

Dr hab. Anna Błasiak, prof. UJ
Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, 31.03.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej Natalii Chwin
„Funkcjonalne konsekwencje utraty aktywności genu PTEN
w hipokampie dorosłych myszy”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Natalii Chwin koncentruje się na roli genu *Pten* w neuronach pobudzających hipokampa dorosłych myszy, ze szczególnym uwzględnieniem jego wpływu na zdolności poznawcze, aktywność lokomotoryczną oraz zachowania społeczne zwierząt. Jest to niezwykle istotny temat badawczy, ponieważ gen *Pten* odgrywa kluczową rolę nie tylko jako regulator procesów nowotworowych i metabolizmu komórkowego, lecz także w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego. Zaburzenia w jego ekspresji lub funkcji są powiązane z licznymi schorzeniami neurorozwojowymi, w tym z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, co czyni *Pten* ważnym celem badań translacyjnych. Dlatego też istnieje silna potrzeba pogłębionych badań nad molekularnymi, komórkowymi i behawioralnymi konsekwencjami zmian w aktywności tego genu, które mogą przyczynić się do opracowania skutecznych strategii terapeutycznych w leczeniu zaburzeń neurorozwojowych.

Jedną z pierwszych części rozprawy są starannie opracowane wykazy rycin i skrótów, które znacząco ułatwiają orientację w treści pracy. Streszczenie przedstawia najważniejsze zagadnienia tematyczne oraz kluczowe wyniki rozprawy, jednak jego przejrzystość zakłóca brak konsekwencji w zapisie nazwy genu *Pten*.

Wstęp pracy to obszerna część rozprawy, wprowadzająca czytelnika w najważniejsze zagadnienia związane z opisanymi później badaniami. Część tę rozpoczyna przedstawianie podstawowych informacji związanych z pamięcią i budową hipokampa. Wkradły się tutaj pewne nieścisłości/potoczne sformułowania (jak „długość czasu” zamiast czas trwania, równoczesne stosowanie nazw łacińskich i polskich do określenia warstw hipokampa „lacunosum-moleculare, radialna, piramidowa, oriens oraz lucidum”, zamienne stosowanie różnych nazw dla jednego obszaru, jak w przypadku warstwy drobinowej/molekularnej, itp.). Aby ujednolicić i doprecyzować treść tej części pracy warto byłoby zamiast określeń „wysyłają sygnały/projektują/wysyłają projekcje” użyć prostego określenia „unerwiają”. Dodatkowo, już przy pierwszym opisie budowy hipokampa należałoby zaznaczyć, że hipokamp właściwy (hippocampus proper) składa się z pól CA, a formacja hipokampa to także zakręt zębaty i podkładka (w opisie ryciny 1 nie jest to jednoznacznie wskazane, jednak już doprecyzowane

w części 1.1.3). W kolejnych częściach dysertacji terminy hipokamp i formacja hipokampa używane są zamiennie. Kolejne części wstępu w uporządkowany sposób przybliżają zagadnienia związane z rodzajami pamięci, modelami zwierzęcymi wykorzystywanymi do jej badania, charakteryzowany jest gen *Pten* oraz systemy genetyczne używane w dalszych częściach pracy doktorskiej. I tutaj znalazły się pewne niedociągnięcia; np. mimo wskazania zakrętu zębatego jako struktury o „fundamentalnym znaczeniu dla pamięci przestrzennej”, nie został on uwzględniony w Tabeli 1, przedstawiającej rodzaje neuronów zaangażowanych w pamięć przestrzenną oraz tworzenie mapy kognitywnej. Warto byłoby w tej części wstępu zaznaczyć, że proces separacji wzorców nie odnosi się wyłącznie do nawigacji przestrzennej, a w procesie uzupełniania wzorców (pattern completion), niezwykle istotnym elementem jest odtworzenie reprezentacji na podstawie częściowego/niepełnego zestawu danych wejściowych. Wartość tej części rozprawy podniosłoby wykluczenie użycia nieprecyzyjnych określeń, takich jak „oszacowanie uzależnień”, „długoterminowa aktywność okołodobowa”, „oszacowanie uczenia się”, czy użycie określenia narząd lemieszowo-nosowy zamiast „womeronowy”. Podsumowując, Wstęp zawiera istotne, dobrze dobrane do tematu rozprawy zagadnienia, jednak jego wartość podniosłoby doprecyzowanie używanych terminów i ujednolicenie terminologii.

Założenia i cel pracy są jednoznacznie wskazane i przedstawione w postaci trzech punktów, obejmujących ocenę wpływu utraty funkcji *Pten* na funkcje poznawcze dorosłych myszy, porównanie fenotypu z modelami neurorozwojowymi spektrum autyzmu (ASD) oraz identyfikację ról genu *Pten* specyficznych dla dojrzałych neuronów hipokampa.

Materiały i metody to szczegółowo napisana część rozprawy. Imponująca jest mnogość technik użytych do realizacji opisanych później eksperymentów. Kompleksowość użytych technik eksperymentalnych (od izolacji materiału genetycznego i genotypowania zwierząt, przygotowania rekombinowanych wektorów wirusowych AAV, użycia dwóch linii genetycznie modyfikowanych zwierząt, przez fenotypowanie behawioralne zwierząt z wykorzystaniem baterii testów behawioralnych, po pomiar aktywności elektrofizjologicznej neuronów hipokampa *ex vivo* (w tym także zastosowanie barwień immunohistochemicznych i metody Western blot), zasługuje na uznanie i przekłada się na wysoką wartość uzyskanych wyników. W tej części rozprawy zastanawiają jedynie drobne szczegóły, takie jak powód umieszczenia kamery rejestrującej zachowanie zwierząt podczas testów behawioralnych, tak by była niewidoczna dla badanych myszy, skąd pochodziły zwierzęta, które były partnerami zwierząt eksperymentalnych (czy były hodowane w tych samych pomieszczeniach), co oznacza przetwarzanie sygnału „w 10 kHz” (czy chodzi o częstotliwość próbkowania z częstotliwością 10 kHz?) oraz na jakiej podstawie stwierdzono, że wywołane depolaryzacją potencjały czynnościowe zależne były od receptorów AMPA.

