



INTERNATIONAL INSTITUTE OF MOLECULAR AND CELL BIOLOGY IN WARSAW

CENTRE OF EXCELLENCE IN MOLECULAR BIO-MEDICINE

Prof. dr hab. Jacek Jaworski
Pracownia Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
ul. Ks. Trojdena 4, 02-109, Warszawa
Tel: 022 597 07 55; Fax: 022 597 07 15
e-mail: jaworski@iimcb.gov.pl

Warszawa, 6.08.2014

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Wiery, pt. „Wpływ modyfikacji macierzy zewnątrzkomórkowej na plastyczność synaptyczną projekcji hipokampalnej włókna mszyste - CA3”

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana magistra Grzegorza Wiery opisuje wyniki badań mających na celu określenie wpływu modyfikacji macierzy zewnątrzkomórkowej przez metaloproteinazy z rodziny MMP na plastyczność synaptyczną dwóch ważnych projekcji w hipokampie: włókna mszyste (MF)-CA3 i CA3-CA1. W konsekwencji, przeprowadzone przez Doktoranta badania wykazały, iż w przypadku obydwu badanych projekcji MMP-9 pełni bardzo istotną rolę w regulacji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP), pomimo różnego charakteru tego zjawiska w przypadku porównywanych synaps. Ponadto, Doktorant po raz pierwszy wykazał rolę MMP-3 w LTP synaps CA3-CA1, i wskazał, iż reguluje ona najprawdopodobniej funkcję napięciowo zależnych kanałów wapniowych. Przedstawione wyniki mają duże znaczenie poznawcze z wielu względów. Po pierwsze dlatego, iż uważa się LTP za elektrofizjologiczny model zjawisk leżących u podłoża uczenia się i formowania pamięci. Ponadto, wiadomo już obecnie, iż aktywność metaloproteinaz jest zaburzona w różnych neuropatologiach, zarówno w chorobach neurorozwojowych jak i neurodegeneracyjnych. W przypadku zespołu łamliwego chromosomu X już obecnie stosuje się w klinice związki hamujące między innymi aktywność MMP-9. Wskazanie na udział MMP-3 w plastyczności hipokampa poszerza zakres potencjalnych celów terapeutycznych a ponadto może otworzyć nowe kierunki badań nad schorzeniami związanymi z szeroko pojętymi zaburzeniami plastyczności synaptycznej.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 179 stron maszynopisu ma układ względnie typowy dla rozpraw doktorskich. Rozprawę rozpoczynają jednostronicowe streszczenia w językach polskim i angielskim oraz trzystronicowe dokładne omówienie celów podjętej pracy. Po nich następuje bardzo obszerny, liczący 52 strony Wstęp teoretyczny, zawierający 7 głównych podrozdziałów, które w sposób dogłębny i uporządkowany wprowadzają czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. Po Wstępie, Doktorant zamieścił opis materiałów i metod, podzielony na 10 głównych podrozdziałów (11 stron). Wyniki, liczące 63 strony są podzielone na 3 główne części tematyczne dotyczące odpowiednio badania roli MMP-9 (część I i II) i MMP-3 (część III) w plastyczności synaptycznej połączeń MF-CA3 oraz CA3-CA1. Następująca po tym rozdziale piętnastostronicowa Dyskusja omawia 6 wybranych, głównych problemów naukowych. Rozprawa kończy się podsumowaniem wyciągniętych wniosków, wykazem rycin oraz tabel, spisem publikacji Doktoranta oraz bibliografią.



INTERNATIONAL INSTITUTE OF MOLECULAR AND CELL BIOLOGY IN WARSAW

CENTRE OF EXCELLENCE IN MOLECULAR BIO-MEDICINE

Ocena merytoryczna

Cele rozprawy. Doktorant sformułował 7 szczegółowych celów rozprawy, z których pierwszy koncentruje się na wyłonieniu metaloproteinaz potencjalnie zaangażowanych w plastyczność synaptyczną w projekcji MF-CA3. Pozostałe koncentrują się na badaniu wpływu konkretnych metaloproteinaz, MMP-9 i MMP-3, na plastyczność połączeń MF-CA3 oraz CA3-CA1 i określeniu podłoża molekularnego obserwowanych zmian. Cele są sformułowane prawidłowo, logicznie, i są adekwatne do zawartości rozprawy.

