



dr hab. Agnieszka Gizak, prof. UWr

Wrocław, 23.06.2022

OCENA**Rozprawy doktorskiej mgr Ewy Banach****pt. Rola kinazy syntazy glikogenu - 3 β w funkcjonowaniu synaps pobudzających**

Praca doktorska mgr Ewy Banach pt. „Rola kinazy syntazy glikogenu - 3 β w funkcjonowaniu synaps pobudzających” wykonana została pod opieką promotorki dr hab. Joanny Urban-Ciećko i promotora pomocniczego dr Tomasza Jaworskiego, w jednostkach Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, we współpracy z Zakładem Genetyki w Psychiatrii oraz Pracownią Badań Molekularnych i Komórkowych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Takie afiliacje są w zasadzie gwarancją rzetelnie wykonanych badań naukowych.

I faktycznie, Rozprawa przedstawia wyniki niezwykle interesujących badań na modelu mysim, których celem było zbadanie wpływu konstytutywnej aktywności GSK-3 β na morfologię kolców dendrytycznych, pobudzające przekazywanie synaptyczne oraz na poziom ekspresji mikroRNA w neuronach hipokampa. A wszystko to w kontekście udokumentowanego w literaturze naukowej udziału GSK-3 β oraz cząsteczek mikroRNA w powstawaniu chorób neurodegeneracyjnych i zaburzeń psychicznych. Zatem podjęty w rozprawie temat jest istotny nie tylko z punktu widzenia ludzkiej „ciekawości naukowej”, ale także z punktu widzenia zdrowia publicznego.

Rozprawa składa się z dziewięciu numerowanych rozdziałów, poprzedzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim. Nieco nietypowo, rozdziałem nr 1 jest „Wykaz skrótów”, który zwykle jest częścią nienumerowaną. Kolejne rozdziały to „Wprowadzenie”, „Hipotezy i cele”, „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Podsumowanie wyników i



wnioski”, „Bibliografia” oraz „Suplement”.

Rozprawa jest zwięzła, a przy tym treściwa i napisana przejrzysto, chociaż nie jest wolna od potknięć językowych i stylistycznych (o czym później).

Autorka Rozprawy stawia trzy jasno brzmiące hipotezy:

- 1) wzmożona aktywność GSK-3 β w komórkach nerwowych hipokampa zaburza strukturę i funkcjonowanie synaps pobudzających;
- 2) wzmożona aktywność GSK-3 β w komórkach nerwowych hipokampa wpływa na ekspresję miRNA;
- 3) zmieniona ekspresja miR-221* wpływa na strukturę i funkcję synaps pobudzających w hipokampie.

Rozdział „Wprowadzenie” jest dość krótki, jednak zawiera wszystkie informacje niezbędne do nakreślenia kontekstu pracy. Rozdział „Materiały i metody” jest za to bardzo szczegółowy, co uważam za właściwe, gdyż jednym z jego zadań jest przecież umożliwienie innym badaczom dokładnego powtórzenia przeprowadzonych eksperymentów. Dodatkowo, obrazuje on bogaty warsztat eksperymentalny i analityczny Doktorantki.

Rozdział „Wyniki” Autorka Rozprawy ilustruje bogato rycinami i tabelami i w sposób logiczny przedstawia tam kolejne etapy swojej pracy oraz ich efekty.

Podsumowując krótko owe efekty, w trakcie swoich badań Doktorantka wykazała, że:

- 1) wzmożona aktywność GSK-3 β zmienia morfologię kolców dendrytycznych prowadząc do zwiększenia liczby kolców niedojrzałych. Wiąże się to z obniżeniem pobudzającego przekazywania synaptycznego, co wynika prawdopodobnie ze zmiany stabilności receptorów AMPA w błonie synapsy.
- 2) GSK-3 β reguluje poziom ekspresji kilkudziesięciu dojrzałych i niedojrzałych miRNA w hipokampie, obniżając poziom ich ekspresji większości z nich, w tym miR-221*;
- 3) obniżenie poziomu ekspresji miR-221* nie wpływa na strukturę synaps pobudzających, jednak powoduje wzmocnienie pobudzającego przekazywania synaptycznego, prawdopodobnie poprzez mechanizmy postsynaptyczne.



W syntetycznej „Dyskusji” Autorka podsumowuje uzyskane wyniki na tle istniejącego piśmiennictwa dot. związków między aktywnością GSK-3 β i objawami zaburzeń psychicznych oraz pomiędzy poziomem ekspresji mikroRNA a strukturą i funkcją synaps. Sugeruje też możliwe mechanizmy molekularne obserwowanych przez Nią zjawisk.