W opisie warunków utrzymania zwierząt wskazano, że w badaniach wykorzystano dorosłe samice, jednak w rzeczywistości badania przeprowadzono na obu płciach. Nie jest do końca

jasne jakiego etapu eksperymentu dotyczy opis wieku użytych myszy „W badaniach wykorzystano dorosłe samice w wieku około 6–9 tygodni”.

Część rozprawy poświęcona metodom statystycznym została opracowana w sposób wyczerpujący i zgodny z obowiązującymi standardami analizy danych.

Rozdział opisujący wyniki uzyskane w czasie realizacji badań, podobnie jak część Materiały i metody, imponuje mnogością i kompleksowością danych. Autorka, badając rolę genu *Pten* w neuronach pobudzających przodomózgowia myszy, rozpoczęła od przygotowania rekombinowanych wektorów wirusowych, umożliwiających stworzenie mysich modeli z utratą aktywności tego genu. Kolejne etapy eksperymentów zostały zilustrowane za pomocą przejrzystych i dobrze zaprojektowanych schematów, ułatwiających orientację w prezentowanych wynikach.

Autorka wykazała, że usunięcie genu *Pten* w dojrzałych neuronach hipokampa może przekładać się na poprawę pamięci przestrzennej, oraz że mutacja ta skutkuje szybszym uczeniem się osobników, u których wystąpiła. Nie jest jednak jasne skąd ograniczenie wniosku Autorki do neuronów hipokampa w przypadku mutacji *Pten*-iCKO. Wcześniej wskazano, że w mutacji tej delecja genu *Pten* ograniczona była do neuronów pobudzających przodomózgowia (nie wyłącznie do hipokampa). Niestety artykuł do którego odwołała się Autorka nie został umieszczony w spisie literatury (Erdmann i wsp., 2007).

Informacja o różnej przeżywalności mutantów *Pten*-iCKO i *Pten* AAV-KO, w przypadku *Pten* AAV-KO uzupełniona jest o istotną dokumentację histologiczną, wskazującą na znaczny ubytek tkanki w obrębie hipokampa. Czy podobne obserwacje dotyczą mutacji *Pten*-iCKO?

Przeprowadzone testy motywacji do picia nie wykazały istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami, co zostało przedstawione na odpowiednich wykresach słupkowych. Warto jednak zaznaczyć, że opisy osi na Ryc. 25 wymagają korekty — powinny odnosić się do liczby (a nie ilości) liźnięć oraz do czasu, a nie długości picia. Jednocześnie, dzięki przeprowadzeniu szeregu kolejnych testów behawioralnych z użyciem klatek IntelliCage, Autorka wykazała, że myszy *Pten*-AAV-KO przejawiają większą zdolność do uczenia się w pierwszym etapie eksperymentu, która zanika po 15 tygodniach od iniekcji AAV, co jak słusznie zostało wskazane, wynika najprawdopodobniej z postępującego uszkodzenia hipokampa. Kolejne testy, przeprowadzane już z użyciem klasycznych testów otwartego pola i podwyższonego labiryntu krzyżowego wykazały, że myszy *Pten*-AAV-KO miały wyższy poziom aktywności lokomotorycznej i niższy poziom zachowań lękowych niż myszy kontrolne. Niezwykle ciekawą była obserwacja, że samice *Pten*-AAV-KO poruszały się o szybciej niż samce *Pten*-AAV-KO. Autorka słusznie wskazuje, że może to świadczyć o tym, że mutacja w genie *Pten* może wpływać na układy związane z zachowanymi eksploracyjnymi i ruchowymi. Warto wskazać tutaj również możliwy wpływ mutacji na ogólny poziom wzbudzenia mózgowia, nierozdzielnie związany z zachowaniami eksploracyjnymi. Jednocześnie Autorka, wykorzystując kolejne testy

behawioralne, wykazała, że myszy Pten-AAV-KO słabiej angażują się w budowanie gniazda, samice Pten-AAV-KO mają zaburzoną preferencję do kontaktów socjalnych, a samce zaburzoną pamięć socjalną.

Część rozprawy opisująca bezpośrednie interakcje społeczne i parametry wokalizacji myszy Pten-AAV-KO to doskonałe uzupełnienie wcześniej opisanych eksperymentów behawioralnych. Autorka bardzo szczegółowo zbadała i zanalizowała zachowania badanych zwierząt i wykazała, że myszy Pten-AAV-KO wykazują więcej zachowań eksploracyjnych oraz mają znacząco odmienne wzorce wokalizacji niż myszy kontrolne.

Podsumowując część rozprawy poświęconą opisowi wyników badań behawioralnych, należy podkreślić, że jest to wyjątkowo dobrze opracowany fragment pracy, który zasługuje na szczególne uznanie. Na uwagę zasługuje zarówno duża liczba oraz zróżnicowanie przeprowadzonych eksperymentów, jak i zaangażowanie Autorki na wszystkich etapach badań. Należy również docenić znaczny nakład pracy niezbędny do ich rzetelnej realizacji i wynikającą z opisu wyników staranność badawczą.

