

Dr hab. Monika Liguz-Lęcznar, Profesor Instytutu

Warszawa, 26.01.2020

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

m.liguz@nencki.edu.pl

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Izabeli Brzdąk

„Rola metaloproteinaz w kształtowaniu długotrwałej plastyczności synaptycznej oraz pobudliwości sieci neuronalnej w obszarze CA1 hipokampa myszy”.

Wykonanej w Katedrze Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem promotora Prof. Dr hab. Jerzego Mozrzymasa oraz promotora pomocniczego dr. Tomasza Wójtowicza

Plastyczność synaptyczna, jako proces umożliwiający komórkom nerwowym sprostanie zmieniającym się wymaganiom środowiska, jest kluczowa dla sprawnego działania układu nerwowego, zaś jej upośledzenie obserwuje się w wielu stanach patologicznych. Dokładne poznanie mechanizmów zaangażowanych w różne formy plastyczności, występujące w różnych obszarach mózgu, jest kluczowe dla zrozumienia wielu procesów neurobiologicznych jak uczenie się i pamięć, regeneracja, patologie układu nerwowego. Metaloproteinazy (MMPs), jako enzymy mające zdolność modyfikowania macierzy zewnątrzkomórkowej stanowią istotny element maszynierii wspomagającej możliwości przekształceń elementów strukturalnych tworzących połączenia synaptyczne. Bogactwo substratów dla MMPs, a także ciągle odkrywane ich funkcje nieproteolityczne sprawiają, że rola tych enzymów w procesach plastyczności strukturalnej i funkcjonalnej systematycznie wzrasta. Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Patrycji Izabeli Brzdąk skupia się na roli metaloproteinazy 3 i 9 (MMP-3, MMP-9) w długotrwałej plastyczności oraz pobudliwości sieci neuronalnej obszaru CA1 hipokampa. Autorka dysertacji, stosując szereg metod elektrofizjologicznych, podjęła m.in. próbę określenia roli MMP-3 i MMP-9 w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym zależnym od receptora NMDA oraz zbadania różnic w udziale wybranych metaloproteinaz w plastyczności synaps formowanych w obszarze dendrytów bazalnych, zlokalizowanych w obrębie Stratum oriens i apikalnych (Stratum radiatum) komórek piramidowych obszaru CA1. Pokusiła się również o próbę zdefiniowania szlaków sygnałowych zaangażowanych w indukcję zmian plastycznych w poszczególnych obszarach. Jednym z celów pracy było także zbadanie roli wybranych metaloproteinaz w plastyczności synaps hamujących, formowanych przez interneurony zawierające parwalbuminę, na komórkach piramidowych obszaru CA1 hipokampa. Przedstawione w pracy badania dowodzą sprawności doktorantki w posługiwaniu się wachlarzem wymagających technicznie metod elektrofizjologicznych (rejestracja potencjałów polowych, technika Patch-clamp, jednoczesna rejestracja z pary połączonych neuronów) i dobrze wpisują się nurt badań prowadzonych w Katedrze Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

Ocena formalna

Rozprawa liczy 126 stron, ma typowy dla prac doktorskich układ, z podziałem na Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Dyskusję, Podsumowanie i wnioski oraz Spis literatury. Większość rozdziałów została podzielona na podrozdziały, co ułatwia podążanie za rozumowaniem



autorki. Praca zawiera również wykaz zastosowanych skrótów, wykaz dorobku naukowego doktorantki, informacje dotyczące źródeł finansowania badań oraz spis rycin i tabel. Wyniki przedstawiono na 12u wieloelementowych rycinach; zacytowano ponad 300 publikacji.

