



**Instytut Farmakologii  
im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk**

*Prof. dr hab. Krzysztof Tokarski*  
*Zakład Fizjologii*  
*tel.: 126623239*  
*e-mail: ktok@if-pan.krakow.pl*

*Kraków 27.10.2021*

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Ewy Jatczak-Śliwy pt.:

**“Wpływ mutacji wybranych reszt w miejscu wiązania agonisty na kinetykę receptora GABA<sub>A</sub> oraz jego modulację przez zmiany zewnątrzkomórkowego pH i flurazepam”**

W ostatnich latach na świecie obserwuje się gwałtowny wzrost częstotliwości występowania schorzeń afektywnych oraz zaburzeń lękowych. Niewątpliwie istotną rolę w powstawaniu, rozwoju i przebiegu tych schorzeń odgrywają czynniki psychologiczne. Uważa się, że za wystąpienie zaburzeń lękowych w 30% odpowiadają czynniki genetyczne, natomiast czynniki środowiskowe aż w 70%. Coraz powszechniejsze nerwice i depresja uważane są za choroby cywilizacyjne związane ze stresem życia we współczesnym świecie. Wiadomo, że przewlekły stres doprowadza do zaburzenia homeostazy organizmu. Prawidłowa praca mózgu opiera się na współdziałaniu kilku układów, z których największymi są układ pobudzający – glutaminergiczny oraz hamujący układ GABA-ergiczny. Obydwa te układy mają fundamentalne znaczenie w utrzymaniu homeostazy ośrodkowego układu nerwowego. Zaburzenia prawidłowego funkcjonowania układu GABA-ergicznego są obserwowane w przebiegu nerwic i schorzeń afektywnych. Skuteczne leczenie tych schorzeń stało się możliwe w latach 60 XX wieku wraz z odkryciem leków z grupy benzodiazepin czyli substancji nasilających powinowactwo kwasu  $\gamma$ amino-masłowego do receptorów GABA<sub>A</sub>. Początkowy entuzjazm związany z pojawieniem się leków przynoszących ulgę milionom pacjentów spowodował, że nie zwracano uwagi na skutki wywoływane przez ich stosowanie. Dopiero po pewnym czasie dostrzeżono problem tolerancji oraz uzależnienia związanego z długotrwałym używaniem benzodiazepin. Benzodiazepiny zaliczane do pozytywnych allosterycznych modulatorów



receptora GABA<sub>A</sub> są jedną z najlepiej opisanych grup psychoaktywnych leków. Paradoksalnie mechanizmy modulacji receptora GABA<sub>A</sub> przez benzodiazepiny oraz sam proces aktywacji tego receptora jest można powiedzieć poznany w ogólnych zarysach. Niewątpliwie jest to związane zróżnicowaniem budowy podjednostkowej receptorów GABA<sub>A</sub>, warunkującej wrażliwość tego fascynującego receptora na wiązanie cząsteczek mających do niego powinowactwo. Receptor GABA<sub>A</sub> jest oparty na kanale jonowym przepuszczalnym dla jonów chlorkowych, jednakże miejsce wiązania agonisty znajduje się w stosunkowo dużej odległości od bramki dla kanału jonowego. Ten fizyczny dystans wymusza zaangażowanie w proces aktywacji szeregu zmian konformacyjnych przenoszących energię wiązania do otwarcia bramki kanału jonowego. Skład podjednostek budujących receptor GABA<sub>A</sub> wpływa także na jego właściwości biofizyczne czyli na procesy dezaktywacji i desensytyzacji. Biorąc pod uwagę powyższe, wybór celu pracy jest jak najbardziej aktualny i uzasadniony.

Autorka pracy w obszernym, ale jednocześnie konkretnym wstępie sprawnie przybliży problematykę wpływu różnych podjednostek GABA<sub>A</sub> na funkcje receptora. Zostały przedstawione racjonalne kryteria doboru tematu badawczego, z punktu widzenia ważności mutacji pojedynczych aminokwasów dla ogólnej kinetyki działania receptora. Metody zostały opisane w sposób bardzo przystępny, co jednoznacznie wskazuje na bardzo dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną z zakresu elektrofizjologii kanałów jonowych, makro- oraz mikroskopowych metod pomiarowych ich aktywności, jak również metod symulacji modelu kinetycznego. Nawet osoba relatywnie słabo zaznajomiona z tematyką pracy doktorskiej jest w stanie na podstawie wstępu i opisanej metodologii zrozumieć istotę problemu badawczego, co bardzo dobrze świadczy o jakości rozprawy doktorskiej.