Wstęp ocenianej rozprawy jest bardzo obszerny. Omówione zostały w nim kolejno zagadnienia dotyczące transmisji plastyczności synaptycznej oraz eksperymentalnych sposobów pomiaru tych zjawisk. Następnie, Autor przechodzi do omówienia zjawiska plastyczności strukturalnej, ze szczególnym uwzględnieniem badanych przez Doktoranta połączeń synaptycznych CA3-CA1 i włókna mszyste-CA3. Następnie zostały omówione (i) ogólnie macierz zewnątrzkomórkowa i jej rola w układzie nerwowym i jego plastyczności oraz (ii) bardziej szczegółowo rodzina proteaz MMP. Wstęp został napisany w sposób ciekawy i co ważne prosty oraz zrozumiały dla osób niebędących ekspertami w poszczególnych zagadnieniach. Osobiście, jako biolog komórki, szczególnie doceniam podrozdział dotyczący pomiarów elektrofizjologicznych i wagi poszczególnych miar dla wnioskowania o zmianach przewodnictwa synaptycznego. Inną zaletą jest analiza zarówno klasyki tematu jak i najnowszych publikacji dotyczących prowadzonych badań. W tym kontekście chciałbym zwrócić uwagę Doktoranta, iż w przypadku roli BDNF w regulacji ekspresji MMP-9 istnieje praca wcześniejsza od cytowanej przez niego i jest to praca Kuźniewskiej i wsp. (2012) z zespołu Prof. Leszka Kaczmarka.

Jeśli chodzi o uwagi krytyczne dotyczące wstępu to mam jedną uwagę ogólną i kilka szczegółowych. Przy tym część uwag szczegółowych jest konsekwencją podniesionego problemu ogólnego. W moim odczuciu Wstęp rozprawy jest nadmiernie rozbudowany i nie wszystkie omawiane w nim kwestie są bezpośrednio związane z uzyskanymi wynikami lub wyciągniętymi przez Doktoranta wnioskami. Jednocześnie nadmiar poruszanych wątków spowodował, iż niektóre z nich zostały omówione bardzo pobieżnie i nie koniecznie do końca zgodnie z aktualnym stanem wiedzy. Myślę, że dobrym przykładem jest opis roli proBDNF i jego receptora p75NTR w układzie nerwowym. Rzeczywiście podręcznikowa wiedza wskazuje, iż interakcja proBDNF z tym receptorem jest sygnałem proapoptycznym. Niemniej obecnie wiadomo także, iż proBDNF ma także znaczenie w plastyczności neuronalnej. Na przykład w skrawkach hipokampów myszy, u których proBDNF nie może ulec proteolizie wykazano obniżoną transmisję synaptyczną i zaburzenia w liczbie kolców dendrytycznych (Yang i wsp. 2014). A zatem, brak odpowiedniego poziomu proteolizy proBDNF może mieć bezpośredni wpływ na plastyczność i myślę, że warto było akurat to zagadnienie omówić dogłębniej. Z rzeczy drobnych to, chociaż kwestia jest otwarta, myślę, iż nie powinno się łączyć PSD-95 oraz SynGAP w nieistniejącą grupę białek platformowych. PSD-95, PICK GRIP1/2 to białka szkieletowe lub adaptorowe gęstości postsynaptycznej a ich główną funkcją jest łączenie receptorów z dużą grupą białek efektorowych. Z kolei, SynGAP jest jednym z białek efektorowych a jego funkcją jest regulacja cyklu GTPazowego małej GTPazy Ras. Na koniec nie bardzo jest dla mnie jasne, co Doktorant miał na myśli pisząc o ADAM10 i ADAM17, jako o proteazach neuronalnych. Sugeruje to ich wyłączone działanie w układzie nerwowym, co nie jest zgodne z prawdą (<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ADAM10ID44397ch15q21.html>; <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ADAM17ID572ch2p25.html>).