Po „Dyskusji” znajduje się krótki, ale bardzo wygodny dla czytelnika i recenzenta, rozdział „Podsumowanie wyników i wnioski”. Po następnym w kolejności rozdziale „Bibliografia” (ze 194 pozycjami literatury naukowej) znajduje się „Suplement” zawierający wykaz opublikowanych przez Autorkę Rozprawy prac naukowych.

Mgr Ewa Banach jest pierwszą (i korespondencyjną) autorką w pięciu pracach naukowych i współautorką w kolejnych trzech, co świadczy o jej głębokiej wiedzy eksperckiej i zaangażowaniu w pracę naukową. Dwie z wymienionych publikacji (jedna „w recenzji” w momencie składania Rozprawy) zawierają wyniki przedstawione w Rozprawie Doktorskiej, co dodatkowo podkreśla wagę tych wyników.

Zadaniem recenzenta jest jednak nie tylko podkreślanie wartości pracy, lecz także wskazywanie uchybień i błędów. Dlatego mam kilka uwag do rozprawy. Są to głównie (choć nie tylko) uwagi natury edytorskiej.

W trakcie pisania Rozprawy dość trudno jest uniknąć niebyt zgrabnych konstrukcji literackich i taką niezgrabnością jest np. określenie „wyznakowany fluorescencyjnie barwnik FAM488” (str. 46), „tabela podsumowująca sumę” (str. 59), „potencjał utrzymywano w -60 mV” (str. 30), czy pisanie o „hodowli komórkowej wykonanej z komórek pochodzących od myszy” (str. 4). FAM488 jest barwnikiem fluorescencyjnym, nie wymaga więc dalszego „znakowania”, potencjał można „utrzymywać” w poprzek błony komórkowej, nie w mV, a hodowle komórkowe się wyprowadza. Autorka rozprawy pisze też na str. 17 (wszystkie wyróżnienia w tekście pochodzą od recenzenta): „Pierwszym *dowodem, potwierdzającym istotną rolę* potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów przez miRNA w CHAI *były badania* ekspresji genów (...)”. Jeśli badania są tu dowodem, to najwyżej dowodem zainteresowania tematem, a nie potwierdzeniem istotnej roli zjawiska budzącego to zainteresowanie. Dowodem mogą być wyniki tychże badań, a i wówczas należałoby raczej napisać o przesłance. Natomiast w



„Dyskusji” (str. 77) Autorka Rozprawy napisała: „Naszym celem było *wykazanie*, czy takie zmiany morfologii kolców dendrytycznych mogą wywołać zmiany funkcjonalne...”. Właściwszym słowem byłoby tu *sprawdzenie* lub *zbadanie*.

Na stronie 18 jest mowa o genach, które są targetem, co uważam za niepotrzebną kalkę językową, zważywszy na istnienie polskiego słowa „cel”.

W Rozprawie można też znaleźć literówki i błędy gramatyczne, których nie będę tu wymieniać.

Na stronie 52 można przeczytać, iż: „porównano pobudzające przekąźnictwo synaptyczne między myszami WT a GSK3- β [S9A]”, co prowokuje do żartobliwego zapytania o technikę łączenia myszy za pośrednictwem synaps.

W Rozprawie można też znaleźć zdania, których konstrukcję Autorka najwyraźniej kilkakrotnie zmieniała i nie usunęła wszystkich „naddatków”: „rodzeństwem nietransgenicznym rodzeństwem” (str. 60), „procentowy wzrost procentowy kolców” (str. 72), czy zdanie o myszy, która „posiada modyfikowany gen GSK3- β pod promotorem.” (str. 50).

Skrót SynGAP (str. 7) został nieprawidłowo wyjaśniony jako „GTPaza synaptycznego białka Ras”, gdy tymczasem jest to białko aktywujące synaptyczną GTPazę Ras.

Nie wszystkie pozycje literaturowe cytowane w pracy są ujęte w spisie literatury. Np. praca Cheng i wsp., 2014 (cytowana np. na stronie 47) nie występuje w spisie literatury.

Rycina 19 na stronie 67 ma przedstawiać wybrane, dojrzałe miRNA z największą i najsilniejszą statystycznie różnicą w poziomie ekspresji. Zabrakło jednak mmu-miR-185-3p, którego poziom ekspresji rośnie najbardziej i istotnie.

