



Prof. dr hab. Krzysztof Zabłocki
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

Warszawa, 6 sierpnia 2022r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Lek. Andrzeja Królika, zatytułowanej „Udział niespecyficznych kanałów jonowych typu TRP (ang. transient receptor potential) przepuszczalnych dla jonów wapnia w procesach konsolidacji i rekonsolidacji pamięci”.
Promotor: Prof. dr hab. Elżbieta Salińska.

Kursywą zaznaczone są moje uwagi i pytania

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska dotyczy intensywnie badanego, w znacznym stopniu poznanego, ale nadal nie do końca zrozumiałego i opisanego, procesu zapamiętywania i sięgania do zasobów pamięci. Ta zdolność układu nerwowego jest charakterystyczna nie tylko dla człowieka i wyższych kręgowców ale też stwierdzona u wielu gatunków zwierząt bezkręgowych. Bez tej zdolności niemożliwe byłoby uczenie się czyli gromadzenie doświadczeń nawet tak podstawowych jak związanych ze zdobywaniem pokarmu i unikaniem zagrożeń. Nie ulega wątpliwości, że zapis pamięci krótkotrwałej, jej konsolidacja, utrwalanie w zasobach pamięci długotrwałej i przywoływanie stamtąd wymagają precyzyjnej kontroli i angażują szereg częściowo podobnych, ale też w znacznym stopniu odrębnych szlaków sygnałowych. Ich wspólną cechą jest aktywacja receptorów na powierzchni neuronów i indukcja sygnału wapniowego. Sygnał ten w bardzo dużym uproszczeniu polega na zmianie (wzrost i spadek) stężenia jonów wapnia w cytosolu, przy czym jony te pochodzą albo z magazynów wewnątrzkomórkowych (siateczki śródplazmatycznej) albo spoza komórki. Jeżeli zagłębimy się bardziej to okaże się, że nie chodzi tylko o stężenie Ca^{2+} ale także o wewnątrzkomórkową lokalizację tych zmian, ich szybkość i trwałość w czasie oraz charakterystykę oscylacji fali wapniowej wyrażanej poprzez częstotliwość i amplitudę. Wszystkie te parametry są specyficznym dekodowane przez odpowiednie białka, a zatem muszą powstawać w sposób ściśle kontrolowany i charakterystyczny dla specyficznej informacji jaka jest przenoszona w komórce. Do tego zadania komórki mają zestawy narzędzi molekularnych (ang. calcium toolkit), wśród których są kanały wapniowe, wymienniki jonów, pompy wapniowe, bufory wapniowe (białka cytosolowe i niektóre organella) oraz magazyny wapniowe. Każda z tych kategorii ma wiele podtypów i licznych przedstawicieli różniących się powinowactwem do jonów wapnia, szybkością działania i lokalizacją oraz specyficznością komórkowa i selektywnością. Współdziałanie tych narzędzi pozwala na wzbudzenie i wyciszenie prawidłowego sygnału wapniowego.

Do takich narzędzi należą białka z nadrodziny TRP, które mogą tworzyć kanały wapniowe w błonach plazmatycznych, a zatem przewodzić Ca^{2+} zgodnie z różnicą stężeń (potencjału elektrochemicznego).

Rozprawa doktorska Pana Andrzeja Królika charakteryzuje się zwięzłością i prostym podążaniem do osiągnięcia wyznaczonego celu. Ma tradycyjny układ. Po spisie skrótów i spisie treści

rozpoczyna się streszczeniami po polsku i angielsku po czym jest wstęp, założenia i cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski a na końcu jest Bibliografia.

W streszczeniu Autor użył niefortunnego sformułowania, które w skrócie oznacza, że kanały TRP są aktywowane wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} a jony te pochodzą z siateczki śródplazmatycznej. Po pierwsze kanały TRP są aktywowane jonami wapnia gdy ich stężenie zwiększa się, a nie wzrostem stężenia per-se, a po drugie Ca^{2+} w siateczce śródplazmatycznej też jest wapniem wewnątrzkomórkowych. Autorowi zapewne chodziło o to, że aktywność TRP zwiększa się wtedy, gdy podwyższone jest stężenie Ca^{2+} w cytosolu, a poprawniej, w cytoplazmie podstawowej. Ponadto, nie mówi się o ekspresji białek tylko ekspresji genów bo to geny są „wyrażane”. To uchybienie pojawia się też w dalszych częściach dysertacji.