INTERNATIONAL INSTITUTE OF MOLECULAR AND CELL BIOLOGY IN WARSAW

CENTRE OF EXCELLENCE IN MOLECULAR BIO-MEDICINE

Materiały i Metody. Wszystkie metody niezbędne do realizacji założonych celów zostały w mojej ocenie prawidłowo dobrane i opisane w sposób wystarczający do powtórzenia wykonanych procedur przez osoby dysponujące odpowiednim doświadczeniem i umiejętnościami. Na szczególne podkreślenie oraz pochwałę zasługują przede wszystkim (i) wykorzystanie kilku modeli badawczych do testowania postawionych hipotez (związki farmakologiczne oraz zwierzęta modyfikowane genetycznie) (ii) budzący podziw warsztat elektrofizjologiczny Doktoranta i (iii) wykorzystanie metod biochemicznych i mikroskopowych w celu lepszego zrozumienia molekularnego podłoża badanych zjawisk fizjologicznych. W tym kontekście warto też podkreślić, iż Doktorant musiał opracować/dopracować na potrzeby swoich badań nowy sposób zymografii *in situ*, co samo w sobie stanowi poważne wyzwanie metodologiczne. Mam dwa drobne zastrzeżenia do tej części rozprawy. Na str. 62 w opisie składu sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego Doktorant zapomniał podać jednostki. Natomiast na str. 68 Autor dokonał dość znacznego skrótu myślowego opisując technikę zymografii żelowej, pisząc, iż służy ona do ilościowej analizy aktywności proteaz w homogenacie danej tkanki. Pozwalam sobie skomentować to stwierdzenie, ponieważ, jako edytor i recenzent prac naukowych kilkakrotnie miałem okazję być świadkiem jak irytuje ono biochemików. Otóż zymografia żelowa pozwala w sposób ilościowy określić poziom aktywnej formy danej proteazy w odpowiednio przygotowanym żelu poliakrylamidowym. Nie mierzy ona natomiast bezpośrednio aktywności enzymu a o ilości aktywnego enzymu w homogenacie wnioskuje się tylko w sposób pośredni.

Wyniki. Pierwsza, najobszerniejsza część wyników skupia się na określeniu roli MMP-9 w podstawowej transmisji i plastyczności synaptycznej w projekcji MF-CA3. W serii eleganckich doświadczeń z wykorzystaniem środków farmakologicznych, egzogennych oczyszczonych białek oraz modeli genetycznych Doktorat bezspornie wykazał, iż MMP-9 jest konieczne dla prawidłowego LTP w tej projekcji. Opisał również nowy rodzaj LTP, mmp9-LTP, które można wywołać w tej projekcji podaniem oczyszczonego białka MMP-9. Ponadto, Doktorant wykazał, że indukcja LTP w projekcji MF-CA3 prowadzi do wzrostu produkcji i aktywności MMP-9 w tym obszarze. Dodatkowo, Autor zbadał dwa potencjalne efekторы aktywności MMP-9, kompleks efryny B i jej receptora oraz β -dystroglikan, jednak nie wykazał ich potencjalnego zaangażowania w indukcję LTP zależną od MMP-9, w projekcji MF-CA3. Należy podkreślić, iż wykonane przez Doktoranta doświadczenia są bardzo wymagające technicznie. Przeprowadzono wiele kontroli dodatkowo uwiarygodniających wyniki. Nie mam wątpliwości, iż są to badania odpowiadające najlepszym światowym standardom. W mojej ocenie jedyną słabą stroną tej części jest czasem zbyt pochopne pozytywne wnioskowanie. Na przykład w przypadku wykorzystania środków farmakologicznych do hamowania aktywności różnych grup metaloproteinaz (Podrozdział 3.1.1) nie sprawdzono, czy rzeczywiście różne dawki, wpływające w różnicujący sposób na poziom LTP, istotnie w sposób różnicujący hamowały różne metaloproteinazy. A moim zdaniem było to konieczne do wyciągnięcia wniosków, które przedstawił Doktorant. Na przykład, różnica pomiędzy stosowaną dawką 10 μ M SB-3CT a Kd dla MMP-3 (15 μ M) jest z punktu farmakologii dość zaniedbywalna. Nie rozumiem też wniosku Doktoranta na stronie 73, iż brak wpływu FN-439 w stężeniu 25 μ M na rozmiar LTP MF-CA3 dowodzi braku uczestnictwa MMP-3 w mechanizmach indukcji LTP w synapsach MF-CA3. W zasadzie w tym stężeniu ten związek nie powinien mieć wpływu na MMP-3 za to brak efektu można dużo prościej wyjaśnić słabszym hamowaniem MMP-9. Jednak wyniki farmakologiczne z tej części być może nie są aż tak kluczowe, gdyż ostateczny wniosek wyciągnięty przez Doktoranta, co do udziału MMP-9 został potwierdzony przy użyciu modeli genetycznych (w dalszej części podrozdziału 3.1.1) a co do braku zaangażowania MMP-3



