

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Wiery
pt.: Wpływ modyfikacji macierzy zewnątrzkomórkowej na plastyczność
synaptyczną projekcji hipokampalnej włókna mszyste-CA3.**

W ostatnich kilku dekadach, to jest począwszy od roku 1973 gdy Bliss i Lomo, pracując w laboratorium Per Andersona w Oslo opublikowali pierwszą pracę na temat tzw. długotrwałego wzmocnienia synaptycznego, przedstawiono wiele hipotez mających wyjaśnić etiologię plastyczności na poziomie synaptycznym. Odkrycie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP), chociaż dopiero po kilku latach zostało w pełni docenione przez społeczność neurobiologiczną, zmieniło w dużym stopniu współczesne poglądy na temat funkcjonowania nie tylko połączeń synaptycznych ale również całego mózgu. Plastyczność mózgu jest bowiem ściśle zdeterminowana krótko- lub długotrwałymi, odwracalnymi zmianami funkcjonowania całych sieci neuronalnych, spowodowanych zmianami w środowisku zewnętrznym. Badania ostatnich ponad 40 lat wykazały, że zjawisko LTP można traktować jako substrat funkcjonalny zwłaszcza krótkotrwałych form pamięci. Nic zatem dziwnego, że modele wywoływania zjawiska LTP w preparatach in vitro oraz in vivo od lat są wykorzystywane w rozmaitych badaniach analizujących mechanizmy procesu uczenia i powstawania śladów pamięciowych. Od lat też najpopularniejszym modelem doświadczalnym do badań LTP jest preparat skrawka mózgowego formacji hipokampa. Jest to spowodowane szczególną, laminarną i warstwową strukturą hipokampa oraz, co nadzwyczaj istotne, zachowaniem w warunkach pozaustrojowych struktury wewnętrznych połączeń synaptycznych: drogi przeszywającej, włókien kiciastych oraz kolaterali Schaffera. Początkowo uważano, że proces LTP polega przede wszystkim na zmianach funkcjonalnych w obrębie synaps, w tym min na

zmianach w procesie wydzielania neuroprzekaźnika. Obecnie wiadomo, że zmianom o charakterze funkcjonalnym towarzyszą procesy strukturalne polegające na modyfikacjach kształtu kolców dendrytycznych, kompozycji macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) i adhezyjnych białek błonowych. W ostatnich latach okazało się, że proteoliza perysynaptyczna, czyli hydroliza białkowych części zewnątrzkomórkowej, okołosynaptycznej macierzy, może być istotnym czynnikiem łączącym funkcjonalną i strukturalną komponentę zmian plastycznych na poziomie synaptycznym. Wśród proteaz biorących udział w powstawaniu plastyczności synaps szczególną rolę pełnią proteazy z rodziny metaloproteinaz (MMP).

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Grzegorza Wiery pochodzi z zespołu naukowego prof. dr hab. Jerzego Mozrzymasa, który od wielu lat z dużym sukcesem bada zmiany procesów transmisji synaptycznej i zmiany plastyczne w obrębie tych struktur. Rozprawa doktorska Pana mgr Grzegorza Wiery stanowi bardzo interesującą, kompleksową analizę roli jaką pełnią proteazy z rodziny metaloproteinaz w generowaniu synaptycznych zmian plastycznych (LTP) w projekcji włókna kiciaste- rejon CA3 formacji hipokampa. Wybór przez Doktoranta tej właśnie projekcji hipokampalnej uważam za bardzo trafny ponieważ projekcja włókna kiciaste - CA3 (WK-CA3) pełni szczególną rolę w tworzeniu śladów pamięciowych oraz wykazuje wyjątkowo wysoki poziom plastyczności strukturalnej, manifestującej się min zmianami w topografii projekcji.

W badaniach zastosowano szereg bardzo nowoczesnych technik laboratoryjnych: technikę rejestracji wywołanych potencjałów polowych w celu uzyskania LTP, techniki immunofluorescencyjne, zymografię oraz technikę western blot. Do badań wykorzystano zwierzęta transgeniczne oraz szczury z wyłączonym genem określonej proteazy MMP. Rozprawa doktorska realizowana była w latach 2011-2014 w ramach dwóch grantów KBN i NCN. Należy podkreślić, że część wyników uzyskanych w ramach badań do rozprawy doktorskiej została już wcześniej opublikowana w *Molecular and Cellular Neuroscience* oraz *Hipocampus*, czołowych światowych periodykach neurobiologicznych.