W kolejnych częściach rozprawy Autorka przedstawia wyniki eksperymentów elektrofizjologicznych przeprowadzonych metodą whole-cell patch-clamp. Rejestrowano aktywność neuronów pobudzających w polu CA1, wykazujących fluorescencję w zakresie emisji eYFP. Nie zostało jednak jednoznacznie wyjaśnione, w jaki sposób obrazowano komórki przed rozpoczęciem rejestracji. Aktywność była mierzona zarówno w neuronach fluorescencyjnych, jak i tych niewykazujących fluorescencji, należy jednak zaznaczyć, że brak widocznej fluorescencji — szczególnie w żywych komórkach, które nie były wybarwiane z użyciem przeciwciał anti-YFP — nie musi oznaczać braku ekspresji białka reporterowego. Możliwe jest, że poziom ekspresji był zbyt niski, by umożliwić detekcję przy użyciu zastosowanej metody obrazowania. Dodatkowo, nie wiadomo, czy neurony niewykazujące fluorescencji zostały zidentyfikowane pod względem typu komórkowego — tj. czy były to neurony piramidowe czy interneurony. Warto byłoby doprecyzować, czy przeprowadzono testy elektrofizjologiczne pozwalające na charakterystykę badanych komórek.

Autorka wykazała, że w neuronach myszy Pten-AAV-KO (z ekspresją eYFP oraz Cre) spoczynkowy potencjał błonowy miał bardziej ujemną wartość niż w pozostałych badanych komórkach. Wymaga jednak dalszego doprecyzowania, wobec jakiej populacji komórek nie wykazujących fluorescencji dokonano porównania — czy odnosiło się ono wyłącznie do neuronów piramidowych, czy też obejmowało również inne typy komórek. W opisie osi Ryciny 37, zamiast „Milivolty” powinien pojawić się opis „potencjał błony”, a w opisie metody lub w wynikach, informacja czy podane wartości zostały skorygowane o potencjał złącza (junction potential).

W kolejnych etapach eksperymentu elektrofizjologicznego, Autorka porównuje właściwości potencjałów czynnościowych badanych komórek i rejestrowane miniaturowe potencjały

postsynaptyczne (mEPSC). Zastanawia wybór właśnie tej formy EPSC (dlaczego nie rejestrowano także spontanicznych EPSC).

Przy badaniu pobudliwości warto byłoby przeprowadzić także analizę porównującą nachylenia linii regresji liniowej wynikającej z pomiarów liczby potencjałów czynnościowych w badanych grupach. Przeprowadzona ANOVA jest trafnym i istotnym podejściem, pozwalającym zidentyfikować poziomy stymulacji, przy których pojawiają się istotne różnice między grupami, jednak nie zastępuje ona całościowej oceny czułości neuronu na stymulację, jaką umożliwia analiza nachylenia regresji.

Nie do końca jest jasne co oznacza „parametr szybkiej (hiper)polaryzacji”, czy „podwyższona hiperpolaryzacja”; można jedynie domyślać się że chodzi o minimalną wartość napięcia podczas hiperpolaryzacji następczej. Czy „podwyższona hiperpolaryzacja” o $-5,14$ mV oznacza, że przyjmowała ona bardziej dodatnią czy ujemną wartość?

Do analizy właściwości mEPSC zastosowano wykresy kumulatywne, ilustrujące rozkład prawdopodobieństwa występowania zdarzeń. Przeprowadzony test Kolmogorowa–Smirnowa wykazał istotne różnice pomiędzy badanymi grupami, co sugeruje odmiennność w rozkładzie interwałów międzyczarzeniowych. Warto byłoby uzupełnić tę analizę o porównanie średniej częstotliwości mEPSC pomiędzy grupami, co pozwoliłoby jednoznacznie ocenić, czy różnice w rozkładzie przekładają się na różnice w liczbie zdarzeń na jednostkę czasu. Podobnie w przypadku rozkładu amplitudy, Autorka wykazała istotne różnice pomiędzy badanymi grupami.

Ostatnią częścią Wyników opisanych w rozprawie jest analiza poziomu białka Pten metodą Western blot, której przeprowadzenie pozwoliło na ostateczną weryfikację skuteczności działania systemu AAV-Cre-loxP w modelu Pten-AAV-KO.

Rozprawę zamyka napisana dojrzałe Dyskusja, wskazująca na bardzo dobrą znajomość tematu przez Autorkę, trafnie odwołującą się do licznych pozycji literatury naukowej (ponad 160!). Choć wkradły się tu pewne błędy redakcyjne, czy niedokończone zdania, to moja ogólna ocena tej części rozprawy jest bardzo wysoka. Na uznanie zasługuje adekwatność odwołań i biegłość w poruszaniu się w opisywanym temacie jak i krytyczne podejście do cytowanej literatury oraz trafność wyciąganych wniosków opisanych w części „Podsumowanie i wnioski”.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Natalii Chwin zatytułowaną „Funkcjonalne konsekwencje utraty aktywności genu PTEN w hipokampie dorosłych myszy” oceniam bardzo wysoko i stwierdzam, że spełnia ona wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Tym samym, rekomenduję dopuszczenie przez Radę Naukową Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN mgr Natalii Chwin do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ponadto pragnę podkreślić, że wskazane drobne błędy oraz niedociągnięcia redakcyjne nie umniejszają wysokiej wartości naukowej rozprawy. Bogactwo zastosowanych technik eksperymentalnych przełożyło się na spójny i kompletny zestaw danych, który umożliwił Autorce udzielenie odpowiedzi na postawione pytania badawcze. Kompleksowość, wysoka jakość oraz nowatorski charakter uzyskanych wyników stanowią podstawę mojego wniosku o wyróżnienie rozprawy.