INTERNATIONAL INSTITUTE OF MOLECULAR AND CELL BIOLOGY IN WARSAW

CENTRE OF EXCELLENCE IN MOLECULAR BIO-MEDICINE

po zastosowaniu bardziej specyficznych inhibitorów (podrozdział 3.3.1). Jeśli chodzi o podrozdział 3.1.1 to mam jeszcze zastrzeżenie, co do wnioskowania na temat kolokalizacji aktywności żelatynolitycznej z synaptoporyną w skrawkach mózgu. Ja osobiście miałem problem z dostrzeżeniem takowej pomimo, iż podpis pod ryciną sugerował zwrócenie na nią uwagi. Wydaje się, że tego typu analizę powinno się jednak opierać na rekonstrukcjach 3D wysokorozdzielczych obrazów mikroskopowych a ponadto tego typu stwierdzenia powinny być poparte analizą ilościową z odpowiednią analizą statystyczną. Prace profesora Wilczyńskiego mogą stanowić tu niedościgniony wzór.

W drugim podrozdziale Wyników (3.2) Doktorant skupił się na analizie wpływu MMP-9 w projekcji CA3-CA1 z wykorzystaniem odpowiednich narzędzi. Z jednej strony było to związane z chęcią porównania tych dwóch projekcji w badaniach przeprowadzonych przez jednego badacza w tych samych warunkach laboratoryjnych jak i odniesieniem się do wcześniejszych doniesień przy wykorzystaniu wszystkich dostępnych narzędzi.

Na szczególną uwagę zasługuje natomiast podrozdział 3.3, w którym Doktorant skupił się na porównaniu zależności różnych projekcji od aktywności/obecności MMP-3. Wykazał on, że MMP-3 reguluje LTP w projekcji CA3-CA1 ale nie MF-CA3. Co więcej wskazał, iż MMP-3 jest istotne dla plastyczności zależnej od kanałów wapniowych typu L. Podobnie jak w przypadku podrozdziału 1.1 Wyników są to badania nowatorskie przeprowadzone przy użyciu nowoczesnych narzędzi i na najlepszym poziomie. Moje jedyne zastrzeżenie jest takie, że warto było się pokusić o potwierdzenie braku udziału MMP-3 w LTP w projekcji MF-CA3 również z wykorzystaniem myszy pozbawionej genu *mmp-3*. Nadałoby to dodatkowej elegancji zaprezentowanym wynikom i na pewno wzmocniłoby wnioski wyciągnięte przez Doktoranta.

