



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Dr hab. Tomasz Kowalczyk, prof. UŁ
Katedra Neurobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr. Anny Marii Lech

**pt.: Wpływ interakcji macierzy zewnątrzkomórkowej, białek adhezyjnych i proteaz
na plastyczność GABAergicznej transmisji hamującej w hipokampie**

Jedną z podstawowych cech organizmów zwierzęcych jest zdolność do uczenia się, czyli nabywania mniej lub bardziej trwałych zmian w zachowaniu dzięki nabytemu doświadczeniu osobniczemu. Nawet zwierzęta o stosunkowo prostej budowie układu nerwowego mogą uczyć się dzięki kojarzeniu bodźców środowiskowych z ważnymi biologicznie sytuacjami. W wyniku tego nabywają one zdolność unikania bodźców potencjalnie szkodliwych czy niebezpiecznych oraz aktywnego poszukiwania bodźców atrakcyjnych, związanych z nagrodą. Zmiany, które obserwowane są w postaci konkretnego rodzaju zachowania zwierzęcia, czy specyficznego rodzaju pamięci są niczym innym jak zewnętrzną manifestacją procesów zachodzących w obrębie układu nerwowego. U ludzi, pamięć pozwala na wykonywanie skomplikowanych operacji poznawczych związanych z postrzeganiem, uwagą, analitycznym myśleniem, stanowi również neuropsychologiczną podstawę prawidłowego funkcjonowania poczucia własnej tożsamości, a co za tym idzie również świadomości.

Podstawą procesu uczenia się i powstającej w jego wyniku pamięci jest zjawisko plastyczności, czyli zdolności do wytwarzania nowych bądź reorganizacji już istniejących połączeń synaptycznych. W związku z tym, wielu badaczy wskazuje, że ślady pamięciowe (engramy) są przechowywane i modyfikowane w obrębie układu nerwowego w postaci specyficznych połączeń w sieciach neuronalnych związanych z procesami uczenia się i zapamiętywania. Do podstawowych mechanizmów, które wskazywane są, jako neuronalne podłoże procesów pamięciowych zalicza się dziś zjawiska

długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (*long-term potentiation*; LTP) oraz długotrwałego osłabienia synaptycznego (*long-term depression*; LTD). Zjawisko LTP, jako substrat neuronalny procesu uczenia się badane jest z powodzeniem od kilku dziesięcioleci w synapsach pobudzających, głównie formacji hipokampa, ale również wielu innych struktur mózgowych. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż prawidłowe funkcjonowanie skomplikowanych obwodów neuronalnych związane jest z dynamicznymi interakcjami zachodzącymi zarówno w obrębie połączeń pobudzających jak i hamujących. Mimo oczywistej niedoskonałości naszej obecnej wiedzy i potrzeby dalszych prac eksperymentalnych, długotrwałe zmiany synaptyczne zachodzące w synapsach pobudzających są dziś stosunkowo dobrze poznane i scharakteryzowane. Inaczej rzecz się ma w przypadku synaps hamujących. Zjawisko długotrwałego wzmocnienia synaptycznego w międzyneuronalnych połączeniach wytwarzanych przez neurony GABAergiczne, a co za tym idzie udział tych neuronów w procesach związanych z wytwarzaniem śladów pamięciowych jest nadal mało poznane. Właśnie tym problemem postanowiła zająć się Pani mgr Anna Maria Lech w swoich badaniach. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt. *„Wpływ interakcji macierzy zewnątrzkomórkowej, białek adhezyjnych i proteaz na plastyczność GABAergicznej transmisji hamującej w hipokampie”* stanowi istotny i nowatorski wkład w badanie mechanizmów leżących u podstaw formowania się długotrwałych zmian plastycznych w synapsach hamujących (iLTP) a co za tym idzie ich udziału w wytwarzaniu engramów. Doktorantka podjęła się zadania scharakteryzowania podstawowych elementów synaps GABAergicznych formacji hipokampa, zaangażowanych w powstawanie i utrzymywanie się długotrwałego wzmocnienia synaptycznego. W swojej pracy eksperymentalnej analizowała zaangażowanie metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP3), integryn oraz neuroliginy-2 w zjawisko iLTP. Aby tego dokonać Pani mgr Lech postanowiła określić 1/ czy indukcja i utrzymanie iLTP zależne jest od aktywności MMP3; 2/ czy zjawisku iLTP towarzyszy aktywacja integryn; oraz 3/ wykazać rolę oddziaływania neureksyna-neuroligina-2 podczas reorganizacji synaps GABAergicznych wynikającej z indukcji zmian plastycznych. Dodatkowo, w związku z faktem, iż zjawiska plastyczności powstające w synapsach hamujących mogą zachodzić równolegle do tych występujących w sąsiadujących synapsach pobudzających, Doktorantka podjęła się zadania określenia, czy aktywność MMP3 ma wpływ na depotencjację obserwowaną w synapsach pobudzających. Cele postawione sobie przez Panią mgr Lech uważam za bardzo nowatorskie oraz istotne dla zrozumienia podstaw mechanizmów odpowiedzialnych za formowanie śladów pamięciowych w obwodach neuronalnych ośrodkowego układu nerwowego.