Na stronie 70, w podrozdziale „Wybór stężenia inhibitora miR-221* do dalszych badań”, w tekście mowa jest o stężeniach pikomolowych, natomiast na wykresie przedstawiono efekty działania stężeń nanomolowych (co zaznaczone jest dwukrotnie: w opisie osi X i w legendzie do wykresu).

Rycina 22 umieszczona na kolejnej stronie ma ilustrować efekty wnikania różnych stężeń inhibitora miR-221* wyznakowanego FAM488 do komórek. Na podstawie wyników tego doświadczenia, do dalszych eksperymentów wytypowano 5-pikomolowe stężenie tego inhibitora. Jednak na podstawie obserwacji zdjęć z ryciny 22 trudno jest zrozumieć ten wybór:



przy takim stężeniu komórki wydają się być pozbawione inhibitora i właściwszym wydawać się może wybór stężenia 25-pM (a na pewno > 5 pM, a < 25 pM).

Mam kilka pytań do Autorki rozprawy.

1. W rozdziale Dyskusja, na str. 79, pisze ona: „Jako neuronalny *efektor* działania GSK-3 β została wskazana kinaza fosfatydyloinozytolu 4 typu II α (PI4KII α)”, oznacza to działanie GSK-3 β *za pośrednictwem* kinazy fosfatydyloinozytolu; jednak nieco niżej na tej samej stronie Autorka pisze: „Ta obserwacja sugeruje, że PI4KII α za pośrednictwem GSK-3 β może prowadzić do stabilizacji w błonie receptorów NMDA” (cytując w obu przypadkach tę samą publikację – Amici i wsp., 2020). Która wersja jest zatem właściwa?
2. Mechanizm obniżenia poziomu ekspresji miRNA poprzez inhibicję GSK-3 β w komórkach nie-neuronalnych wydaje się być znany. Czy Autorka może zaproponować mechanizm, za pośrednictwem którego zwiększenie aktywności GSK-3 β doprowadza do obniżenia poziomu ekspresji większości miRNA w neuronach? Dlaczego poziom pewnych miRNA (miR-185-3p) się wówczas znacząco zwiększa?
3. Zgodnie z uzyskanymi wynikami, nadmierna aktywność GSK-3 β obniża przekąźnictwo pobudzające, a nadekspresja GSK-3 β obniża poziom miR-221* w komórce. Jednocześnie obniżenie poziomu miR-221* wzmacnia pobudzające przekąźnictwo synaptyczne. Jak to pogodzić?
4. Czy Autorka planuje badania wpływu miR-221* na poziom podjednostek receptora AMPA i NMDA? Wydaje się to być naturalną konsekwencją uzyskanych wyników, jak i przemyśleń Autorki. Poza tym w rozdziale „Hipotezy i cele” wspomina ona od „dalekosiężnym” celu pracy – wyjaśnieniu roli GSK-3 β w plastyczności synaptycznej. Można mieć zatem nadzieję, że praca będzie kontynuowana.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Ewy Banach jako bardzo ciekawą i jasno napisaną, a drobne uwagi, dotyczące głównie strony edytorskiej, nie obniżają oceny całości rozprawy. Nie mam wątpliwości, że odkrycia Doktorantki wnoszą istotny wkład do naszej wiedzy dotyczącej udziału GSK-3 β oraz mikroRNA w regulacji funkcjonowania synaps



WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁADY WNB

ZAKŁAD FIZJOLOGII I NEUROBIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. H. Sienkiewicza 21

50-335 Wrocław

tel. +48 71 375 40 56 | +48 71 375 40 53

zfnm@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

pobudzających. Pokazują także jak skomplikowana jest rola tej kinazy i jak trudnym, jeśli nie niemożliwym na bieżącym poziomie rozwoju technik badawczych, zadaniem będzie uzyskanie całkowitego obrazu działania GSK-3 β w komórkach.