Dyskusja jest napisana bardzo sprawnie, wciąga czytelnika i omawia najważniejsze i najoryginalniejsze z poczynionych obserwacji. Moją szczególną uwagę zwróciła postawiona przez Doktoranta hipoteza, iż proteoliza wydzielanego presynaptycznie proBDNF przez produkowaną postsynaptycznie MMP-9 może stanowić nowy rodzaj tzw. detektora koincydencji w plastyczności. Wymagałoby to jednak np. bezspornego wykluczenia produkcji i wydzielania proBDNF postsynaptycznie i autokrynnego działania BDNF. A spór wciąż trwa, jest coraz bardziej intensywny i najprawdopodobniej najbliższe lata nie doprowadzą do jego ostatecznego rozwiązania. Pomimo, mojej pozytywnej oceny dyskusji chciałbym jednak zwrócić uwagę na jedno miejsce, w którym zastosowano wnioskowanie na wyrost. Na stronie 140 Doktorant opisuje przykłady zastosowania poziomu MMP-9 w różnych tkankach, jako markerów pewnych stanów patologicznych. Na podstawie tych przykładów stwierdza, iż „potwierdzają one bezpośrednio hipotezę mówiącą, iż poziom obwodowej lub mózgowej MMP-9 wpływa na zdolności kognitywne”. Pozwolę sobie nie zgodzić się z tym stwierdzeniem. Prace, o których mowa stwierdzają tylko korelację zwiększonego poziomu MMP-9 lub jej aktywnej formy z danym stanem klinicznym. Są to obserwacje ważne, ale na ich podstawie nie można wyciągać bezpośrednich wniosków przyczynowo-skutkowych.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest przygotowana bardzo starannie. Została napisana poprawnym językiem i w bardzo przejrzysty sposób. Jak w większości tak długich tekstów, które do tej pory miałem szanse oceniać, także Doktorantowi nie udało się uniknąć drobnych pomyłek oraz błędów literowych, które jednak nie przeszkadzają w zrozumieniu tekstu i których nie będę



INTERNATIONAL INSTITUTE OF MOLECULAR AND CELL BIOLOGY IN WARSAW

CENTRE OF EXCELLENCE IN MOLECULAR BIO-MEDICINE

cytować. Wspomnę tylko o paru niedoskonałościach, których warto byłoby unikać w przyszłości, tak w tekstach naukowych jak i w nauczaniu kolejnych pokoleń młodych naukowców.

1. W poprawnym naukowym języku polskim modyfikacje białek są potranslacyjne, nie posttranslacyjne,
2. Pomimo, iż często używamy w codzienności laboratoryjnej sformułowania akrilamid, to poprawna nazwa po polsku to akryloamid,
3. Choć sam osobiście bardzo tego żałuję, w poprawnej polszczyźnie naukowej, tylko geny mogą ulegać ekspresji lub nadekspresji. Białka są produkowane lub nadprodukowane.
4. Sugerowałbym w przyszłości unikanie bezpośrednich tłumaczeń z języka angielskiego lub kalek językowych bez wcześniejszego sprawdzenia poprawności takiego tłumaczenia. Na przykład słowo okłudować, którego Doktorant używa nagminnie w rozprawie, wg słownika wyrazów obcych oznacza: zatrzymać substancje obce, zwłaszcza gazy i ciecze lub łączenie się frontów atmosferycznych. Wątpię, iż oto Autorowi chodziło. Z kolei, ROI tłumaczy się raczej, jako obszar zainteresowania lub obszar analizy, niż interesujący obszar.

Warto podkreślić, iż rozprawa została zilustrowana licznymi schematami i tabelami ułatwiającymi zrozumienie poruszanych zagadnień z zakresu neuroanatomii, elektrofizjologii oraz biologii molekularnej synaps i macierzy zewnątrzkomórkowej. Z kolei, wyniki są zilustrowane licznymi przejrzystymi rycinami.

Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pana mgr Grzegorza Wiery spełnia wymagania określone odpowiednimi przepisami. Wyniki zostały uzyskane za pomocą adekwatnych metod i przyczyniły się do poszerzenia naszej wiedzy na temat roli metaloproteinaz z rodziny MMP w plastyczności neuronalnej. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr Grzegorza Wiery do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wysoką jakość i znaczenie poznawcze uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. Jacek Jaworski