Ocena merytoryczna

Obszerny wstęp rozprawy rozpoczyna zdefiniowanie i omówienie procesów plastyczności układu nerwowego, a następnie opis budowy, funkcji i połączeń poszczególnych obszarów hipokampa. W dalszej części Wstępu omówione zostały różne formy i mechanizmy plastyczności długotrwałej, dotyczące zarówno transmisji pobudzającej, jak i hamującej. Następnie przedstawiono krótko różne typy neuronów GABAergiczných, ze szczególnym uwzględnieniem neuronów zawierających parwalbuminę i podano przykłady zaobserwowanych w nich zmian plastycznych. Wreszcie scharakteryzowano grupę metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej pod względem budowy, funkcji, lokalizacji w mózgu oraz udziału w plastyczności neuronalnej, ze szczególnym naciskiem na MMP-3 i MMP-9, które były przedmiotem badań doktorantki. Cały podrozdział poświęcono udziałowi MMPs w mechanizmach patologii mózgu, co jakkolwiek bardzo ciekawe i ważne, nie ma bezpośredniego związku z tematyką poruszaną w dysertacji. Wstęp kończy krótki podrozdział poświęcony udziałowi integrzyn w plastyczności synaptycznej.

Wstęp jest napisany w sposób jasny i przystępny, choć odrozdział dotyczący budowy i funkcji hipokampa napisany jest nieco chaotycznie, zawiera też kilka nieprecyzyjnie sformułowanych zdań, np. „Z kory śródwęchowej wysyłane są projekcje dalekiego zasięgu do warstwy CA1” (której?), lub „Zmiany w obszarze CA1 prowadzą do upośledzenia pamięci” (jakie zmiany? Jakiej pamięci?). Kilkakrotnie zdarza się też w rozprawie błędna odmiana słowa hipokamp: hipokampu, zamiast hipokampa.

W podrozdziale 4.2.1. Długotrwała plastyczność transmisji pobudzającej mylnie użyto skrótu LTP, zamiast LTD dla angielskiej nazwy „long term depression”.

W podrozdziale 4.4.4.4 Presynaptyczny mechanizm LTP, czytamy: „Kolejny mechanizm indukcji wymaga sygnalizacji postsynaptycznych receptorów kinaz tyrozynowych (ang. Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma, Ephc)”. Wydaje się, że doktorantka błędnie przetłumaczyła wyrażenie „receptor tyrosine kinases” – są to bowiem receptorowe kinazy tyrozynowe, co oznacza, że są one częścią receptorów – w tym przypadku receptorów dla efryn. Mam również wrażenie, że użyto tu błędnego skrótu Ephc. W literaturze występuje skrót Eph – czy doktorantka może wyjaśnić pochodzenie użytego skrótu Ephc? Zabrakło mi również krótkiego omówienia mechanizmu indukcji LTP poprzez aktywację ścieżki zależnej od efryny B. Pozostałe ścieżki zostały omówione dość szczegółowo, ta zaś jedynie zasygnalizowana.

Wstęp zawiera kilka niejasnych/nieprawidłowych sformułowań, które wymagają wyjaśnienia lub doprecyzowania:

- co doktorantka ma na myśli pisząc w podrozdziale 4.2.2.3 we fragmencie dotyczącym procesów syntezy białek: „somatyczna translacja w dendrytach” oraz w podrozdziale 4.3.1.1, że „BDNF może wpływać na gęstość punktów GABAergiczných”?
- jakie białko wiążące wapń doktorantka ma na myśli pisząc na str.31: „ komórki koszyczkowe...których markerem molekularnym jest parwalbumina, PV+ oraz białko wiążące wapń”.
- w podrozdziale 4.6.3, intercellular adhesion molecule ICAM 1 została przetłumaczona jako międzykomórkowa molekula adhezyjna. Prawidłowa nazwa brzmi: cząsteczka adhezji międzykomórkowej. Na Ryc. 12, ilustrującej procesy proteolityczne MMP-9 w plastyczności synaptycznej nie zaznaczono ICAM-1, a ICAM-5.
- inne przykłady nieprawidłowych sformułowań: „wsteczne wydzielanie BDNF” str. 27; „endocytowe białko adaptacyjne AP2” str.29; „próg strzelania potencjału czynnościowego” str.31.

W zrozumieniu niektórych fragmentów pracy przeszkadza również fakt, że autorka w kilku miejscach nie precyzuje której metaloproteiny dotyczy dany fragment, np. na str. 41 czytamy „Myszy MMP-KO mają upośledzone uczenie apetytywne czy klasyczne warunkowanie strachem”. Cytowana w tym miejscu praca dotyczy MMP-9 więc zapewne to tej metaloproteiny dotyczył nokaut. Należy również zwrócić uwagę, że przytaczany tu „fear conditioning” to warunkowanie strachu, a nie warunkowanie strachem. Na str. 44 autorka pisze: „Należy podkreślić, że podwyższony poziom MMP związany jest również z zespołem łamliwego chromosomu X...” – tu również nie wiadomo której MMP dotyczy ta informacja.

