku indukcji iLTP. Konkluzje tej części są klarowne i nie budzą moich wątpliwości. Mam jednak pytanie do eksperymentu, w którym analizowano klastry gefirynowe przy wydłużonym podaniu NMDA (str. 88). Takie traktowanie miało według hipotezy Doktorantki prowadzić do zwiększonego napływu wapnia, co ewentualnie mogło przeciwdziałać jego niewystarczającemu napływowi w krótszym czasie w przypadku braku aktywności MMP-3. Czy zweryfikowano eksperymentalnie, iż istotnie dłuższe podanie NMDA zwiększa napływ wapnia a brak MMP-3 go obniża? Bez tych wyników ciężko odrzucić czy potwierdzić postawioną hipotezę. Zastanawiam się też, jak wytłumaczyć, że krótkotrwałe podanie NMDA zwiększa wielkość klastrów a nieznacznie dłuższe już nie. Co prawda, Doktorantka zauważyła to zjawisko, ale nie dyskutuje go dalej. W kolejnym podrozdziale analizowano przy użyciu metod immunofluorescencyjnych aktywację integryny z podjednostką $\beta 1$ w pierwszych minutach od indukcji iLTP i nie wykazano istotnych zmian w porównaniu z kontrolą. Na podstawie tych wyników Doktorantka wysnuła wniosek (tytuł podrozdziału str. 90), iż aktywność integryn nie jest istotna w tym czasie. W moim odczuciu jest to wniosek błędny, gdyż w tych doświadczeniach nie zablokowano aktywności integryn. Badano tylko współwystępowanie dwóch zjawisk tzn. iLTP i zmian aktywności, co nie pozwala na takie wnioskowanie. W kolejnych podrozdziałach pani mgr Lech zmieniła model badawczy z neuronów hodowanych *in vitro* na ostre skrawki hipokampalne, w których indukowano iLTP. Przyznam, że nie jest dla mnie jasny powód tej zmiany a Doktorantka nie wyjaśnia jej powodów. Wprowadza on też pewne zamieszanie, gdyż autorka początkowo zmienia przedmiot badań w tym modelu skupiając się na interakcji neureksyny z neuroliginą-2 aby następnie znowu powrócić do integryn i wykazania tym razem ich istotności dla dalszych faz iLTP. W moim przekonaniu, lepszym rozwiązaniem byłoby podzielenie opisu wyników wg. badanych mechanizmów molekularnych a nie rodzaju modelu. Niezależnie jednak od tej krytyki, wyniki dotyczące roli oddziaływań białkowych neuroliginy-2 dla iLTP i zmian strukturalnych synaps GABAergiczych są bardzo interesujące i Doktorantka bezspornie wykazała, iż neuroligina-2 jest konieczna dla tych zjawisk przynajmniej w niektórych częściach drzewek dendrytycznych neuronów piramidowych hipokampa. Mam jednak kilka uwag do sformułowań lub wniosków w tej części pracy. Np. na stronie 97, Doktorantka stwierdza na podstawie analizy synaptycznych punktów neuroliginowych, że peptyd blokujący nie ingeruje w stabilne już istniejące oddziaływania z neureksyną. Niemniej takie stwierdzenie wymaga barwień potrójnych z uwzględnieniem kolokalizacji neuroliginy-2 i neureksyny. Podobnie jak przykłady podane powyżej, zdanie to świadczy o pewnej tendencji Doktorantki do formułowania nieco zbyt stanowczych konkluzji. Podobnie jest z tytułem podrozdziału ze strony 104: „*Integryny z podjednostką $\beta 1$ ale nie $\beta 3$ są zaangażowane w zjawisko długotrwałego wzmocnienia w synapsach GABAergiczych*”, choć Doktorantka badała tylko zmiany aktywności tych integryn w trakcie iLTP. Aby stwierdzić, czy białka te rzeczywiście są zaangażowane w badane zjawisko trzeba byłoby je usunąć z układu doświadczalnego,