Stwierdzam zatem, że recenzowana Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630), stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, PAN o dopuszczenie Pani mgr Ewy Banach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

Dr hab. Agnieszka Gizak, prof. UWr

Prof. dr hab. Grzegorz Hess

Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

Wydział Biologii

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Kraków, 23.06.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Banach

pt. Rola kinazy syntazy glikogenu - 3 β w funkcjonowaniu synaps pobudzających

Niedawno odkrytym, ważnym czynnikiem wywierającym modulujący, długotrwały wpływ na przekaznictwo synaptyczne, jest mikroRNA, będący rodzajem niekodującego RNA o długości 18-24 nukleotydów, który uczestniczy w regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. Wykazano, że w układzie nerwowym różne rodzaje mikroRNA mogą regulować procesy synaptogenezy i plastyczności synaptycznej, lecz obecna wiedza na ten temat jest jeszcze bardzo ograniczona. Co istotne, uważa się, że zaburzenia funkcji mikroRNA mogą grać rolę w patofizjologii chorób układu nerwowego.

W przedstawionej rozprawie doktorantka postanowiła zweryfikować hipotezę, według której obecność konstytutywnie aktywnej formy kinazy syntazy glikogenu-3 β (GSK-3 β) w mózgu myszy wiąże się ze zmianami poziomu ekspresji mikroRNA, a także zbadać, jakie są konsekwencje tych efektów dla struktury i funkcji połączeń synaptycznych w hipokampie. Myszy transgeniczne z nadekspresją kinazy GSK-3 β stanowią model zwierzęcy choroby dwubiegunowej. W mojej opinii tak postawiony problem badawczy jest trafny i aktualny. Uzyskanie odpowiedzi na postawione pytania wymagało zastosowania całego szeregu zróżnicowanych metod badawczych i przeprowadzenia trudnych eksperymentów.

Przedstawiona mi do oceny, licząca 104 strony, praca doktorska ma typowy układ edytorski. W krótkim, jedenastostronicowym wstępie, autorka zwięźle omawia zagadnienia związane z tematem pracy, a w tym kwestię synaps milczących, które cechuje brak funkcjonalnych receptorów AMPA, oraz podział kolców dendrytycznych a także przedstawia dane literaturowe na temat roli kinazy GSK-3 β w plastyczności synaptycznej i zaburzeniach psychicznych. Ze wstępu czytelnik uzyska również nieco informacji na temat mikroRNA oraz jego roli w plastyczności synaptycznej i zaburzeniach psychicznych. Ten rozdział pracy dowodzi posiadania przez doktorantkę szerokiej wiedzy w zakresie tematyki rozprawy, jednakże od wstępu do rozprawy doktorskiej oczekiwałbym przedstawienia szerszego tła podejmowanej pracy badawczej a nie odsyłania czytelnika do prac przeglądowych (str. 18).

Po wstępie, w tekście zamieszczono punkt pod nazwą „hipotezy i cele”, w którym precyzyjnie sformułowano zadania badawcze zrealizowane w ramach pracy doktorskiej. Bardzo szczegółowy opis zastosowanych materiałów i metod, wraz z ilustracjami i tabelami, zajmuje 30 stron. Uzyskane wyniki przedstawiono na 26 stronach, zawierających 16 rozbudowanych rycin i 3 tabele, a dyskusja zajmuje 8 stron. Obszerny spis piśmiennictwa liczy 194 pozycje.

Pani mgr Ewa Banach realizację swojego projektu badawczego rozpoczęła od analizy morfologii kolców dendrytycznych wybarwionych neuronów ziarnistych zakrętu zębatego stosowanych w doświadczeniach zwierząt, których genotyp określano przy pomocy metody PCR. Stwierdziła, że o ile porównanie ogólnej gęstości kolców u myszy typu dzikiego z myszami z ekspresją konstytutywnie aktywnej formy kinazy GSK-3 β nie wykazało różnicy, to u tych ostatnich znamienne większą frakcję stanowiły kolce długie, będące niedojrzałą formą tych struktur. W celu zbadania funkcjonalnych konsekwencji zaobserwowanego efektu, przeprowadziła następnie techniką *whole-cell* pomiary elektrofizjologiczne aktywności synaptycznej w skrawkach zakrętu zębatego *in vitro*, które pokazały, że myszy transgeniczne cechuje znamienne mniejsza częstotliwość miniaturowych pobudzających prądów postsynaptycznych (mEPSC) w porównaniu z myszami kontrolnymi, przy braku różnic w amplitudzie tych prądów. W kolejnej serii doświadczeń elektrofizjologicznych z zastosowaniem rejestracji prądów postsynaptycznych wywołanych stymulacją elektryczną drogi przeszywającej wykazała, że o ile u myszy typu dzikiego pula synaps milczących, które nie posiadają funkcjonalnych receptorów AMPA lecz wyłącznie NMDA, nie przekracza ok. 8%, to u myszy transgenicznych wielkość tej frakcji sięga 33%. Wyniki te przekonująco wskazują, że obecność nadaktywnej formy kinazy GSK-3 β wiąże się z upośledzeniem pobudzającego przekazywania synaptycznego w zakręcie zębatym u młodych, trzytygodniowych myszy, zarówno na poziomie strukturalnym, jak i funkcjonalnym.

