

Dr. hab. Katarzyna Kalita-Bykowska
Laboratorium Neurobiologii
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, Warszawa, Polska

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Chmielewskiej pt. „Regulacja ekspresji neuroligin w synapsie w warunkach fizjologicznych i w zespole łamliwego chromosomu X”

Praca została wykonana pod kierunkiem Pani dr. hab. Magdaleny Dziembowskiej w Pracowni Molekularnych Podstaw Plastyczności Synaptycznej w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Synapsa jest to miejsce, w których następuje komunikacja pomiędzy błoną aksonu jednej komórki, zwaną częścią presynaptyczną, a dendrytem drugiej komórki zwaną częścią postsynaptyczną. Utrzymanie prawidłowych połączeń synaptycznych zależy między innymi od obecności białek adhezyjnych, łączących fizycznie obie części synapsy. Neuroliginy (NLGN) to cząsteczki adhezyjne zlokalizowane po postsynaptycznej stronie synapsy, które oddziałują ze swoimi presynaptycznymi partnerami neureksynami w celu utrzymania połączenia transsynaptycznego. Zaburzenia w poziomie białek NLGN korelują z występowaniem zaburzeń ze spektrum autyzmu. Podjęcie badań zmierzających do lepszego poznania molekularnych mechanizmów regulujących poziom neuroligin na synapsie w mózgu w warunkach fizjologicznych oraz w zwierzęcym modelu syndromicznych zaburzeń ze spektrum autyzmu, jakim jest zespół łamliwego chromosomu X (FXS), jest w pełni uzasadnione.

Praca ma typową strukturę prac doktorskich. Składa się ze Wstępu, Materiałów i Metod, Wyników oraz krótkiej Dyskusji. Jako osobne rozdziały zostały wydzielone Założenia i cel pracy oraz Wnioski. Praca zawiera wymagane streszczenie w języku angielskim i polskim. Bibliografia składa się z ponad 300 pozycji. Praca jest ogólnie dobrze napisana, dlatego czytelnik nie ma problemu z jej śledzeniem.

Wstęp stanowi najobszerniejszą część pracy (41 stron). Zawiera on podstawowe informacje o budowie neuronów i synaps oraz omówienie roli białek neuroligin. Ponadto szczegółowo opisano

charakterystykę zaburzeń ze spektrum autyzmu, w tym także zespołu łamliwego chromosomu X. Całość stanowi dobry materiał do zrozumienia założeń i celu pracy. Jednak nie jest zrozumiałe, dlaczego we wstępie znajduje się opis dotyczący udziału proteolitycznych fragmentów białek neuroligin w rozwoju nowotworów, skoro wątek rozwoju nowotworów nie był badany w pracy doktorskiej.

Część **Materiały i Metody** jest zwięzłym spisem zastosowanych metod badawczych oraz użytych materiałów. W części o hybrydyzacji *in situ*, nie podano długości użytych sond. Informacja ta pojawia się dopiero w rozdziale Wyniki. W części Analiza Statystyczna jest stwierdzenie „*Wszystkie dane na wykresach podano jako wartości średnie +/- błąd standardowy średniej (SEM) z technicznych powtórzeń niezależnych eksperymentów lub myszy*”. Bardzo proszę o wyjaśnienie pojęcia „technicznych”. Do analiz statystycznych powinny być brane powtórzenia biologiczne. Czy w opisie wkraść się błąd edytorski?

Wyniki są dobrze opisane, a doświadczenia starannie zaplanowane. W pracy zastosowano dwa modele badawcze: biochemiczne preparaty synaptoneurosomów izolowane z mózgu myszy zwane „*synapsami in vitro*” oraz pierwotne hodowle neuronów hipokampalnych. W pierwszej części pracy doktorskiej Autorka weryfikowała hipotezę, że białko FMRP, reguluje lokalną translację neuroligin. Używając preparatów synaptoneurosomów izolowanych z hipokampa i fragmentu kory mózgowej (tu brak informacji jaki rodzaj kory był badany) myszy o fenotypie dzikim i mutantów pozbawionych białka FMRP (*Fmr1* KO), pokazała wzrost poziomu białka dla NLG1 i NGL3 przy braku ekspresji FMRP. Porównanie poziomu ekspresji neuroligin doktorantka przeprowadziła także w pierwotnych hodowlach neuronów, potwierdzając wzrost ekspresji NLG1 i NGL3, a nie NLG2 w komórkach pochodzących z myszy *Fmr1* KO. Autorka zbadała również poziom mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* we frakcji synaptoneurosomów, potwierdzając, że obserwowane zmiany w poziomie białek są prawdopodobnie wynikiem zwiększonej translacji w neuronach pozbawionych FMRP, a nie podwyższonej transkrypcji genów. W kolejnym etapie badań doktorantka badała oddziaływanie białka FMRP z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* przy użyciu metody współwytrącania RNA z białkami. Używając frakcji synaptoneurosomów pokazała, że białko FMRP oddziałuje z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3*. Dodatkowo używając metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) i immunodetekcji autorka pokazała częściowe współwystępowanie granul RNA z białkiem FMRP.

