

Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii
Katedra Fizjologii Zwierząt
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
☎: (+12) 664-53-73
E-mail: marian.lewandowski@uj.edu.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister **Magdaleny Ewy JATCZAK-ŚLIWY** pt.

"Wpływ mutacji wybranych reszt w miejscu wiązania agonisty na kinetykę receptora GABA_A oraz jego modulację przez zmiany zewnątrzkomórkowego pH i flurazepam"

Przedstawiona do oceny dysertacja stanowi kolejne bardzo solidne opracowanie wyników badań przeprowadzonych pod opieką Profesora Jerzego Mozrzymsa w Katedrze Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego. Przedmiotem badań Pani mgr Ewy Jatczak-Śliwy był receptor GABA_A, który jest głównym transbłonowym kanałem jonowym, uczestniczącym w procesach hamowania ośrodkowego układu nerwowego. Skomplikowanie budowy receptora GABA_A, przede wszystkim jednak molekularne mechanizmy jego funkcjonowania są przedmiotem dużego zainteresowania, zważywszy szczególnie, że zaburzenie tej ważnej neurotransmisji, może być przyczyną wielu przypadłości neurologicznych, a on sam jest miejscem wiązania wielu bardzo ważnych specyfików farmakologicznych stosowanych w praktyce klinicznej. Wybór tematu badawczego dysertacji mgr Jatczak-Śliwy uważam zatem za bardzo trafny i ważny, również z tego powodu, że zrealizowany został w jedynej grupie badawczej w kraju, tak kompleksowo zajmującej się aktywnością receptorów GABA. W badaniach autorka skupiła swoją uwagę na wykazaniu zależności funkcjonalnej najbardziej powszechnej izoformy receptora GABA – $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ od jego struktury, a szczególnie udziału dwu reszt aminokwasowych fenyloalanienu i glutaminianu budujących odpowiednio podjednostki α_1 i β_2 , kluczowe w wiązaniu agonisty receptora GABA i jego modulacji. Wybór tych miejsc nie był przypadkowy, znajdują się bowiem one w znacznej odległości od poru kanału, co

sugeruje, a częściowo zostało to już udowodnione, ich zaangażowanie w cały proces aktywacji kanału, czyli jego preaktywację, otwarcie – zamknięcie i desensytyzację.

Zwyczajowo w recenzjach rozprawy doktorskiej piszę się o jej typowym układzie. Dysertacja Pani mgr Ewy Jatczak-Śliwy, jest w swojej redakcji nietypowa. Po streszczeniu pracy mamy przedstawiony jej szczegółowy cel, który przeważnie kończy wstęp. To oczywiście nie jest błąd, a być może tylko chęć zwrócenia szczególnej uwagi czytającego i słusznie na ważność podjętych przez doktorantkę badań?

W dobrze napisanym wstępie autorka wprowadza czytającego w badane zagadnienia, przedstawia krótką historię pierwszych rejestracji elektrofizjologicznych, kończąc na technice *patch-clamp*, wykorzystanej w swoich badaniach, by następnie przejść do szczegółowego opisu badanych receptorów, ich form transmisji, przebiegów prądowych, kinetyki, ich aktywacji i modulacji. Ciekawy jest *passus* dotyczący pobudzającej roli GABA, którą autorka wiąże tylko z tzw. „*przełącznikiem rozwojowym*” układu nerwowego. Jednak nie tylko jest ona charakterystyczna dla niedojrzałego mózgowia, również w dojrzałym ośrodkowym układzie nerwowym w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza obserwujemy okołodobową zmianę aktywności GABA z pobudzającej w ciągu dnia na hamującą w nocy (*The Journal of Physiological Sciences volume 68, pages 333–343 (2018)*). Całość logicznie napisanego wstępu oparta jest na bogato cytowanej literaturze, także wielu publikacjach grup badawczych profesora Mozrzymasa, a uzupełniają ją czytelne schematy i oryginalne przebiegi prądowe.