Istotą następnego cyklu przeprowadzonych doświadczeń było określenie rodzajów mikroRNA, występujących w hipokampie myszy transgenicznych z konstytutywnie aktywną formą kinazy GSK-3 β oraz myszy typu dzikiego i porównanie poziomu ich ekspresji. W toku bardzo złożonej, wieloetapowej procedury tzw. sekwencjonowania nowej generacji otrzymano szereg produktów, spośród których wytypowano 14 rodzajów dojrzałego mikroRNA, wykazujących znaczące obniżenie poziomu ekspresji w hipokampie myszy transgenicznych, w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. W tej serii eksperymentów posłużono się zwierzętami pięciomiesięcznymi. Ostatecznie, po wykonaniu dodatkowej analizy metodą qPCR, do dalszych doświadczeń doktorantka wytypowała, jako najbardziej obiecujący, jeden z rodzajów mikroRNA, miR-221*, dla którego relatywna różnica ekspresji była największa.

Znaczenie miR-221* dla struktury i funkcji synaps pobudzających badała doktorantka w pierwotnych hodowlach prawidłowych neuronów hipokampa myszy. Hodowle transfekowano swoistym inhibitorem miR-221*, w stężeniu określonym na podstawie wyników badań wstępnych, a następnie analizowano kolce dendrytyczne wybarwionych neuronów, będących morfologicznie komórkami piramidowymi. Przy pomocy techniki elektrofizjologicznej rejestrowano ponadto miniaturowe EPSC z tych neuronów. Uzyskane wyniki wskazują, że w efekcie inhibicji miR-221* dochodzi do powiększenia amplitudy miniaturowych EPSC, przy

braku różnic w częstotliwości tych prądów. Równocześnie nie stwierdzono, aby inhibicja miR-221* prowadziła do zmian ilościowych w poszczególnych frakcjach kolców dendrytycznych. Obserwowany efekt ma więc charakter funkcjonalny, lecz nie strukturalny.

Przedstawioną rozprawę oceniam wysoko. Należy stwierdzić, że w trakcie jej realizacji doktorantka uzyskała interesujące, nowatorskie wyniki, posiadające duże znaczenie dla rozwoju badań nad rolą kinazy GSK-3 β w plastyczności synaptycznej w formacji hipokampa oraz związkiem pomiędzy aktywnością tej kinazy a poziomem mikroRNA w tkance. Postawiona hipoteza, zgodnie z którą obecność konstytutywnie aktywnej formy kinazy GSK-3 β w mózgu myszy koreluje ze zmianami poziomu ekspresji mikroRNA w hipokampie, okazała się prawdziwa. Ponadto doktorantka zbadała wpływ nadaktywności kinazy GSK-3 β oraz inhibicji jednego z rodzajów mikroRNA, miR-221*, na strukturę i funkcję synaps pobudzających. Pragnę podkreślić, że wyniki zaprezentowane w rozprawie zostały uzyskane w efekcie starannego przeprowadzenia całej serii bardzo trudnych i ogromnie zróżnicowanych doświadczeń. Świadczy to o doskonałym przygotowaniu metodycznym i dużych umiejętnościach doktorantki w zakresie warsztatu badawczego.

Zapoznanie się z zamieszczoną w rozprawie dyskusją pozostawia jednak pewien niedosyt, ponieważ doktorantka nie odnosi się w niej do kwestii odmiennych efektów elektrofizjologicznych, które zaobserwowała w przeprowadzonych dwóch seriach doświadczeń, tzn. z jednej strony osłabienia przekąźnictwa w preparatach uzyskanych z myszy z ekspresją konstytutywnie aktywnej formy kinazy GSK-3 β a z drugiej - nasilenia przekąźnictwa w hodowlach neuronów, w których zastosowała inhibicję miR-221*. Chciałbym poprosić o skomentowanie tej kwestii w trakcie obrony pracy doktorskiej. Czy jest możliwe, że różnica ta wynika z odmiennych mechanizmów plastyczności w zakręcie zębatym i hipokampie właściwym? Chciałbym także zapytać o przyczynę, dla której do doświadczeń z myszami transgenicznymi wybrano wyłącznie samice i to w różnym wieku. Z obowiązku recenzenta chciałbym również zwrócić uwagę na błędne opisy przebiegów, przedstawionych na ryc. 24A, a także, iż w tekście rozprawy doktorskiej należy unikać pisania w pierwszej osobie, a szczególnie w liczbie mnogiej (str. 76 i następne).