W pracy brakuje jednak ilościowego przedstawienia procentu kolokoalizacji obu sygnałów. Nie znalazłam także informacji, ile razy ten eksperyment był powtarzany.

W drugiej części pracy Autorka badała zmiany poziomu powierzchniowych białek neuroligin po stymulacji NMDA lub glutaminianem. Analizy prowadziła używając frakcji synaptoneurosomów izolowanych z myszy kontrolnych i myszy *Fmr1* KO oraz hodowli pierwotnych stosując metody sieciowania. Otrzymane wyniki wskazują, że poziom białka NLG1 i NGL3, a nie NLG2 jest podwyższony w stanie podstawowym na powierzchni neuronów pochodzących ze zwierząt pozbawionych białka FMRP. Jest to wynik zgodny z tym co autorka przedstawiła w pierwszej części rozprawy. Wzrost poziomu białka NLG1 i NGL3 w synaptoneurosomach koreluje zatem ze wzrostem ich poziomu na synapsach w neuronach pochodzących od myszy *Fmr1* KO. Co ciekawe autorka także zauważyła, że krótka, 2,5 minutowa, stymulacja synaptyczna powoduje znaczny spadek poziomu białek powierzchniowych neuroligin, i pojawienie się C-końcowego produktu cięcia proteolitycznego dla wszystkich form neuroligin NLGN1 (26 kDa), NLGN2 (20 kDa) i NLGN3 (26kDa). Aby zidentyfikować proteazy odpowiedzialne za cięcie neuroligin, Autorka użyła znanych inhibitorów proteaz zewnątrzkomórkowych, takich jak GM6001 (ogólny inhibitor metaloproteinaz) i Inh. I (inhibitor MMP-9/13i) oraz zwierząt pozbawionych ekspresji proteiny MMP-9 (*Mmp-9* KO). Otrzymane wyniki wskazują, że proteolityczne cięcie neuroligin jest hamowane w obecności inhibitora MMP-9/13. Nie wykazano jednak różnic w poziomie cięcia NLGN1, NLGN2 i NGLN3 w synaptoneurosomach z myszy *Mmp-9* KO, co może oznaczać udział MMP-13, a nie MMP-9 w obserwowanej po stymulacji neuronalnej proteolizie. W pracy nie znalazłam informacji, dlaczego hamowanie cięcia NLGN1 i NLGN2 testowano tylko w obecności Inh. I, a nie GM6001. Nie jasne jest również zdanie ze strony 139 „Na podstawie otrzymanych wyników można **niejednoznacznie stwierdzić**, że proteaza MMP-9 i/lub MMP-13 ma udział w cięciu wszystkich izoform neuroligin....”, oraz stwierdzenie ze strony 140 „Ten wynik sugeruje, że w obróbce proteolitycznej neuroligin **poza enzymem MMP-9 bierze udział inna proteaza**”. Przedstawione w rozprawie wyniki wskazują, że MMP-9, nie bierze udziału w cięciu proteolitycznym neuroligin.

Chciałabym także zwrócić uwagę, że część doświadczeń przedstawiona w pracy nie była poddana analizie densytometrycznej i statystycznej, mimo iż na rycinach jest informacja, że przedstawione są przykładowe skany z kilku „*niezależnie przeprowadzonych eksperymentów*”. Brak ten, utrudnia ocenę przedstawionych wyników i ich interpretację, gdyż obserwowane zmiany są

często subtelne. Uwaga moja dotyczy wyników przedstawionych na rycinach: 30, 46, 49, 51 i 52. Mimo zamieszczenia kilku uwag krytycznych w recenzji, pracę doświadczalną oceniam pozytywnie.

Dyskusja pracy jest krótka i zaczyna się od informacji, które były opisane przez doktorantkę we wstępie. Moim zdaniem podrozdział z Wyników (4.6. Podsumowanie uzyskanych wyników) powinien rozpoczynać rozdział Dyskusja. W ogólnej ocenie merytorycznej pracy chciałabym podkreślić, że doktorantka potrafi właściwie zaplanować eksperymenty i zastosować odpowiednie techniki do ich wykonania. Ponadto umie prawidłowo zinterpretować dane eksperymentalne, porównać z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy, oraz zaproponować prawdopodobny mechanizm badanych zjawisk.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca mgr Joanny Chmielewskiej spełnia wszystkie warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. z poprawkami wprowadzonymi Ustawą z dnia 18 marca 2011 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz.882). Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM w Warszawie o dopuszczenie mgr Joanny Chmielewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wniosek o nadanie jej stopnia naukowego doktora.

Dr. hab. Katarzyna Kalita-Bykowska



Instytut Nenckiego PAN