Badania przeprowadzone zostały na komórkach linii HEK293 transfekowanych plazmidowym cDNA kodującym podjednostki GABA_A, również te ze zmutowanymi resztami aminokwasów badanych podjednostek, które pozyskano z zaprzyjaźnionych zagranicznych laboratoriów. Ich namnażanie oraz sprawdzanie jakości i stężenia prowadzone było w macierzystej pracowni i innych placówkach naukowych Wrocławia. Do pomiarów elektrofizjologicznych prądów makroskopowych i mikroskopowych (pojedynczych kanałów) płynących przez receptory GABA, autorka wykorzystwała technikę *patch-clamp*, stosując kilka jej konfiguracji. Aktywacja receptora odbywała się poprzez podanie jego agonisty bądź blokera kanałów chlorkowych, a do jego modulacji stosowano flurazepam. Wpływ odczynu środowiska na aktywację receptora, autorka badała poprzez zmianę pH roztworu. Podawanie roztworów odbywało się w dwu systemach: ultra szybkim przy użyciu kapilary *theta glass* i wolniejszym wielokanałowym. W rejestrowanych prądach

Pani mgr Jatzak-Śliwa analizowała ich czas narastania, maksymalną amplitudę, makroskopową desensytyzację i deaktywację, a także amplitudę prądu przebicia charakterystyczną dla receptorów zmutowanych. Stosowane techniki pomiarowe, jak i metody analizy mierzonych parametrów prądowych, nie budzą żadnych zastrzeżeń. Natomiast warte podkreślenia jest zastosowanie przez doktorantkę modelu symulacji kinetycznej mechanizmu aktywacji receptora, zarówno w odniesieniu do prądów makro- i mikroskopowych i ich porównanie z pomiarami w warunkach eksperymentalnych. Takie podejście dodatkowo uwiarygadnia przedstawione wyniki, które w dużej części zostały już opublikowane w kilku bardzo dobrych czasopismach z Listy Filadelfijskiej o wysokim współczynniku przebicia. Wprawdzie autorka nie umieszcza osobnego spisu tych publikacji w swojej pracy doktorskiej i może szkoda, to jednak bardzo wyraźnie nawiązuje do wyników tych badań, opisując zakres swojego udziału w publikacjach wieloautorskich, wskazując także na zupełnie nowe elementy uwzględnione i opisane tylko w dysertacji, których inspiracją do badań, były wyniki wcześniej otrzymane. Na szczególną uwagę zasługują dwie publikacje, których mgr Jatzak-Śliwa jest pierwszym autorem. Obie ukazały się w *Frontiers in Cellular Neuroscience* w 2018 i 2020 roku. Z tekstu rozprawy i oryginalnych publikacji, można także wyczytać, że prezentowane przez autorkę wyniki są efektem realizacji projektów badawczych. Zwracam na te dwa fakty (publikacje i granty) uwagę, bowiem są one ważne w ocenie dysertacji Pani Jatzak-Śliwy. Z jednej bowiem strony sam projekt badań został wcześniej oceniony przez ekspertów, z drugiej zaś otrzymane wyniki zanim zostały opublikowane, także poddane były kolejnej eksperckiej ocenie. Fakt ten uwiarygadnia otrzymane wyniki, podnosi ich wartość i ułatwia ocenę rozprawy doktorskiej.

W badaniach dotyczących wpływu protonów na aktywność badanego receptora, autorka uwzględniła do tej pory nieanalizowany, najnowszy jego kinetyczny model, notabene także opracowany w zespole macierzystej Pracowni. Wykazała, że mutacja reszty fenyloalaniny w pozycji 64 podjednostki α_1 receptora GABA_A, powoduje obniżenie amplitudy prąd, a wzmaga kinetykę makroskopowej desensytyzacji przy pH między 6.0, a 8.0 po podaniu GABA, czy kwasu piperydino-4-sulfonowego, częściowego agonisty badanego receptora. Autorka postanowiła także sprawdzić udział drugiej ważnej w wiązaniu agonisty podjednostki β receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ w modulacji protonowej. Szczególnie, że raportowane są pewne różnice w kinetyce makroskopowej desensytyzacji w receptorze jej