We wstępie Autor przedstawił najważniejsze informacje o tym, czym jest pamięć, wyjaśnił pojęcie konsolidacji i rekonsolidacji pamięci oraz omówił związane molekularne podstawy tych zjawisk. Następnie skupił się na omówieniu kanałów jonowych z nadrodziny TRP krótko omawiając poszczególne rodziny i mechanizmy ich regulacji. Autor także wspomniał o napływie pojemnościowym jonów wapnia i w tym miejscu warto pamiętać, że o ile kanały TRP są aktywowane jonami Ca^{2+} to kanały aktywowane pojemnościowo są raczej hamowane zwrotnie przez Ca^{2+} napływający do komórki. Krótki opis syntetycznych inhibitorów TRP jest kolejnym podrozdziałem pracy. Autor słusznie zauważa, że oba omawiane w tym miejscu i wykorzystywane w części doświadczalnej związki są niespecyficzne i mogą wpływać na różne etapy odpowiedzi wapniowej komórek. Dlatego zasadne jest wykorzystanie także przeciwciał blokujących te kanały, co Autor uczynił i opisał w dalszej części pracy. *Zwracam uwagę, że IP3 to inozytolo 1,4,5- trisfosforan. Ponadto, lepiej jest pisać o wewnątrzkomórkowym stężeniu jonów wapnia, a nie ich poziomie. W polskim piśmiennictwie używa się nazwy ośrodkowy, a nie centralny układ nerwowy.*

Następnie Autor omawia dwa białka związane z formowaniem się pamięci. Są nimi neuralna cząsteczka adhezji komórkowej, która uczestniczy w tworzeniu połączeń między neuronami w czasie formowania pamięci oraz kinaza białkowa zależna od kalmoduliny CaMKII. Dostępne dane piśmiennictwa uzasadniają wybór tych białek.

W podrozdziale Znaczenie Projektu autor uzasadnia podjęcie opisywanych badań zwracając uwagę na pojawiające się w piśmiennictwie dane wskazujące na zmiany aktywności/ilości receptorów TRP w mózgach ludzi ze stwierdzonymi zaburzeniami neurologicznymi, którym towarzyszy upośledzenie funkcji poznawczych. *Chciałbym, żeby Autor wyjaśnił co miał na myśli pisząc, że omawiane kanały są kanałami bramkowanymi napięciem (str. 35, początek drugiego akapitu). Prosiłbym o rozwinięcie tego stwierdzenia w kontekście TRP.*

Rozdział Założenia i Cel Pracy jest napisany bardzo klarownie, chociaż nie wynika z niego w jaki sposób Autor planował rozróżnić napływ Ca^{2+} do komórek spowodowany zwiększeniem stężenia tych jonów w cytosolu na skutek ich wypływu z siateczki śródplazmatycznej od napływu pojemnościowego, do którego jony wapnia w cytosolu nie są potrzebne, ale jest aktywowany opróżnieniem magazynów wapniowych? Pobudzenie receptorów metabotropowych dla glutaminianu może aktywować oba efekty.

Rozdział Materiały i Metody. *W opisie sposobu podawania inhibitorów zabrakło informacji o podawaniu samego 8% DMSO jako kontroli w stosunku do podawania testowanych związków jako roztwór w tym rozpuszczalniku. Przy okazji wymieniania stosowanych przeciwciał dobrze jest podać numer katalogowy.*

Rozdział wyniki zaczyna się pokazaniem zdjęć obrazów otrzymanych metodą Western blot oraz wykonanych techniką immunohistochemiczną, *W pierwszym przypadku wolalby obejrzeć jeżeli nie całe membrany, to przynajmniej duże ich fragmenty. W drugim przypadku brakuje kontroli z zastosowaniem jedynie przeciwciała drugorzędowego w celu oceny potencjalnej niespecyficzności.*

Kolejne doświadczenia są behawioralne. Polegają one na liczeniu odsetka kurczątków unikających dziobania ziaren kojarzących się negatywnie, po zastosowaniu różnych protokołów dotyczących sposobu przeprowadzenia treningu oraz czasu podania inhibitorów receptorów TRP w stosunku do momentu rozpoczęcia treningu oraz czasu po jakim przeprowadzono testy behawioralne. Wykonano także podobne doświadczenia, w których w miejsce mało selektywnych inhibitorów podawano wysoce specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko wybranym receptorom. Dzięki temu uzyskane wyniki miały walor większej specyficzności.