Wymienione uwagi mają jednak przede wszystkim charakter edytorski i nie obniżają mojej wysokiej oceny merytorycznej strony pracy. Biorąc pod uwagę powyższe, uważam że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczałnej im. Marcelego Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr Ewy Banach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Krzysztof Sobczak
Zakład Ekspresji Genów

Poznań, 18 sierpnia 2022

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Ewy Banach zatytułowanej „Rola kinazy syntazy glikogenu – 3β w funkcjonowaniu synaps pobudzających”

Niniejszą recenzję wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta przez Radę Naukową Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Oceny dokonałem według obowiązujących uregulowań prawnych na podstawie przekazanej mi rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska mgr Ewy Banach została wykonana w Pracowni Elektrofizjologii, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawskiego pod opieką merytoryczną dr hab. Joanny Urban-Ciećko, pełniącej funkcję promotora w przewodzie doktorskim, oraz dr Tomasza Jaworskiego, pełniącego funkcję promotora pomocniczego. Temat pracy doktorskiej wpisuje się w obszar badań prowadzonych od wielu lat z dużym sukcesem przez panią promotor, a związanych z poznawaniem mechanizmów komunikacji synaptycznej, przekazywania sygnału w sieci neuronalnej oraz plastyczności mózgu zachodzącej w wyniku uczenia się.

Szczególnym obiektem badań Doktorantki była kinaza syntazy glikogenu – 3b (GSK-3b), której funkcja w regulacji aktywności synaps nie została dotąd dobrze poznana. Poziom tego białka jest istotnie podwyższony w takich zaburzeniach jak schizofrenia czy choroba afektywna dwubiegunowa (CHAD), dlatego zasadnym jest postawienie sobie za cel badań wyjaśnienie roli konstytutywnej, nieprawidłowo wzmożonej, aktywności GSK-3b na morfologię kolców dendrytycznych oraz przewodnictwo synaptyczne, a także na konsekwencje tej nadmiarowej aktywności na kompozycję mikrotranskryptomu w zaburzonych neuronach. Te właśnie pytania stały się podstawą projektu doktorskiego mgr Ewy Banach.

Oceniana rozprawa doktorska składa się z trzech głównych części. Pierwszą stanowi relatywnie krótkie, liczące 10 stron, choć treściwe wprowadzenie omawiające istniejący stan wiedzy w zakresie tematyki projektu. Doktorantka opisuje mechanizmy kształtujące plastyczność synaptyczną, oraz rolę GSK-3b w stanach fizjologicznych i patologicznych, a także wyczerpująco omawia rolę mikroRNA (miRNA) w regulacji plastyczności i w zaburzeniach psychicznych. Część ta napisana jest w sposób kompetentny i informatywny, chociaż odczuwałem pewien niedosyt, zwłaszcza w pierwszej części wstępu, gdzie problem plastyczności mógłby być nieco szerzej opisany ponieważ w pełni nawiązuje do zasadniczego celu pracy.

Drugą część pracy stanowi bardzo konkretnie nakreślony cel badań, któremu towarzyszą właściwie postawione hipotezy. Trzecim, najobszerniejszym elementem rozprawy jest drobiazgowy opis zasadniczej części pracy, rozpoczynający się przedstawieniem metodyki badawczej, a kończący opisaniem i przedyskutowaniem uzyskanych wyników. Jest to tradycyjny układ rozprawy, który pozwala na logiczne wprowadzenie poszczególnych treści i prawidłową narrację.

Celem pierwszej części badań było określenie wpływu wzmożonej aktywności GSK-3b na zmiany w strukturze kolców dendrytycznych oraz właściwości komórek neuronalnych. Doktorantka wykorzystła model myszy GSK-3b[S9A] z mutacją pozbawiającą możliwości negatywnej regulacji aktywności białka na drodze fosforylacji. Badania mikroskopowe wykazały, że liczebność kolców dendrytycznych nie ulega zmianie, podczas gdy ich morfologia zmienia się w kierunku form wydłużonych w porównaniu do komórek myszy typu dzikiego. Z kolei badania elektrofizjologiczne komórek ziarnistych hipokampu pokazały różnice w pobudzającej transmisji synaptycznej, co sugeruje zmniejszoną liczbę funkcjonalnych synaps. Przypuszczenie to została potwierdzone w dalszych badaniach przez ukazanie większego odsetka niefunkcjonalnych, tzw. milczących synaps w neuronach myszy GSK-3b[S9A].