czego nie zrobiono. Ostatnia część Wyników dotyczy roli MMP-3 w zjawisku depotencjacji synaps glutaminianergiczných i jest dość luźno powiązana z pozostałymi wynikami. Konkluzją tej części jest stwierdzenie, iż MMP-3 nie jest szczególnie kluczowe dla tego zjawiska choć pewne różnice zaobserwowano w przypadku depotencjacji w odpowiedzi na silne bodźce prądowe. Pomimo jednak kilku krytycznych uwag badania przedstawione w części Wyniki uważam, za ambitne i prawidłowo przeprowadzone. W ich efekcie otrzymano szereg interesujących obserwacji. Wnioski na ogół też są prawidłowe, choć jak wspomniałem już powyżej Doktorantka, w niektórych przypadkach, nadinterpretowała swoje wyniki.

Dyskusja. Dyskusja przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej pani mgr Lech odnosi uzyskane wyniki do istniejącego stanu wiedzy i wprowadza w oparciu o ich kompilację model zmian molekularnych zachodzących w synapsie GABAergiczných w trakcie iLTP. Jednocześnie Doktorantka wskazuje na niektóre kierunki badań, które są konieczne w celu rozwinięcia jej modelu. Ponadto pani mgr Lech przedyskutowała potencjalne związki badanych przez nią mechanizmów molekularnych z wybranymi stanami neuropatologicznymi. Mam zastrzeżenia w zasadzie co do jednego tylko stwierdzenia. Na stronie 125 autorka pisze, że udowodniono, iż interakcje neuroliginy-2 nie są istotne podczas indukcji iLTP. Z drugiej strony, sama w części Wyniki, podniosła możliwość, iż podanie peptydu blokującego wpływa na nowotworzone, najprawdopodobniej w wyniku iLTP połączenia bez wpływu na już istniejące. A zatem wniosek powinien być raczej, taki, że nowopowstające połączenia nie mają znaczenia dla indukcji iLTP ale są ważne w trakcie jego stabilizacji. Niezależnie jednak od tej uwagi Dyskusję oceniam jednoznacznie pozytywnie.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest przygotowana w przeważającej części starannie. Od strony graficznej zdjęcia mikroskopowe są dobrej jakości i autorka zadbała o dodanie powiększeń pozwalających na ocenę badanych zmian przez czytelnika. Na pozytywną ocenę zasługuje również bogate zilustrowanie Wstępu rycinami schematycznie pokazującymi zmiany zachodzące w synapsach w plastyczności. Trochę, żal, że schematy te nie są nieco większe, co przyczyniłoby się do polepszenia ich czytelności. Natomiast, jeśli chodzi o uwagi krytyczne, to choć zwykle tego nie robię, chciałbym zwrócić uwagę na terminologię i pewne kluczowe błędy językowe. Jednym z rażących błędów pracy jest notoryczne używanie słowa ilość zamiast liczba w przypadku obiektów policzalnych. Z kolei, jeśli chodzi o terminologię naukową to nieprawidłowe moim zdaniem są sformułowania, takie jak reszta serylowa (powinno być reszta serynowa) czy ekspresja genu (powinno być ekspresja genu), które stosowane są w całej pracy konsekwentnie. W końcu wydaje mi się, że podkreślanie pogrubioną czcionką losowych pojęć w tekście Wstępu nie było konieczne i jest zabiegiem dość nietypowym dla rozpraw doktorskich.

Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Anny Lech spełnia wymagania określone odpowiednimi przepisami. Wyniki zostały

uzyskane za pomocą adekwatnych metod, a część z nich została opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym i przyczyniły się do poszerzenia naszej wiedzy na temat molekularnych mechanizmów plastyczności transmisji GABAergicznej, która jest coraz bardziej rozpoznawana jako kluczowy element uczenia się i pamięci, często zaburzony w chorobach neuropsychiatrycznych. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie pani mgr Anny Lech do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Jacek Jaworski