W swoich badaniach Autor jasno zdefiniował główne cele rozprawy, które sprowadzają się do zweryfikowania głównej hipotezy mówiącej o tym, że proteoliza perysynaptyczna dokonywana przez proteazę MMP-9 jest istotnym elementem mechanizmu odpowiedzialnego za indukcję i ekspresję długotrwałej plastyczności synaptycznej w projekcji WK-CA3.

Teoretyczne tło przedstawionych w rozprawie badań zostało przez Doktoranta bardzo interesująco przedstawione w obszernym, liczącym bowiem aż 59 str. wstępie. Ten rozdział pracy doktorskiej, podobnie zresztą jak pozostałe części rozprawy, został bardzo starannie przez Doktoranta przemyślany i napisany a zastosowane liczne podrozdziały i starannie przygotowane kolorowe rysunki i schematy sprawiają, że wstęp, pomimo znacznego rozbudowania, czyta się jako doskonały naukowy esej na temat struktury hipokampa, powstawania LTP oraz macierzy komórkowej.

Na str. 12 i 27 wstępu Autor porusza kwestię przewodzenia potencjałów postsynaptycznych (EPSP i IPSP) wzdłuż dendrytów. Otóż pragnę zwrócić uwagę, że tonicznie do ciała komórki przewodzony jest tylko EPSP (jest to bowiem lokalne i odwracalne „źródło” prądu jonowego, które przemieszcza się zgodnie z różnicą potencjałów). W przypadku powstającego w obszarze postsynaptycznym IPSP sytuacja jest odwrotna – miejsce to jest „zlewem” prądu jonowego, generującym prąd jonowy również zgodnie z różnicą potencjałów ale w kierunku przeciwnym.

Dużo miejsca Autor poświęca rodzinie proteaz MMP. W kolejnych podrozdziałach omawia ekspresję i lokalizację subkomórkowych proteaz MMP w mózgu. Co ciekawe, Doktorant odstąpił od typowej redakcji wstępu, który zazwyczaj kończy się przedstawieniem celu pracy. W rozprawie cel pracy przedstawiony jest na początku. Wbrew pozorom taki zabieg redakcyjny ułatwia zrozumienie istoty badań.

Wszystkie zastosowane techniki doświadczalne zostały bardzo szczegółowo opisane. Badania przeprowadzono na skrawkach formacji hipokampa uzyskanych od szczurów szczepu Wistar. W pracy zastosowano metodę rejestracji wywołanych, lokalnych potencjałów polowych. Elektroda drażniąca pobudzała aksony komórek ziarnistych zakrętu zębatego a elektroda rejestrująca umieszczana była w rejonie CA3. W osobnych podrozdziałach przedstawiono protokoły indukcji LTP i analizy otrzymanych sygnałów polowych. Na str. 65 Autor pokazuje schemat przykładowego potencjału polowego (EPSP) rejestrowanego z obszaru postsynaptycznego. Jedna ze strzałek mylnie pokazuje PSP czyli tzw. salwę zbiorczą (popspike), która jest wskaźnikiem zsynchronizowanych wyładowań komórkowych, niewidocznych w sytuacji, gdy potencjał polowy rejestrowany jest z obszaru postsynaptycznego (?). PSP typowo rejestrowany jest z obszaru komórkowego.

W swojej rozprawie doktorskiej Autor konsekwentnie używa terminu „włókna mszyste”. Termin ten pojawia się już w tytule. Z obowiązku recenzenta muszę niestety zwrócić uwagę Autorowi, że ten ładnie brzmiący termin jest niewłaściwy. Wg. Polskiego

Mianownictwa Histologicznego i Cytofizjologicznego (W. Sawicki, PZWL, 1998) właściwy, ale bardzo brzydko brzmiący termin to „włókna kiciaste”.

Oceniając całą stronę metodyczną rozprawy doktorskiej należy odnotować znakomite przygotowanie Doktoranta pod względem umiejętności praktycznego zastosowania wielu trudnych lub bardzo trudnych technik eksperymentalnych.