Teoretyczne tło badań prezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej przedstawione zostało w liczącym 45 stron wstępie. Ten rozdział pracy, podobnie zresztą jak pozostałe części rozprawy, został starannie przemyślany przez Doktorantkę i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do prezentowanych w dalszej części rozprawy badań. We wstępie Pani mgr Lech opisuje kolejno budowę

formacji hipokampa, charakteryzuje mechanizmy chemicznej transmisji synaptycznej oraz plastyczności w synapsach glutaminergicznych i GABAergicznych. W ostatnich podrozdziałach tej części rozprawy opisano funkcje metalotropeinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, integryn oraz białek adhezyjnych w procesach synaptycznych. Mimo ogromu informacji zawartych we wstępie do rozprawy doktorskiej stanowi on klarowne i logiczne tło dla dalszych rozdziałów pracy. Moja uwaga krytyczna związana z początkowymi częściami recenzowanej rozprawy dotyczy umiejscowienia celu pracy. Uważam, że klarowny i bardzo dobrze skomponowany i napisany wstęp powinien prowadzić czytelnika do wyszczególnienia i scharakteryzowania założonych przez Doktorantkę celów badawczych. Umieszczenie tych informacji na początku rozprawy, przed zarysowaniem teoretycznych podstaw badanych problemów naukowych, utrudnia moim zdaniem odbiór pracy.

Materiałem biologicznym wykorzystywanym przez Panią mgr Lech w swoich badaniach były myszy szczepu dzikiego oraz myszy transgeniczne $Mmp3^{-/-}$. Doświadczenia wykonywano na skrawkach formacji hipokampa oraz hodowlach neuronalnych komórek hipokampalnych. Zarówno w przypadku skrawków mózgowych jak i hodowli neuronalnych, do indukcji długotrwałych zmian plastycznych Doktorantka posłużyła się protokołami chemicznymi. Badania elektrofizjologiczne opisywane w recenzowanej rozprawie prowadzone były przy wykorzystaniu techniki whole-cell patch-clamp i opierały się na rejestracji postsynaptycznych prądów miniaturowych (mIPSC) powstających w wyniku aktywacji postsynaptycznych receptorów GABA_A przez uwolniony do szczeliny synaptycznej kwas γ -aminomasłowy. Dodatkowo, drugą techniką elektrofizjologiczną wykorzystywaną w opisywanych badaniach była rejestracja potencjałów polowych w postaci zbiorczego sygnału fEPSP podczas indukcji zjawisk plastycznych. Uzupełnieniem eksperymentów elektrofizjologicznych prowadzonych przez Doktorantkę było obrazowanie immunofluorescencyjne zmian strukturalnych powstających w synapsach. Oceniając stronę metodyczną pracy należy odnotować znakomite przygotowanie Pani mgr Lech pod względem umiejętności praktycznego zastosowania skomplikowanych i czasochłonnych technik eksperymentalnych.

Uzyskane wyniki zostały opisane w sposób jasny i syntetyczny, dodatkowo zilustrowano je trzydziestoma trzema rycinami, znacząco ułatwiającymi odbiór wielowątkowych danych. Wykorzystując rejestracje elektrofizjologiczne i obrazowanie immunofluorescencyjne Doktorantka wykazała, że aktywność MMP3 jest kluczowa dla indukcji i utrzymywania zjawiska iLTP w synapsach GABAergicznych, czemu towarzyszą zmiany strukturalne w obrębie tych synaps. W dalszym etapie badań Pani mgr Lech określiła, że zmiany architektury synaps GABAergicznych będące następstwem indukcji iLTP zależne są od możliwości tworzenia nowych połączeń pomiędzy białkami adhezyjnymi w obrębie synapsy. Wykazała, że kluczowe dla indukcji zjawiska długotrwałego wzmocnienia sympatycznego w synapsach hamujących jest tworzenie międzysynaptycznego kompleksu neureksyna-neurologina-2 podczas

reorganizacji strukturalnej synapsy. Kolejnym bardzo interesującym wnioskiem popartym danymi eksperymentalnymi było określenie roli swoistych receptorów macierzy zewnątrzkomórkowej w mechanizmach indukcji zjawiska iLTP. Doktorantka wykazała, że szczególną rolę w tym procesie może odgrywać aktywacja integryny α 5 β 1. Ostatnim istotnym wynikiem przedstawionym przez Doktorantkę, było wskazanie, iż aktywacja MMP-3, mając istotny udział w indukcji iLTP w synapsach GABAergicznym, nie wpływa znacząco na depotencjację pobudzonych synaps glutaminergicznych w obszarze CA1 hipokampa właściwego.

Wyniki uzyskane w pracy zostały bardzo ciekawie omówione i zestawione z najnowszymi danymi literaturowymi w części dyskusyjnej rozprawy. Sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne i dużą dojrzałość naukową Doktorantki. Jak wspominałem wcześniej, wyniki przedstawione i dyskutowane w recenzowanej rozprawie doktorskiej są bardzo obszerne i wielowątkowe stąd żałuję, że Doktorantka nie pokusiła się w końcowych fragmentach dyskusji o krótkie wypunktowanie najważniejszych jej zdaniem dokonań eksperymentalnych i nasuwających się z nich wniosków.

Strona redakcyjna przedstawionej do recenzji rozprawy nie budzi żadnych zastrzeżeń. Praca ma typowy dla tego typu opracowań układ. Wstęp jest klarowny, choć jak pisałam wcześniej powinien on prowadzić do celów pracy a nie być nimi poprzedzony. Wyniki opisane są w sposób jasny a ich krytyczna dyskusja w świetle najnowszych danych literaturowych przeprowadzona została w sposób, który nie budzi wątpliwości. O szerokiej wiedzy i bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki świadczy również liczba 350 (!) pozycji, trafnie wyselekcjonowanego, piśmiennictwa. Szata graficzna przedstawionego manuskryptu jest na wysokim poziomie. Ryciny i schematy obecne we wstępie i dyskusji znacząco pomagają czytelnikowi odbiór przekazywanych treści, natomiast te umieszczone w rozdziale „Wyniki” w jasny sposób ilustrują otrzymane przez Doktorantkę dane.

Z obowiązku recenzenta pragnę podzielić się z Doktorantką pewnymi drobnymi uwagami, które nasunęły mi się podczas czytania, podkreślam, bardzo dobrze napisanej pracy:

- 1/ na str. 19 przytoczony zostaje prawidłowy podział anatomiczny formacji hipokampa na hipokamp właściwy, zakręt zębaty i kompleks podkładki – niestety jest to jedyne miejsce pracy w którym jest on używany; w pozostałych fragmentach pracy używany jest jedynie termin „hipokamp”. Sądzę, że po wprowadzeniu terminów hipokamp właściwy i formacja hipokampa na początku wstępu należałoby ich używać w całej rozprawie;
- 2/ komórki kiciaste obecne na str. 20 (*mossy cells*) stają się komórkami mszystymi na rycinie 6.2 widniejącej na kolejnej stronie;

- 3/ w rozdziale metodycznym nie znalazłem informacji dotyczącej ogólnej liczby użytych do doświadczeń zwierząt a także konkretnej liczby zwierząt szczepu dzikiego i transgenicznych.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Marii Lech dowodzi, że jest ona jest bardzo dobrze przygotowana zarówno pod względem teoretycznym jak i praktycznym, do pracy naukowej. Praca stanowi przemyślaną koncepcyjnie, bardzo dobrze wykonaną pod względem użytych technik i analiz oraz jasno i zwięźle opisaną całość. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są nowatorskie oraz istotne dla zrozumienia procesów związanych z powstawaniem długotrwałych zmian plastycznych w synapsach GABAergicznym, a co za tym idzie rzucają nowe światło na mechanizmy kodowania śladów pamięciowych w obwodach neuronalnych formacji hipokampa. Przedstawione w tekście recenzji nieliczne uwagi mają w dużej mierze charakter redakcyjny i nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy. Dorobek naukowy Doktorantki obejmuje współautorstwo dwóch artykułów z listy JCR, oraz jednej pracy przesłanej do recenzji. Dotychczasowe dokonania naukowe Pani mgr Lech oceniam wysoko.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe wnioski stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Anny Marii Lech spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Anny Marii Lech do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zwracając uwagę ponadprzeciętne przygotowanie merytoryczne i znakomity warsztat naukowy mgr Lech, a także nowatorstwo uzyskanych przez nią wyników, poszerzających naszą wiedzę w zakresie funkcjonowania obwodów neuronalnych podczas tworzenia śladów pamięciowych, wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie zarówno recenzowanej rozprawy doktorskiej oraz samej Doktorantki stosowną nagrodą.