Cel pracy

Cele pracy są sformułowane prawidłowo i rozwinięte w postaci szczegółowych zadań badawczych. Moją jedyną wątpliwość budzi druga część ostatniego zdania tego rozdziału. Dotyczy ono zbadania udziału MMP w plastyczności synaps hamujących: „Celem zadania jest wyjaśnienie, czy aktywność proteolityczna MMP wpływa na plastyczność synaps hamujących i czy mechanizm ten zależy od typu interneuronu”. Ponieważ autorka badała tylko jeden typ interneuronów-neurony parwalbuminowe, trudno tu mówić o zależności od innych typów interneuronów.

Materiały i metody

Metody zastosowane w pracy, zwłaszcza opisy rejestracji elektrofizjologicznych są przedstawione wyczerpująco i szczegółowo. Nie podano natomiast liczby zwierząt wykorzystanych w doświadczeniach. Muszę tu zwrócić uwagę na powtarzającą się kilkakrotnie nieprawidłową odmianę słowa myszy: autorka pisze np. „...hodowle zostały przygotowane z mysz”, zamiast z myszy oraz na błędną nazwę receptory kainianowe zamiast kainianowe. Dość skrótowo potraktowany został opis analizy statystycznej otrzymanych danych. Nie wymieniono w których eksperymentach zastosowano test studenta, a w których analizę wariancji oraz jaki test post-hoc zastosowano.

Zastanawia mnie jaki był powód użycia w różnych eksperymentach innych inhibitorów MMP-3 o tak różnym spektrum działania oraz czy i jaki ewentualnie mogło to mieć wpływ na uzyskane wyniki.

Wyniki

Wyniki opisane są w sposób jasny i klarowny oraz zilustrowane przejrzystymi wykresami. Brakuje mi informacji co oznaczają liczby „n” na słupkach niektórych wykresów (dla części wykresów podano, że jest to liczba pomiarów, dla innych, że jest to liczba eksperymentów, dla części brak informacji), nigdzie jednak nie podano ile zwierząt wykorzystano w poszczególnych eksperymentach. Brak również informacji co reprezentują słupki błędów na poszczególnych wykresach.

Nie rozumiem co doktorantka miała na myśli pisząc na str. 62, że „Myszy znokautowane w genie cdc42 wykazują zaburzenia w pamięci zdalnej związanej z odległymi wydarzeniami”. Niejasno jest również sformułowane uzasadnienie dla badania udziału receptora PAR-1 na str. 65. Nie znalazłam w tekście odnośnika i opisu do ryc.21. Na ryc.25, powierzchnię sygnału fEPSP w Stratum radiatum przedstawia ryc. C, a nie jak podano B.

Podsumowując wyniki należy docenić warsztat metodyczny doktorantki, bogactwo zebranych danych i liczbę wykonanych analiz, które zostały opisane i przedstawione w sposób jasny, zwięzły i konsekwentny. Należy podkreślić, że większość wyników opisanych w niniejszej rozprawie została opublikowana w znaczących czasopismach naukowych. Szkoda, że część z zaprezentowanych we wspomnianych publikacjach wyników (jak choćby badania z zastosowaniem rekombinowanego białka MMP-3) nie została włączona do niniejszej rozprawy, gdyż znacznie by ją one wzbogaciły. Podobnie potwierdzenie otrzymanych wyników z zastosowaniem zwierząt pozbawionych MMP-3 byłoby cenne, szczególnie w obliczu braku całkowicie specyficznych inhibitorów poszczególnych metaloproteinaz.

Dyskusja

Dyskusja pracy jest rozbudowana i dobrze konfrontuje wyniki otrzymane przez doktorantkę zarówno z wcześniejszymi badaniami Zespołu, w którym praca powstała, jak i wynikami badań innych autorów. Autorka odnosi się zarówno do badań wykonanych w różnych modelach *in vitro*, jak i badań *in vivo*. Opisuje też drobiazgowo możliwe przyczyny i mechanizmy zaobserwowanych zmian.