W badaniach doktorantka skupiła się na określeniu roli dwóch mutacji reszt aminokwasowych:  $\alpha_1$ F64L oraz  $\beta_2$ E155C. Obydwie były wywoływane w receptorze typu  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ . Badany był wpływ wyżej wymienionych mutacji na właściwości kinetyczne receptora zarówno przy podaniach naturalnego agonisty, jakim jest GABA, jak i wpływ na działanie związku należącego do benzodiazepin – flurazepamu, oraz wpływ na wrażliwość receptora na zmiany pH płynu zewnątrzkomórkowego. Eksperymenty patch clamp zostały przeprowadzone zarówno w konfiguracjach whole-cell i outside-out przy badaniu prądów makroskopowych, oraz w konfiguracji cell-attached w rejestracji prądów mikroskopowych, tj. przepływających przez pojedyncze kanały jonowe.



Wykonane przez doktorantkę doświadczenia przekonująco scharakteryzowały udział reszty aminokwasowej fenyloalaniny  $\alpha_1F64$ , znajdującej się w miejscu wiązania agonisty, w ustalaniu wrażliwości receptora  $GABA_A$  na protony. Ponadto doktorantka zbadała udział mutacji wyżej wymienionej reszty aminokwasowej -  $\alpha_1F64C$  w efektach działania flurazepamu, zarówno dla prądów wywołanych podaniem agonisty, jak i dla spontanicznej aktywności kanału  $GABA_A$ . Ponadto przeprowadzone zostały badania nad rolą reszty  $\beta_2E155$  mechanizmie aktywacji receptora  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ .

Nawiązując do prowadzonych przez Panią magister badań, na temat wpływu zmian pH płynu zewnątrzkomórkowego na aktywność receptora  $GABA_A$ , czy uważa Pani, że ww. zjawisko może odgrywać rolę w neurodegeneracji związanej z ekscytotoksycznością, gdzie jednym z czynników patofizjologicznych jest nadmierna aktywność neuronalna i związane z nią zmiany pH środowiska zewnątrzkomórkowego?

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej niewątpliwie poszerzają naszą wiedzę o mechanizmie działania receptora  $GABA_A$ , co wydaje się niezwykle ważne w kontekście roli tego receptora w etiologii zdecydowanej większości zaburzeń neurologicznych i neuropsychiatrycznych. Każda dodatkowa „cegiełka” wiedzy o działaniu tak ważnego białka receptorowego pozwala z mniejszą niepewnością podchodzić do projektowania cząsteczek modulujących działanie tego receptora, zarówno w kontekście wzmacniania jak i osłabiania jego aktywności, w zależności od tego co może być klinicznie korzystne w farmakoterapii danej jednostki chorobowej.

Przedstawiona praca doktorska w sposób rzetelny i kompleksowy prezentuje badania prowadzone przez doktorantkę. Wysoki poziom merytoryczny wstępu, metod, prezentacji wyników oraz dyskusji pozwala poznać Panią Magdalenę Ewę Jatczak-Śliwę jako dojrzałego naukowca operującego bogatym warsztatem badawczym.

Biorąc pod uwagę wartość poznawczą pracy doktorskiej, jej oryginalność oraz potencjalne implikacje kliniczne uważam, że oceniana przeze mnie rozprawa zatytułowana **“Wpływ mutacji wybranych reszt w miejscu wiązania agonisty na kinetykę receptora  $GABA_A$  oraz jego modulację przez zmiany zewnątrzkomórkowego pH i flurazepam”** spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), wymagane dla pracy doktorskiej i przedstawiam Wysokiej



**Instytut Farmakologii  
im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk**

Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Ewy Jatczak-Śliwy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W związku z wysokim poziomem pracy oraz ważnym wpływem uzyskanych na zrozumienie funkcjonowania jednego z najbardziej istotnych układów neuroprzekąźnictwa jakim jest układ GABAergiczny z całym przekonaniem sugeruję Wysokiej Radzie uznanie rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Ewy Jatczak-Śliwy za wyróżniającą się.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Krzysztof Tokarski