Marta B Wiśniewska
Laboratorium Neurobiologii Molekularnej
Centrum Nowych Technologii UW
ul. Banacha 2C
02-097 Warszawa
E.mail: m.wisniewska@cent.uw.edu.pl

Warszawa, 05/05/2025

*Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Chwin pt.
"Funkcjonalne konsekwencje
utruty aktywności genu Pten w hipokampie dorosłych myszy"
wykonanej
w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego
Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem
promotora dr. hab. Witolda Konopki oraz
promotorki pomocniczej dr Anny Kiryk-Jaśkiewicz*

Wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe odgrywają kluczową rolę w regulacji strukturalnej i funkcjonalnej plastyczności neuronalnej, a brak równowagi w tych procesach jest związany z chorobami neurorozwojowymi, takimi jak zaburzenia ze spektrum autyzmu (ASD) i schizofrenia, a także z padaczką i chorobami neurodegeneracyjnymi. Dlatego zasadne jest badanie efektów zaburzeń w szlakach sygnałowych na poziomie morfologicznym, elektrofizjologicznym i behawioralnym, a przykładem są badania opisane w recenzowanej rozprawie. Projekt doktorski koncentrował się na białku PTEN (fosfataza 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu, PIP3), które m.in. jako inhibitor szlaku PI3K-AKT-mTOR uczestniczy w regulacji dojrzewania neuronów.

Celem projektu było określenie skutków usunięcia PTEN w dojrzałych neuronach pobudzających hipokampa myszy na (i) zdolności poznawcze, (ii) zachowania społeczne i repetytywne oraz (iii) parametry elektrofizjologiczne neuronów hipokampa. Cele były zasadne, ponieważ mimo że wiadomo, iż nokaut genu *Pten* u myszy może prowadzić do zmian behawioralnych przypominających ASD, deficytów poznawczych, napadów padaczkowych oraz wpływać na funkcjonowanie neuronów na poziomie komórkowym,

dotychczasowe badania koncentrowały się głównie na modelach z nokautem w okresie rozwojowym. W recenzowanym projekcie Doktorantka kompleksowo zbadała efekty behawioralne i elektrofizjologiczne po wywołaniu deficytu PTEN w dojrzałych neuronach w określonej strukturze mózgu, co stanowi istotny element nowości tej pracy.

Chociaż w miarę czytania rozprawy powyższe cele pracy stały się jasne, ich przedstawienie w rozdziale *Założenia i cele pracy* jest dość nieprecyzyjne. W założeniach Doktorantka skupiła się na zagadnieniach nieomówionych we Wstępie i dosyć odległych od głównego tematu rozprawy, dotyczących genu *Dicer* w jądrze łukowatym podwzgórza oraz otyłości. Cele zostały sformułowane w sposób niepotrzebnie złożony, co utrudnia ich zrozumienie. Pierwsze dwa cele sugerowały szerszy zakres badań: (i) „Określenie, czy (...) aktywacja szlaku PI3K-AKT-mTOR spowodowana usunięciem (...) białka PTEN w neuronach (...) hipokampa ma wpływ na zdolności poznawcze (...)” – w pracy nie przeprowadzono jednak analizy pozwalającej bezpośrednio powiązać obserwowane efekty z deregulacją tego szlaku sygnalizacyjnego; (ii) „Porównanie fenotypu myszy mutantów *Pten* (...) z modelami neurorozwojowymi spektrum autyzmu” – sugeruje badania równoległe z wykorzystaniem różnych modeli ASD, podczas gdy w rzeczywistości przeprowadzono je na myszach z mutacją genu *Pten* i porównano z danymi literaturowymi. Trzeci cel został natomiast ujęty zbyt ogólnie: „zdefiniowanie funkcji (...) unikatowych dla dojrzałych (...) neuronów hipokampa”, choć w praktyce odnosił się do ich charakterystyki elektrofizjologicznej.

Żeby zrealizować cele badawcze Doktorantka zastosowała dwa modele badawcze. W pierwszym modelu nokaut był indukowany poprzez ekspresję rekombinazy *Cre* pod kontrolą promotora *CaMKIIα* specyficznego dla neuronów pobudzających przodomózgowia, w wybranym wieku zwierząt poprzez podanie tamoksyfenu. Ponieważ model ten okazał się trudny do wykorzystania ze względu na wysoką śmiertelność myszy, doceniam decyzję o zastosowaniu alternatywnego podejścia. W drugim modelu wprowadzono gen *Cre* (również pod kontrolą promotora *CaMKIIα*) do hipokampa młodych, 2-3 miesięcznych, myszy przy użyciu wektorów wirusowych AAV. Dodatkową zaletą modelu AAV była możliwość ograniczenia nokautu genu *Pten* do hipokampa.

O ile dobór modeli jest adekwatny do celów badawczych, ich charakterystyka wydaje się niewystarczająca.