W dalszej części pracy Doktorantka zadała bardzo ciekawe pytanie o wpływ wzmożonej aktywności GSK-3b na populację małych niekodujących RNA, znanych jako miRNA, w hipokampie myszy GSK-3b[S9A]. Stosując głębokie sekwencjonowanie małych RNA, a następnie weryfikację dla wybranych miRNA metodą RT-qPCR zidentyfikowano szereg miRNA, których poziom był istotnie różny, w większości obniżony, w badanych tkankach. Jednym z nich był miR-221-5p, którego poziom był obniżony o około 50%.

W tej części zabrakło mi sprecyzowania celowości podjętych badań przed opisem uzyskanych wyników. Dopiero w części dyskusja Doktorantka wyjaśniła jakie wcześniejsze badania sugerowały, że warto podjąć ten problem badawczy. Ciekawym jest to, że w świetle wcześniejszych badań można by się spodziewać wzrostu poziomu wielu miRNA w badanym modelu mysim poprzez regulację przez GSK-3b aktywności głównego komponentu mikroprocesora - rybonukleazy Drosha. W związku z tym chciałbym poprosić Doktorantkę o skomentowanie tej rozbieżności. Ponadto miR-221-5p jest tzw. miR*, a miR-221-3p jest jednym z najpowszechniejszych miRNA w mózgu. Oba powstają z tego samego prekursora. W związku z tym rodzi się kolejne pytanie jaki mechanizm może wpłynąć na zmianę poziomu miRNA powstającego z jednego, a nie z drugiego ramienia pre-miRNA. Pewnie nie zmiana efektywności transkrypcji. Wreszcie patrząc ze znacznie szerszej perspektywy rodzi się bardziej generalne pytanie: czy zmiany w poziomie miRNA są bezpośrednim czy odległym, i jeśli tak to jak odległym skutkiem nadmiernej aktywności GSK-3b. Ta nadmiarowa aktywność wywoływać może szereg zmian już w rozwoju embrionalnym, co może mieć skutki na etapie rozwojowym, na którym model myszy poddano badaniu. Chciałbym usłyszeć opinię Doktorantki na ten temat podczas obrony tej pracy doktorskiej. To pytanie dotyczy oczywiście również badań opisanych w pierwszej części pracy, dotyczącej zmian plastyczności neuronów.

Kolejnym, naturalnym celem badawczym postawionym w rozprawie było określenie wpływu niedoboru miR-221-5p na strukturę i aktywność komórek nerwowych hipokampa. Po poddaniu tych komórek działaniem inhibitorem badanego miRNA (antysensowy bloker LNA) wykonano jakościowe i ilościowe analizy strukturalne i testy funkcjonalne neuronów, podobnie jak to zrobiono w części pierwszej projektu. Nie odnotowano efektu na liczebność i morfologię kolców dendrytycznych, ale wykazano zwiększoną amplitudę zdarzeń mEPSC, co sugeruje zwiększone pobudzające przewodnictwo synaptyczne. Zatem rodzi się kolejne pytanie, czy zmiany te można wprost odnieść do zmian obserwowanych w myszy GSK-3b[S9A], gdzie poziom miR-221-5p był obniżony o około 50%?

W tej części pracy pojawiło się kilka nieścisłości i drobnych niedociągnięć. Na przykład w Tabeli 9 zabrakło wyjaśnienia czym jest „p” oraz dlaczego zastosowano taki nietypowy sposób opisu prekursorów miRNA (pre-miRNA). Jeśli P to wartość prawdopodobieństwa z odpowiedniego testu np. testu t , to powinno być wyjaśnione, czy jest to tzw. P_{adj} , który ma znosić efekt wielokrotnych porównań. Czym jest wskaźnik krotności zmiany (FC). Pewnie jest to wartość logarytmiczna, co powinno być wyjaśnione. Wreszcie jak określono zmiany ilościowe pre-miRNA? Właściwie ani w M&M ani w części wyniki nie znajdujemy odniesienia do tych wyników. W części wyniki powinny się również pojawić informacje o liczbie zmapowanych odczytów do miRNA dla poszczególnych grup eksperymentalnych, co ukazałoby głębokość analizy, a zarazem ufność do pokazanych wyników. W rozdziale 5.7.1. napisano, że testowano i ostatecznie zastosowano 5 pM stężenie inhibitora miR-21*. Pewnie chodziło o stężenie nanomolarne (nM). Podobnie na Ryc. 22. Kontrolą w tych eksperymentach powinien być kontrolny bloker LNA, a nie jedynie czynnik transfekcyjny, aby znieść potencjalny, niespecyficznego efektu wprowadzonego oligonukleotydu. Ponadto aby się przekonać, czy bloker miR-221* działa efektywnie jako inhibitor należało wykonać kontrolny test ilościowy, na przykład testując poziom cząsteczek mRNA, które są znanymi celami dla miR-221-5p.

Zawartość ocenianej pracy doktorskiej została już w większości opublikowana w 2022 roku w dwóch dobrych, specjalistycznych czasopismach z obszaru neurobiologii, jakim są *Neurosci. Lett.* (IF₂₀₂₁, 3.197; doi: 10.1016/j.neulet.2022.136744) oraz *Neuroscience* (IF₂₀₂₁, 3.708; doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.03.024). Mgr Banach jest pierwszym autorem obu tych prac. Większa część dysertacji została więc już wnikliwie oceniona przez ekspertów z obszaru tematycznego projektu doktorskiego, chociaż jak rozumiem składając rozprawę jedna z tych prac była ciągle na etapie oceny recenzentkiej.

Z dogłębnej analizy wszystkich elementów rozprawy doktorskiej jasno wynika, że mgr Ewa Banach w sposób dogłębny przestudiowała zagadnienia dotyczące plastyczności mózgu, funkcji kinazy GSK-3b, oraz jej znaczenia w kształtowaniu stanów patologicznych. Chcąc jak najlepiej zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zaplanowała logiczny ciąg poszczególnych etapów badań. Pokazała, że potrafi w sposób kompetentny skorzystać z rozmaitych narzędzi badawczych, interpretując w sposób właściwy uzyskane wyniki (drobne uwagi znajdują się powyżej). Dyskusja obserwacji eksperymentalnych przeprowadzona została w kompleksowy, a zarazem wyważony sposób. Praca doktorska jest solidna i odpowiada na kilka bardzo ważnych pytań biologicznych. Wskazane powyżej uchybienia i wątpliwości interpretacyjne nie wpływają w istotny sposób na moją bardzo wysoką ocenę niniejszej rozprawy.

Wnioski końcowe

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa mgr Ewy Banach spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami). Zapoznając się z rozprawą odczuwałem ogromną satysfakcję zetknięcia się z rzetelnie i kompleksowo prowadzonymi badaniami, które doprowadziły do sformułowania kilku wniosków istotnych z poznawczego punktu widzenia. Świadczy o tym nie tylko opinia recenzenta, ale również opinia recenzentów i redaktorów

dwóch czasopism, w którym Doktorantka wspólnie z kolegami z zespołu opublikowała wyniki swoich badań. Mgr Banach wykazała się więc wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodniła, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń oraz interpretację ich wyników. Uzyskała istotne wyniki, poprawnie je opisała i wyciągnęła uprawnione wnioski. Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Banach do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wniosek o nadanie jej stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie uważam, że oceniana praca ma ponadprzeciętny charakter. Doktorantka publikując swoje wyniki w dobrych, specjalistycznych czasopismach naukowych dowiodła, że przeprowadzone przez nią badania mają duże znaczenie dla pogłębienia wiedzy w zakresie wielu aspektów regulacji plastyczności synaptycznej komórek neuronalnych. W klarowny sposób wykazała, że GSK-3b pełni istotną rolę w prawidłowym formowaniu synaps oraz, że w komórkach z nadmiarową aktywnością tego białka dochodzi do zaburzeń poziomu szeregu miRNA, a jeden z nich miR-221-5p może odgrywać rolę w prawidłowej funkcji synaps. Ta nowa wiedza może mieć znaczenie w poznaniu mechanizmów chorób psychiatrycznych, w których obserwuje się nadmierną aktywność GSK-3b. Zwracam się zatem o rozważenie wyróżnienia ocenianej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.



Krzysztof Sobczak