Bazując na wcześniejszych danych piśmiennictwa wskazujących na to, że formowanie pamięci wiąże się z aktywacją metabotropowych receptorów glutaminergicznych mGluR1 i mGluR5 i w efekcie stymulacją odpowiedzi wapniowej komórek Doktorant przeprowadził podobne do powyżej opisanych z wykorzystaniem inhibitorów lub aktywatorów tych receptorów. Celem takiego podejścia było ustalenie stopnia zaangażowania białek TRP w procesie zapamiętywania po stymulacji receptorów, których udział w tym zjawisku był sugerowany wcześniej. Doktorant ustalił, że kanały TRP mają „... ważną, a może nawet kluczową rolę...” podczas konsolidacji i rekonsolidacji pamięci. *W tym miejscu zastanawiam się, jaki jest udział pojemnościowego napływu Ca^{2+} (SOCE), który także może być aktywowany poprzez metabotropowe receptory glutaminianu, wymaga udziału białek Stim i Orail i jest także wrażliwy na stosowane w pracy inhibitory. Czy profil odpowiedzi wapniowej pochodzącej od SOCE nie jest „dekodowany” przez białka związane z formowaniem pamięci?* W ostatniej części tego rozdziału Autor wykazuje, że trening lub jego przypomnienie prowadzi do zwiększenia zawartości białek NCAM i CaMKII w homogenatach rejonów IMM uzyskanych z obu półkul mózgu. Białko NCAM jest związane z adhezją komórkową a CaMKII jest kinazą białkową zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny. Oba białka są uznane za biorące udział w procesie zapamiętywania. Doktorant pokazał także, że zahamowanie aktywności TRP z wykorzystaniem SKF96365 zapobiega temu zwiększeniu. Ze względu na to, że w żadnych ze stosowanych warunków doświadczalnych nie obserwowano zmian poziomu transkryptów kodujących te białka Autor uznał, że regulacja ta odbywa się raczej na poziomie translacji, chociaż w mojej opinii nie można też wykluczyć zmian szybkości degradacji białek.

Dyskusja jest bardzo interesująco napisanym rozdziałem. Składa się z kilku podrozdziałów, w których Autor omawia stosowany w pracy model zwierzęcy, zwracając uwagę na jego zalety, następnie ogólnie omawia rolę kanałów TRP w mózgu kurczątków, po czym skupia się szczegółowo na znaczeniu tych kanałów i skutkach ich blokowania w formowaniu pamięci. W tym fragmencie Autor powołuje się na liczne pozycje piśmiennictwa i omawia swoje wyniki na tle danych uzyskanych w innych modelach doświadczalnych (inne zwierzęta, inne bodźce, inne protokoły). Ponadto, zwraca uwagę na nowatorski aspekt swojej pracy, jakim jest powiązanie metabotropowej odpowiedzi receptorów glutaminianowych z aktywacją receptorów TRP w procesie zapamiętywania. Podobnie bogato przedyskutowany jest udział białek, w tym białek testowanych przez Doktoranta, w formowaniu pamięci. Wykazanie, że ich zwiększona zawartość w komórkach jest zależna od aktywacji receptorów TRP ma także charakter nowatorski.

W ostatnim rozdziale pracy jakim są Podsumowanie i Wnioski Autor w 5 punktach zwięźle wymienia najważniejsze wyniki swojej pracy i na końcu umieszcza ogólny wniosek dotyczący znaczenia kanałów TRP w badanych procesach kuszając się o sugestię, że umiejętne regulowanie aktywności TRP mogłoby mieć znaczenie w terapii niektórych zaburzeń pamięci.

Podsumowując, recenzowana rozprawa dostarcza wielu nowych i ciekawych informacji, a jasno sformułowane cele cząstkowe osiągnięto przy pomocy dobrze opisanych metod doświadczalnych. Uzyskane wyniki z pewnością mają walor nowości i chociaż nie zawsze są łatwe do interpretacji zdecydowanie wzbogacają wiedzę o mechanizmach biochemicznych leżących u podstaw zapamiętywania. Nieliczne uwagi i komentarze zamieszczone w recenzji nie wpływają na moją pozytywną ocenę tej pracy. Zwracam też uwagę na fakt, że część wyników została już opublikowana w *Neurobiology of Learning and Memory*.

Dlatego uważam, że zgodnie z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia oczekiwane wymagania, a zatem zgłaszam wniosek o dopuszczenie Pana Andrzeja Królika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Krzysztof Zabłocki