pozbawionej. Wyniki nie wykazały jednak różnic w modulacji badanych receptorów przy kwaśnym pH, poza kilkoma w kinetyce ich deaktywacji. Brak różnicy autorka uważa za pewne „zaskoczenie” i tłumaczy sugerując przejęcie funkcji brakującej podjednostki β_2 przez γ_2 , co można przypuszczalnie uznać za pewien rodzaj „plastyczności receptora”, wynikającej z jego znaczenia fizjologicznego? Cykl pomiarów dotyczący modulującego wpływu benzodiazepin, w pracy doktorskiej autorka użyła flurazepan, to także uzupełnienie wyników wcześniejszych badań, opublikowanych przez doktorantkę i zespół profesora Mozrzymsa. Zarówno w receptorach natywnych, jak i zmutowanych flurazepan powodował wyraźne zwiększenie ich spontanicznej aktywności, czyli proces otwierania i zamykania receptora. Doktorantka potwierdziła także swoje wcześniejsze obserwacje, że receptor niezwiązany z ligandem nie podlega preaktywacji, a spontaniczna i wywołana podaniem agonisty aktywność zmutowanych receptorów, może ulegać procesowi desensytyzacji. Swego rodzaju odkryciem prowadzonych badań, była rejestracja w zmutowanych podjednostkach α_1 i β_2 badanego receptora tzw. zjawiska przebiecia prądu (*overshoot*) ponad linię bazową, obserwowaną w przebiegu prądu makroskopowego po zakończeniu podania agonisty i udziału w tym zjawisku spontanicznej aktywności kanałów. Analizując udział drugiej reszty aminokwasowej (glutaminianu) izoformy badanego receptora – podjednostki β_2 , mgr Jaczak-Śliwa wykazała, że bierze ona udział głównie w etapie preaktywacji mechanizmu jego brakowania. Zmutowana forma receptora do jego aktywacji wymaga większego stężenia GABA, a kinetyka prądów makroskopowych ulega istotnym zmianom. Między innymi krzywa przebiegu prądu nie posiada szybkiej składowej desensytyzacji, a kinetyka deaktywacji była przyśpieszona i dodatkowo prądy te charakteryzowała mała amplituda, co w konsekwencji zmniejsza prawdopodobieństwo otwarcia zmutowanych receptorów w porównaniu od ich formy natywnej. Otrzymane wyniki potwierdzone zostały także w symulacjach makroskopowych, co dodatkowo potwierdza końcowy wniosek, że reszta glutaminianowa zlokalizowana na podjednostce β_2 bierze udział w procesie wiązania agonisty, etapie bramkowania kanału, ale jak wcześniej stwierdzono głównie w procesie preaktywacji receptora.


Podsumowując, stwierdzam, że Pani mgr Jaczak-Śliwa w przedstawionej dysertacji osiągnęła zamierzone cele. Swoimi wynikami, będącymi efektem logicznie zaplanowanych, a następnie konsekwentnie wykonanych trudnych i „kapryśnych” elektrofizjologicznych pomiarów, znacząco uzupełniła wiedzę dotyczącą molekularnej aktywności najważniejszego

i czolowego GABAergicznego receptora hamujacego ośrodkowego układu nerwowego. Stwierdziła jednoznacznie, że nawet daleko położone od poru kanału badanego receptora strukturalne elementy α_1 i β_2 badanej podjednostki receptora GABA_A, znacząco wpływają na jego kinetykę. Nie mam żadnych uwag do merytorycznej strony otrzymanych i diskutowanych wyników, szczególnie że są w one przedstawione i przedyskutowane w konfrontacji z dobrze i bogato dobraną literaturą w której, aż ponad 60% to prace ostatnich lat. Jednak, jako fizjologowi, brakuje mi pewnej szerszej refleksji dotyczącej ich fizjologicznego znaczenia. Jednozdaniowe stwierdzenie o uwzględnieniu otrzymanych wyników w projektowaniu nowych leków, jest zbyt skromne. To oczywiście nie jest błąd, nie taki bowiem był cel pracy, niemniej jednak ciekaw jestem, jak autorka widzi i jakie mogą być pomysły badań, które mogłyby uwzględnić otrzymane wyniki w bliższej lub dalszej ich konfrontacji z patologiami, które są/mogą być efektem zaburzeń funkcjonowania tej ważnej i interesującej neurotransmisji?

Uważam zatem, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 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.) i zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Jatzak-Śliwy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę ważność podjętego tematu badań, jego znaczenie w fizjologii i patologii ośrodkowego układu nerwowego, duży zakres przeprowadzonych systematycznych trudnych metodycznie badań, oraz fakt że były one realizowane w ramach ocenianych projektów, a także to że większość wyników jest już opublikowana w bardzo dobrych recenzowanych czasopismach, uważam, że praca doktorska Pani mgr Magdaleny Jatzak-Śliwy zasługuje na wyróżnienie.

Kraków dnia 18. październik 2021.


Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski