Streszczenie

Fundamentalną własnością mózgu jest jego plastyczność, czyli zdolność do zmian pod wpływem określonych bodźców. Umożliwia ona procesy uczenia się, adaptację do zmiennego środowiska, a także zajście procesów kompensacyjnych po różnego typu uszkodzeniach mózgu. Neuroplastyczność na poziomie komórkowym zachodzi głównie poprzez reorganizację funkcjonalną oraz strukturalną synapsy i jej okolic, a różnorodne formy plastyczności synaptycznej są powszechnie uznawane za substrat uczenia się i pamięci. Uważa się, iż plastyczność synaptyczna w formie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang. long-term potentiation, LTP) oraz długotrwałego osłabienia synaptycznego (ang. long-term depression, LTD) w odniesieniu do obwodów korowych jest silnie skorelowana z treningiem behawioralnym. Chociaż w ostatnich latach były prowadzone intensywne badania, które miały na celu wyjaśnienie mechanizmu udziału LTP i LTD w zmianach zachodzących w korze pod wpływem uczenia się nasza wiedza na ten temat pozostaje niepełna. Wielowątkowe badania, prowadzone szczególnie w ostatnim dziesięcioleciu, zdają się wskazywać na to, że ważnym elementem składowym korowych mechanizmów plastycznych może być aktywność proteolityczna mogąca potencjalnie stanowić element łączący plastyczność funkcjonalną i strukturalną. W rzeczy samej, pojawia się coraz więcej doniesień, iż w procesach neuroplastyczności mózgu bardzo ważną funkcję odgrywają metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. matrix metalloproteinases, MMPs). Są to enzymy proteolityczne, które posiadają zdolność do modyfikacji składników macierzy pozakomórkowej i jak wiadomo spełniają kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych (np.: embriogeneza, gojenie się ran), ale też w stanach patologicznych (m.in. rozwój nowotworów, stany epileptyczne). W kontekście procesów plastycznościowych najlepiej poznano rolę MMP-9 oraz MMP-3 w tych procesach w hipokampie, korze przedczołowej oraz korze wzrokowej. Jednakże udział MMPs w plastyczności synaptycznej oraz uczeniu się w korze somatosensorycznej nie był dotychczas badany.

Celem prezentowanej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu treningu w paradygmacie warunkowania klasycznego oraz aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej na długotrwałą plastyczność synaptyczną w korze baryłkowej myszy. Pomimo, iż sporo wiadomo już na temat procesów plastycznościowych zachodzących w korze mózgowej w wyniku uczenia się to nie istnieją dotychczas żadne dane literaturowe pokazujące w jaki sposób trening awersyjny wpływa na długotrwałe wzmocnienie i osłabienie synaptyczne w korze baryłkowej myszy na poziomie pojedynczych komórek nerwowych. Nie badano jak

dotąd również zaangażowania proteaz macierzy zewnątrzkomórkowej w ten proces. W niniejszej rozprawie zbadano i opisano te zagadnienia.

Przy zastosowaniu techniki patch-clamp, z wykorzystaniem protokołu indukcji plastyczności polegającego na precyzyjnym czasowym parowaniu aktywności presynaptycznej z postsynaptyczną (STDP) dowiedziono, iż trening w paradygmacie warunkowania klasycznego silnie wpływa na indukcję i ekspresję LTP w projekcji wertykalnej IV-II/III kory baryłkowej myszy. Ponadto wykazano także, z użyciem metody żelatynolitycznej zymografii *in situ* oraz technik immunofluorescencyjnych, iż w wyniku treningu behawioralnego aktywność żelatynaz w korze somatosensorycznej myszy wzrasta. Co więcej, LTP w rozpatrywanej projekcji jest, w wyniku treningu awersyjnego, nie tylko upośledzone, ale wręcz występuje trend w kierunku indukcji LTD. Dodatkowo z niniejszymi zmianami nie są związane zmiany w endogennej pobudliwości neuronów piramidowych warstwy II/III kory baryłkowej myszy. Ponadto, w wyniku w paradygmacie warunkowania klasycznego nie ulegają zmianie parametry elektrofizjologiczne badanych neuronów, ani nie zmienia się bazowa transmisja synaptyczna. Również LTD indukowane protokołem STDP nie jest modulowane przez wcześniejszy trening awersyjny.

Badając wpływ treningu w paradygmacie warunkowania klasycznego na procesy plastycznościowe kory somatosensorycznej myszy zauważono, iż trening ten niezwykle silnie wpływa na układ GABAergiczny. W szczególności Urban-Ciećko i współautorzy (2010) dowiedli, iż w wyniku treningu behawioralnego następuje zwiększenie GABAergicznego prądu tonicznego w komórkach pobudzających warstwy IV oraz jego zmniejszenie w interneuronach tej samej warstwy. Dlatego też w ramach kolejnego etapu pracy doktorskiej zbadałam wpływ treningu w paradygmacie warunkowania klasycznego na prąd toniczny neuronów warstwy II/III kory baryłkowej myszy. Uzyskane przeze mnie wyniki pokazały po raz pierwszy, iż uczenie się indukuje zmiany w prądzie tonicznym rejestrowanym z komórek warstwy II/III kory baryłkowej myszy. Co ważne, zmiany, które zaobserwowałam zależały od rodzaju komórki, z której były przeprowadzane rejestracje i nie były sprzężone ze zmianami parametrów potencjałów czynnościowych ani biernych własności błony danego neuronu. Wynik ten jest niezwykle ciekawy, gdyż poszerza naszą wiedzę o mechanizmach plastyczności wywoływanej treningiem behawioralnym.

Ponadto w niniejszej rozprawie doktorskiej udowodniono, iż farmakologiczna blokada aktywności MMP-9 zaburza indukcję LTP, ale nie LTD indukowanego za pomocą paradygmatu STDP. Wynik ten pokazuje, iż zaangażowanie poszczególnych metaloproteinaz w procesy plastycznościowe jest specyficzne dla danej formy plastyczności, jak i dla ścieżki,

w której plastyczność ta jest wywoływana.

Reasumując, niniejsza rozprawa doktorska pokazuje po raz pierwszy, iż LTP w korze somatosensorycznej myszy zależy od aktywności MMPs i jest silnie modulowane przez trening w paradygmacie warunkowania klasycznego. Dodatkowo w modelu tym trening awersyjny wpływa na hamowanie toniczne oraz na aktywność żelatynaz.

Abstract

A remarkable property of the brain is its plasticity which is manifested as its ability to change in response to specific stimuli. Plasticity enables the brain to learn, adapt to a changing environment as well as allows for the compensatory processes to occur after various types of brain injury. At the cellular level, the best known form of neuroplasticity refers to structural and functional reorganization of the synapse and its surroundings. Importantly, multiple forms of synaptic plasticity are thought to represent the cellular substrate of learning and memory. It is well established that synaptic plasticity in the form of long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) is strongly associated with behavioral training. Although, extensive research has been conducted in recent years concerning the mechanism of LTP and LTD participation in training-induced cortical plasticity our knowledge on this issue remains incomplete. It seems that proteolytic activity is a good candidate for linking structural and functional forms of plasticity. Indeed, over the *past* decade an *extensive body* of evidence has documented the pivotal role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the brain plasticity processes. MMPs are zinc-dependent proteolytic *enzymes* that have the ability to modify the components of the extracellular matrix and to regulate many physiological (eg. embryogenesis, wound healing) and pathological (including cancer development, epileptic states) processes. *MMP-9* an MMP-3 are by far the most widely studied proteases in the *context* of synaptic *plasticity*, learning, and memory especially in the hippocampus, prefrontal cortex and visual cortex. However, the contribution of MMPs to synaptic plasticity and learning in the somatosensory cortex has not been studied so far.

The main goal of the present thesis was to examine the impact of the behavioral training in the classical conditioning paradigm and the activity of MMPs on long-term synaptic plasticity in the barrel cortex of mouse. Although much is already known about the plasticity processes occurring in the cerebral cortex as a result of learning, there are no data showing how behavioral training in the classical conditioning paradigm affects LTP and LTD in the mouse

somatosensory cortex at the *level* of *individual* cells. The involvement of MMPs in this process also has not been studied so far. This dissertation addresses these questions.

Herein, it has been demonstrated, that associative learning strongly influences the induction and expression of LTP evoked by spike timing-dependent plasticity protocol (STDP) in the layer IV to II/III vertical pathway of the mouse barrel cortex. Moreover, prior sensory learning results in the inability of the system to develop STDP-induced LTP in the considered pathway, showing even a trend to reverse polarity of this plasticity to LTD. It is worth mentioning that LTP impairment has not been associated with any changes in the intrinsic electrophysiological properties of pyramidal neurons in layer II/III of the mouse barrel cortex or baseline EPSPs (excitatory postsynaptic potentials) recorded in this layer. Additionally, LTD induced by the STDP protocol is not modulated by previous behavioral training in the classical conditioning paradigm. Moreover, the plasticity-induced upregulation of gelatinases activity estimated by in situ zymography in the somatosensory cortex has been observed.

In general, several lines of evidence indicate that behavioral training triggers prominent plastic changes concerned primarily the GABAergic system in the barrel cortex, which may affect glutamatergic synaptic plasticity. In particular, it has been proved that modulation of this system is reflected by changes in tonic current intensity in a neuron-specific manner, the mechanism which may strongly regulate the neuronal excitability. Therefore, the next step of this *PhD dissertation* was to assess the impact of classical conditioning training on the GABAergic tonic current intensity in the layer II/III neurons in my model. Obtained results provided the first evidence that that sensory learning results in a strong decrease in GABAergic tonic currents in the layer II/III interneurons but not in pyramidal cells. Importantly, the observed plasticity changes were not connected with any changes in intrinsic electrophysiological properties of examined neurons.

As mentioned above, MMPs emerged as crucial players in learning and synaptic plasticity in other brain regions. I was thus interested whether plasticity processes in the barrel cortex depend on these enzymes. It has been proven in this *PhD thesis* that the pharmacological blockade of MMP-9 activity (but not MMP-3) abolished LTP having no effect on LTD induced by the STDP paradigm. This result suggest that the involvement of MMPs in plasticity processes is not only pathway specific but also depends on a form of induced plasticity.

In conclusion, this dissertation shows for the first time that LTP in the somatosensory cortex of mice relies on the activity of MMPs and is strongly modulated by training in the classical conditioning paradigm. Additionally, considered here paradigm of sensory learning is

associated with plasticity of the GABAergic tonic inhibition and upregulation of gelatinases activity.