Nie pokazano skuteczności nokautu *Pten* w modelu z indukcją mutacji tamoksyfenem. *Czy taka charakterystyka została przeprowadzona?* W trakcie testów poznawczych ujawniła się wysoka śmiertelność myszy po indukcji mutacji tamoksyfenem, co podważyło sens ich przeprowadzenia. Doktorantka słusznie zrezygnowała z dalszych testów. *Czy śmiertelność mogła być spowodowana zbyt dużą dawką, częstością i liczbą aplikacji tamoksyfenu (2 razy dziennie przez 5 dni)?*

W przypadku indukcji mutacji poprzez iniekcję AAV (główny model) na początku rozdziału *Wyniki* pokazano barwienia immunohistologiczne białka *Cre* w hipokampie kilka tygodni po iniekcji oraz ufosforylowanej formie białka rybosomalnego S6 (RS6) jako odczytu aktywności szlaku PI3K-AKT-mTOR. Takie barwienia są jednak tylko pośrednimi

wskazówkami, że nokaut zaszedł. Poza tym, bez barwienia mózgu kontrolnego, nie można stwierdzić z całą pewnością, że faktycznie doszło do wzrostu poziomu fosfoRS6. Dopiero na sam koniec rozdziału *Wyniki* pokazano analizę Western blot poziomu białka PTEN w hipokampie, ale była ona ograniczona do 7 tygodnia po iniekcji, kiedy mogły się już pojawiać niespecyficzne efekty wtórne. Nie określono, w jakim czasie po podaniu AAV zachodzi nokaut genu. Bez barwień immunohistochemicznych nie wiadomo, czy efekt dotyczył specyficznie pobudzeniowych neuronów oraz czy był jednolity albo mozaikowy. *Czy takich badań nie wykonano? Czy jest możliwe, że gdyby taka charakterystyka została przeprowadzona, zostałyby dobrane inne punkty czasowe testów?*

Główny schemat eksperymentalny polegał na przeprowadzeniu badań behawioralnych i elektrofizjologicznych 6-7 tygodni po iniekcji AAV, oraz powtórnie kilkanaście tygodni po iniekcji w przypadku badania behawioru. Zasadność zastosowania późniejszego punktu czasowego budzi wątpliwości, skoro w tym czasie następowały już poważne zmiany degeneracyjne hipokampa. Nie jest jasne uzasadnienie, że punkty czasowe wybrano "na podstawie wcześniejszych obserwacji dotyczących śmiertelności w modelu" z indukcją nokautu w przodomózgowie tamoksyfenem. Nie jest też dla mnie jasne, dlaczego nie zastosowano wcześniejszych punktów czasowych (poza badaniem wokalizacji). W krótszym czasie po iniekcji AAV można się spodziewać bezpośrednich efektów nokautu, natomiast 7 tygodni po podaniu wirusa mogą się pojawiać efekty wtórne hipotetycznie wynikające z przebudowy sieci neuronalnej i kompensacji. O możliwej przebudowie sieci i kompensacji Doktorantka wspomina zresztą w rozdziale *Dyskusja*.

Pozytywnie oceniam jakość przeprowadzonych badań. Metody zostały dobrze opisane, wielkości grup były wystarczające oraz prawidłowo dobrano różnorodne testy statystyczne, zależnie od konstrukcji eksperymentu i rozkładu wyników. Wszystko to świadczy o świadomym i rzetelnym przeprowadzeniu badań, zgodnie z zasadami dobrej praktyki eksperymentalnej. Warte uznania jest to, że zostały przeprowadzone zarówno na samcach, jak i samicach. Zwraca uwagę wielość przeprowadzonych testów behawioralnych. Interpretacja testów behawioralnych bywa trudna; zastosowanie różnych testów, w których oceniano częściowo podobne a częściowo różne elementy behawioru, dało podstawy do pewniejszego wnioskowania. Na przykład lękliwość została oceniona na podstawie testu otwartego pola oraz podwyższonego labiryntu krzyżowego. Doceniam również to, że Doktorantka starała się w testach zmierzyć jak najwięcej parametrów, co dalej wzmacniało wnioskowanie. Przykładowo w teście podwyższonego labiryntu krzyżowego poza czasem w spędzonym w ramieniu zamkniętym i otwartym policzyła także częstotliwość wychyleń głowy. Badania elektrofizjologiczne są nieco skromniejsze. Doktorantka zbadała parametry błony neuronów i dynamikę neurotransmisji pobudzeniowej. Wyniki przeprowadzonych rejestracji jednoznacznie pokazały duże różnice pomiędzy neuronami hipokamplanymi u myszy kontrolnych i z nokautem. Trochę szkoda, że dodatkowo nie zbadała

plastyczności, bo podwyższona plastyczność mogłaby tłumaczyć lepsze wyniki testów poznawczych u myszy z nokautem.

Najważniejszym odkryciem Doktorantki jest hamujący wpływ *Pten* na uczenie się i pamięć, ponieważ wcześniejsze badania, w których nokaut indukowano w czasie rozwoju, wskazywały na odwrotny efekt. Polepszenie funkcji na skutek nokautu jest bardzo intrygującym wynikiem i pojawia się pytanie, dlaczego w ogóle *Pten* ulega ekspresji w dojrzałych neuronach. Jednak drugim ważnym wynikiem jest szybko postępująca w hipokampie neurodegeneracja przy deficycie PTEN, co wskazuje, jak stwierdziła Doktorantka, na "kluczową rolę PTEN w zachowaniu homeostazy neuronalnej" i bardziej ogólnie "istotność obecności czynnika hamującego (...) w długotrwałej (...) aktywności neuronów". *Jeżeli będzie czas, chętnie usłyszałabym spekulacje Doktorantki na temat mechanizmu łączącego deficyt PTEN i neurodegenerację.*

Ponadto Doktorantka zaobserwowała deficyty zachowań społecznych u myszy z nokautem w klasycznym teście trzykomorowym, statystycznie istotne u samic, oraz zmienione parametry wokalizacji. Jest tutaj jednak bardzo ostrożna w formułowaniu wniosku o związku zaburzenia funkcji PTEN z ASD, ponieważ nie wszystkie testy wyszły podobnie jak w klasycznych modelach ASD. Podejrzewa też, że zaburzenia społeczne mogły być związane z neurodegeneracją. Nie wiem, czy nie jest to nadmierny sceptycyzm – spektrum autyzmu z definicji obejmuje zróżnicowane nasilenie i formy objawów, dlatego również u myszy można spodziewać się ich różnych. Z drugiej strony ASD jest zaburzeniem neurorozwojowym, co utrudnia interpretację wyników uzyskanych po indukcji nokautu dopiero u dorosłych zwierząt. Jeżeli chodzi o neurodegenerację, należałoby się spodziewać także obniżenia funkcji poznawczych, podczas gdy zaobserwowano ich poprawę. Zastosowanie wcześniejszych punktów czasowych – kiedy neurodegeneracja jeszcze z pewnością nie zachodzi – mogłoby pomóc wykluczyć jej wpływ na zachowanie.

Z kolei zbyt mało ostrożny jest wniosek, że "podwyższona aktywacja ścieżki sygnałowej PI3K-AKT-mTOR w wyniku mutacji genu *Pten* prowadzi do zmian elektrofizjologicznych. Zgodzę się, że usunięcie PTEN powoduje podwyższenie aktywności PI3K-AKT-mTOR, ale nie ma dowodów na to, że to właśnie zaburzenie tej ścieżki jest przyczyną obserwowanego fenotypu. *Chciałabym, żeby Doktorantka wyjaśniła, co przemawia za rolą szlaku PI3K-AKT-mTOR w efektach nokautu Pten, i czy można spekulować o zaburzeniu innych szlaków.*

Sama rozprawa ma formę tradycyjną ze *Wstępem*, *Materiałami&Metodami*, *Wynikami* i *Dyskusją* i zasadniczo zawiera to, co powinna zawierać, jest ilustrowana pomocnymi schematami. Mam jednak kilka uwag do jej kompozycji, redakcji i słownictwa.

1) *Wstęp* zawiera podrozdziały na stosunkowo szerokie tematy, a brakuje jasnej identyfikacji problemu badawczego, bo za taki nie można uznać bardzo ogólnego stwierdzenia na końcu części o udziale różnych struktur mózgu w regulacji zachowań

społecznych, że "mechanizmy molekularne w tym geny (...) takie jak *PTEN* są istotnym elementem w zrozumieniu procesów neuronalnych regulujących pamięć społeczną".

2) We *Wstępie* zwykle przyjmuje się schemat od ogółu do szczegółu, a tutaj *Wstęp* kończy się niespecyficznym tematycznie omówieniem modeli zwierzęcych w badaniach neurobiologicznych.

3) *Dyskusja* zaczyna się od omówienia wpływu mutacji genu *Pten* w różnych strukturach mózgu i w różnym czasie rozwojowym na funkcje poznawcze - lepszym miejscem na ten fragment byłby *Wstęp*, a *Dyskusja* mogłaby się zacząć od trzeciego akapitu - pytaniem badawczym ("Dotychczas brakowało....") i omówieniem zastosowanych modeli.

4) *Dyskusja* jest bardzo rzeczowa (co jest plusem), skoncentrowana na omówieniu wyników i zestawieniu ich z poprzednimi badaniami, ale brakuje ogólniejszej refleksji na koniec.

5) Podpisy pod rycinami są bardzo zdawkowe, trzeba wracać do głównego tekstu, żeby ryciny dobrze zrozumieć. Ten mankament kontrastuje z bardzo przejrzystą graficzną kompozycją rycin. Na przykład dobrze wymyślone schematy eksperymentów na początku rozdziału *Wyniki* nie były tak przydatne, jak by mogły być z pełniejszym opisem i wyjaśnieniem skrótów na rycinach.

6) Wiele niestandardowych skrótów zostało niepotrzebnie wprowadzonych, bo użyto ich tylko kilka razy w tekście, dlatego były naogół nieczytelne, a nie zawsze zamieszczone na liście skrótów. Przykładem jest skrót SIT, który został wprowadzany z pełną nazwą w trzech miejscach, a poza tym wystąpił jeszcze raz w teście i raz na rycinie.

7) We *Wstępie* omawiając anatomię hipokampa użyto terminów polskich (warstwa piramidowa), anglicyzmów (warstwa radialna), i terminów angielskich (stratum lacunosum-moleculare, warstwy oriens i lucidum). Wszystkie te terminy mają wersje polskie

Chciałabym, żeby te uwagi były pomocne w przyszłości przy pisaniu tekstów naukowych. Nie dotyczą one ani meritum ani szkieletu rozprawy, dlatego nie podważają wartości pracy.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani Natalii Chwin oceniam bardzo pozytywnie: praca badawcza została wykonana z rozmachem i rzetelnie oraz dostarczyła nowej wiedzy na temat znaczenia aktywności PTEN w dojrzałych neuronach oraz skutków behawioralnych zniesienia tej aktywności

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia ustawowe warunki stawiane pracom doktorskim (określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce – Dz.U. 2023, poz. 742) i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Natalii Chwin do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



Kraków, 22.07.2025

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Natalii Chwin

p.t.

„Funkcjonalne konsekwencje utraty aktywności genu PTEN w hipokampie dorosłych myszy”

Promotor: dr hab. Witold Konopka

Promotor pomocniczy: dr Anna Kiryk-Jaśkiewicz

Praca doktorska **Pani mgr Natalii Chwin** analizuje, w jaki sposób selektywne wyciszenie genu kodującego białko PTEN (ang. *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) w dojrzałych neuronach pobudzających hipokampa wpływa na plastyczność synaptyczną i funkcje poznawcze dorosłych myszy.

PTEN jest uważany za kluczowe białko w homeostazie komórkowej. Gen *Pten* zlokalizowany jest na chromosomie 10 u człowieka (19 u myszy) i koduje 403 aminokwasową fosfatazę z dwiema głównymi domenami: katalityczną oraz C2 wiążącą błonę; dodatkowe domeny PEST/PDZ/PBD regulują stabilność i interakcje białka. Białko PTEN to kluczowy supresor nowotworowy regulujący szlak PI3K/AKT/mTOR (fosfataza PTEN defosforyluje PIP3, hamując nadmierną aktywację ścieżki PI3K/AKT/mTOR, co zapobiega niekontrolowanemu wzrostowi i przetrwaniu komórek), niemniej posiada także duże znaczenie w regulacji rozwoju układu nerwowego. Wysokie poziomy ekspresji PTEN podczas embriogenezy regulują proliferację progenitorów, migrację neuronów, wzrost dendrytów/aksonów i polaryzację komórek; delecja PTEN w okresie rozwojowym powoduje hipertrofię neuronów, makrocefalię, napady padaczkowe i deficyty poznawcze.

Funkcja PTEN w mózgu, w dojrzałym już organizmie – poza rolą białka supresorowego – jest mniej poznana. Ekspresja białka PTEN jest widoczna w jądrach komórkowych, kolcach dendrytycznych i zakończeniach aksonalnych. PTEN pełni rolę w regulowaniu plastyczności synaptycznej. Co ciekawe, dwufazowy efekt behawioralny poprzez zahamowanie PTEN może podwyższać wydajność pamięci, lecz jego przewlekła utrata skutkuje destabilizacją sieci neuronalnej



i neurodegeneracją, jak pokazano w omawianej pracy doktorantki. Autorka, wykorzystując dwie komplementarne strategie metodyczne (badania prowadzone z wykorzystaniem linii CaMKIIalpha-CreERT2 z miejscową, indukowaną delecją genu *Pten* w neuronach pobudzających przodomózgowia, oraz model oparty o podanie wektora wirusowego AAV-CaMKIIalpha-Cre (*Pten*-AAV-KO) myszom *Pten*^{fl/fl}, gdzie delecja genu *Pten* została ograniczona wyłącznie do hipokampa) wykazała krótkotrwałe wzmocnienie pamięci przestrzennej po 7 tygodniach od usunięcia genu *Pten*, które jednak ustępuje, gdy przewlekła deregulacja szlaku PI3K/AKT/mTOR prowadzi do postępującej degeneracji hipokampa i spadku sprawności poznawczej. Wyniki te unaocniają dwufazową – protekcyjną i potencjalnie neurotoksykczną – rolę PTEN w dorosłym mózgu, co stanowi oryginalne i istotne odkrycie wynikające z badań przeprowadzonych przez Panią mgr Chwin. Zmiany obserwowane przez Doktorantkę mogą być także przyczynkiem do opracowania nowego, zwierzęcego modelu spektrum autyzmu na co byłoby ogromne zapotrzebowanie w badaniach neurobiologicznych. Jednak jak sama Autorka pracy krytycznie zauważa, na podstawie uzyskanych wyników takie stwierdzenie jest jeszcze przedwczesne.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska stanowi kompleksowe, eksperymentalne studium nad konsekwencjami delecji genu *Pten* w dojrzałych neuronach pobudzających hipokampa. Autorka z wykorzystaniem w/w modeli zwierzęcych zbadała wpływ deregulacji szlaku PI3K/AKT/mTOR na procesy uczenia się, pamięci, zachowań społecznych i parametry elektrofizjologiczne aktywności neuronów CA1. Rozprawa liczy 151 stron zasadniczego tekstu, który zestawiono w klasycznym układzie rozdziałów obejmujących: Wstęp (s. 17 – 46), Cele (s. 47 – 48), Materiały i metody (s. 49 – 80), Wyniki (s. 81 – 124), Dyskusja (s. 124 – 139), Podsumowanie i wnioski (s. 140 – 142) oraz obszerną Bibliografię, obejmującą ponad 600 pozycji. Poglądowe informacje ze wstępu pracy, wybrane aspekty metodyczne a przede wszystkim materiał wynikowy zestawiono w 7 tabelach i 41 rycinach. Należy podkreślić, że ich jednolita szata graficzna znacząco ułatwia lekturę pracy. Zakres metodyczny jak i szczegółowy opis wykonywanych doświadczeń oraz pasja naukowa konsekwentnego dążenia do odkrycia i zbadania postawionego celu jaka daje się odczuć między wierszami tekstu utrzymanego w ryzach profesjonalnej i naukowej sprawozdawczości, wskazuje na dojrzałość i dużą samodzielność doktorantki. Potwierdzają to zresztą słowa bardzo oryginalnych podziękowań („mogłam być Zosią Samosią...”) – nieczęsto spotykanych w tej formie, ale pokazujących świetną atmosferę towarzyszącą wykonywanej pracy. Jest to warte podkreślenia, bo partnerskie relacje między doktorantką a jej bezpośrednimi opiekunami, przekładają się nie tylko na jakość prowadzonych badań, ale stanowią motywację do pokonywania przeszkód w trudnym projekcie, których z pewnością nie brakowało.



Za najważniejsze osiągnięcia niniejszej pracy doktorskiej, zarówno co do jej treści jak i formy przedstawienia wyników, uważam:

- prawidłowe postawienie hipotezy badawczej – Autorka logicznie wywodzi pytania badawcze z poprzednich obserwacji dotyczących roli miRNA i szlaku mTOR, formułując trzy precyzyjne cele, w tym rozróżnienie efektów rozwojowych i efektów u dojrzałych neuronów po delecji genu *Pten*;
- dobór nowoczesnych modeli eksperymentalnych, adekwatnych do odpowiedzi na postawione pytania – badania prowadzone równolegle na modelu z delecją PTEN w przodomózgowiu zestawione z badaniami obejmującymi selektywną delecję PTEN w komórkach CA1 hipokampa;
- szerokie, multidyscyplinarne podejście metodyczne, obejmujące przygotowanie samych modeli zwierzęcych (prowadzenie hodowli zwierząt w oparciu o system indukowanych mutacji warunkowych Cre/loxP, przygotowanie wektora AAV, podania stereotaktyczne), weryfikacja skuteczności mutacji, niezwykle bogaty pakiet testów behawioralnych w tym wykonywanych z użyciem zaawansowanego narzędzia jakim są klatki IntelliCage, podstawowe techniki biologii molekularnej (Western blot, immunohistochemia) czy eksperymenty elektrofizjologiczne, poparte również samodzielną analizą wyników włączając użycie pakietu statystycznego R;
- oryginalne wyniki – krótkotrwałe „wzmocnienie pamięci” 7 tygodni po delecji PTEN, po którym pojawia się faza neurodegeneracji i spadek zdolności poznawczych, co stanowi ważny wkład w zrozumienie równowagi między plastycznością a homeostazą regulowaną przez PTEN;
- klarowna przeprowadzona dyskusja wyników odnosząca się również do translacyjnego potencjału badań – Autorka trafnie pokazuje, że prosty „model autyzmu” nie daje się tu obronić, a PTEN pełni raczej funkcję „hamulca” dla zbyt szybkiej plastyczności; warto przy tym podkreślić spójność narracji – mimo znacznej objętości tekstu czytelnik prowadzony jest płynnie od hipotezy do wniosków a ujednolicona grafika ułatwia lekturę.

Przy tak obszernym materiale jakim jest praca doktorska, oczywiście nie sposób ustrzec się od drobnych błędów językowych, zwłaszcza w pracy eksperymentalnej, pisanej w języku polskim, która opiera się o anglojęzyczne słownictwo zawodowe. Przy okazji recenzji takie błędy są często wytykane Autorom przez oceniających pracę, którzy powołują się na „obowiązek recenzenta”. Nie uważam takiego podejścia za słuszne. Co więcej, w przypadku tej rozprawy doktorskiej należy zaznaczyć, że liczba błędów jest naprawdę marginalna i nie przesłania bardzo dobrego odbioru lektury i płynności tekstu.



Praca doktorska jest napisana bardzo dobrze a kilka poniżej zestawionych zastrzeżeń stanowi raczej punkt wyjścia do otwarcia dyskusji podczas obrony, nie dyskredytując sposobu prowadzenia narracji przez Autorkę, ani jakości zaprezentowanych wyników.

1. **Wstęp.** Rozdział ten obejmuje blisko 90 stron i chwilami przypomina oddzielną monografię, zawierającą dygresje niezwiązane bezpośrednio z hipotezą (np. szczegółowe dywagacje anatomiczne, które stanowią wiedzę opisową dostępną w atlasach i podręcznikach). Może niekoniecznie dobrym pomysłem było wstawienie do wstępu szczegółowego opisu klatki IntelliCage (w mojej ocenie jest to raczej aspekt metodyczny pracy). Z kolei rozdział o modelach zwierzęcych w badaniach neurobiologii został potraktowany chyba zbyt skrótowo. Autorka opisała tylko system *Cre/loxP* oraz modele oparte o podania wektora AAV, w mojej ocenie zabrakło porównania do modeli opartych o podania wektorów LVV (korzyści vs problemy) a także odniesienia do przecież rewolucyjnej techniki edycji genów CRISPR/Cas9 – być może nie mającej zastosowania w konkretnym przypadku u Autorki pracy, ale stanowiącej o zmianie podejścia do transgeniki także w modelach in-vivo na przestrzeni ostatnich lat.
2. **Aspekt różnic płciowych.** Autora analizowała kohorty zarówno samic i samców w rozmaitych paradygmatach behawioralnych, obejmujących m.in. ocenę ogólnej aktywności, poziomu lęku, pamięci społecznej i interakcji społecznych. Jednak eksperymenty z udziałem klatek IntelliCage były prowadzone wyłącznie na samicach. Jakkolwiek jest to zrozumiałe ze względów metodycznych to jednak wymaga szerszego wyjaśnienia w kontekście interpretacji wyników.
3. **Sposób przedstawienia wyników.** Na rycinach: ryc. 9 i 24 – brak skali na fotografiach przedstawiających wykonane barwienia na skrawkach hipokampalnych; wszystkie ryciny z wizualizacją wyników w postaci „słupków” – brak pokazania indywidualnego rozkładu danych w postaci punktowej, co jest obecnie standardem przyjętym we wszystkich już czasopismach naukowych.

Podsumowując, stwierdzam, że wyniki uzyskane przez Panią mgr Natalię Chwin są bardzo wartościowe merytorycznie, zawierają duży element nowatorstwa i są dowodem biegłej znajomości skomplikowanych narzędzi badawczych. Przedłożona do oceny praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje wymaganą wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie naukowej oraz potwierdzają umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668).



W związku z wysoką oceną merytoryczną pracy doktorskiej, godną podkreślenia samodzielnością Doktorantki – zarówno w zakresie wykonania szerokiego pakietu metodycznego zrealizowanych badań jak i ich dojrzałej interpretacji – zwracam się z wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego o wyróżnienie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

dr hab. n med. Grzegorz Kreiner
Kierownik Zakładu Biochemii Mózgu
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
31-343 Kraków, Smętna 12