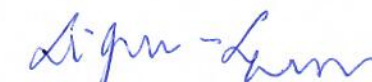
Niezrozumiały jest dla mnie fragment dotyczący udziału MMP-3 w plastyczności E-S (str. 81). Autorka tłumacząc fakt, że wzmocnienie amplitudy potencjałów polowych nie zostało całkowicie zniesione po podaniu inhibitora MMP-3, pisze, że MMP-3 dokonuje proteolizy w okolicy perisynaptycznej i w związku z tym największy efekt zablokowania tego enzymu jest widoczny przy rejestracji w odległości ok. 150-200 μM od warstwy ciał komórkowych neuronów piramidowych, ale dokładnie taką odległość podano w Metodach w opisie rejestracji potencjałów polowych w CA1, tak więc efekt zablokowania powinien być w tym przypadku zmaksymalizowany.

Dyskusję kończy krótki rozdział Podsumowanie i wnioski, w którym autorka rozprawy w zwięzły sposób dokonuje syntezy przeprowadzonych badań i otrzymanych wyników. Rozdział ten zakończony jest przedstawionymi w punktach konkluzjami. Stwierdzenie, że MMP-9 nie bierze udziału w LTP zależnym od receptora NMDA jest zbyt ogólne i nie jest uprawnionym wnioskiem na podstawie przeprowadzonych badań. Podobnie konkluzja, że MMP-3 jest niezbędna do indukcji i utrzymania plastyczności w paradygmacie E-S nie jest w pełni uzasadniona, gdyż w pracy badano jedynie udział MMP-3 w indukcji plastyczności E-S. Kolejna konkluzja jest dla mnie niezrozumiała. Autorka pisze, że odkryto nową projekcję Stratum oriens niewrażliwą na działanie inhibitorów MMP – jaką projekcję i które MMPs ma autorka na myśli? Konkluzje 5, 6 i 7 nie są poprawnie sformułowane językowo: należałoby je rozpocząć: W Stratum.....itd. Ostatni punkt jest raczej próbą wyznaczenia kierunku badań w poszukiwaniu mechanizmów molekularnych działania MMP-3 niż konkluzją.

Moją wysoką ocenę merytoryczną rozprawy obniża nieco jej słaba strona językowa. Liczne błędy językowe, stylistyczne i gramatyczne oraz pojawiające się bardzo często „kalki językowe” utrudniają czasem podążanie za myślą autorki, gdyż niektóre zdania są niestety całkowicie niezrozumiałe – dla przykładu przytoczę zdanie: „Białka RhoA oraz Cdc42 lokalizuje się głównie na dendrytach a ich poziom został wykryty w obszarze St. oriens oraz St. radiatum w porównaniu z białkiem RhoB, które ma lokalizację w ciele komórkowym (str.62)”. Dwukrotnie MMP-9 jest określone jako proteza, a nie proteaza; występuje rozszczepienie, zamiast rozszczelnienie bariery krew-mózg; czytamy również, że sygnały były akwizowane.

Wniosek końcowy.

Przedstawione przeze mnie uwagi nie umniejszają naukowej wartości rozprawy, która stanowi cenny wgląd w mechanizmy działania metaloproteinaz w ośrodkowym układzie nerwowym oraz ich udziału w procesach plastyczności neuronalnej. Szczególnie cenne są w moim przekonaniu wyniki dotyczące plastyczności GABAergicznej, o której niewiele jeszcze wiadomo oraz odkrycie odmiennych mechanizmów plastyczności w synapsach dendrytów bazalnych i apikalnych neuronów obszaru CA1. Obserwacje poczynione przez doktorantkę stanowią istotny aspekt poznawczy i z pewnością będą przyczynkiem do dalszych badań w tym temacie. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Izabeli Brzdąk pt. „Rola metaloproteinaz w kształtowaniu długotrwałej plastyczności synaptycznej oraz pobudliwości sieci neuronalnej w obszarze CA1 hipokampa myszy” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Izabeli Brzdąk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Monika Liguz-Lęcznar