Otrzymane wyniki zostały starannie przez Doktoranta opisane i zilustrowane ogromną liczbą rycin. Doktorant wykazał, że w projekcjach CA3-CA1 oraz włókna kiciaste – rejon CA3 ekspresja LTP zależy do aktywności proteazy MMP-9. Jak słusznie zwraca uwagę Autor, wynik ten sugeruje, że pomimo różnic w mechanizmach indukcji i ekspresji LTP w poszczególnych projekcjach neuronalnych, udział proteazy MMP-9 w mechanizmach plastyczności synaptycznej ma charakter uniwersalny. W ramach przeprowadzonych badań wykazano również, że LTP w projekcji WK-CA3 jest upośledzone w podobnym stopniu w sytuacji braku (myszy z nokautem genetycznym) oraz przy znacznym nadmiarze aktywnej proteazy (transgeniczne szczury nadekspresjonujące MMP-9). Co więcej, w obecności egzogennej proteazy MMP-9 podanej do środowiska skrawka obserwowano stopniowe samoistne wzmocnienie synaps WK-CA3, które związane było z rozmiarem indukowanego później LTP. Wyniki powyższe wskazują, że do indukcji prawidłowego LTP w hipokampie, niezbędny jest właściwy i precyzyjnie zbilansowany poziom aktywności kluczowej proteazy MMP-9.

Z innych bardzo interesujących rezultatów, które uzyskał Doktorant należy odnotować również ten, że spośród metaloproteinaz ekspresjonowanych w mózgu, oprócz MMP-9 również proteaza MMP-3 uczestniczy w molekularnych mechanizmach regulujących plastyczność synaptyczną. W skrawkach mózgowych myszy pozbawionych proteazy MMP-3 (KO) zarejestrowano bowiem upośledzenie fazy konsolidacji LTP. Ponadto stosując zymografię kazeinową *in situ* mgr Grzegorz Wiera zaobserwował aktywność głównie proteazy MMP-3 w neuropilu rejonu CA1. Z innych ciekawych wyników, które uzyskał Doktorant należy odnotować również ten, że proteoliza perysynaptyczna zależna od proteazy MMP-3 reguluje długotrwałe wzmocnienie synaptyczne wpływając na funkcję napięciowo-zależnych kanałów wapniowych typu L lub aktywowanych przez nie szlaków sygnałowych.

Przedstawione w pracy wyniki zostały ciekawie omówione w części dyskusyjnej rozprawy. Prawie 20 stronicowa dyskusja jest wielowątkowa i na bardzo wysokim poziomie. Świadczy o tym również liczba trafnie dobranych i wyselekcjonowanych ponad 380 pozycji piśmiennictwa. Wskazuje ona na bardzo dobre przygotowanie Doktoranta

pod względem teoretycznym. Bez wątpienia ma rację Autor konkludując, że wyniki zawarte w niniejszej rozprawie rzucają nowe światło na zagadnienie roli proteolizy w procesach plastyczności synaptycznej, a tym samym i uczenia się oraz pamięci.

Mam drobną uwagę do strony redakcyjnej rozprawy doktorskiej. Praca zaczyna się bardzo rzeczowo napisanym streszczeniem, brak jest jednak wyraźnie sformułowanych wniosków końcowych, które nawiązywałyby do zdefiniowanych na początku 7 celów pracy.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Grzegorza Wiery dowodzi, że Doktorant jest bardzo dobrze przygotowany zarówno pod względem teoretycznym jak i praktycznym do pracy naukowej. Pan mgr Grzegorz Wiera musiał opanować wiele trudnych technik badawczych. Dzięki temu uzyskał ogromną ilość wyników, które doskonale opracował i zinterpretował. Stanowią one istotny wkład w zrozumienie substratu neuronalnego zwłaszcza strukturalnych zmian powstających w procesie LTP. Duża erudycja Autora sprawiła, że praca została napisana w sposób staranny, przemyślany i ładnym językiem.

Recenzowana praca stanowi przemyślaną koncepcyjnie, dobrze wykonaną i opisaną całość, co składa się na wartościową i dojrzałą pracę naukową. Uzyskane przez Doktoranta wyniki zostały już wcześniej pozytywnie ocenione w procesie redakcyjnym dwóch wspomnianych pism naukowych.

Uważam, że recenzowana praca w pełni odpowiada wszystkim wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Na tej podstawie przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Grzegorza Wiery do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wyjątkowo cenne naukowo wyniki ocenianej rozprawy, ich znakomity sposób przedstawienia przez Autora oraz fakt, że zostały one wcześniej opublikowane w renomowanych periodykach o zasięgu światowym upoważniają mnie do zgłoszenia dodatkowego wniosku o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

prof. dr hab. Jan Konopacki