



prof. dr hab. Maria Stankiewicz

Toruń, 15.06.2021

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Marka Macieja Brodzkiego

Pt. „ Wpływ składu podjednostkowego i mutacji w pętli G na własności kinetyczne receptorów GABA (A) oraz badanie mechanizmów modulacji tych receptorów przez beznodiazepiny”

Promotor: Prof. dr hab. Jerzy Władysław Mozrzyms

Recenzję opracowano na podstawie pisma Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego z dnia 14 maja 2021. dotyczącego zlecenia sporządzenia recenzji rozprawy doktorskiej mgr Marka Macieja Brodzkiego.

Wartość naukowa rozprawy

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy funkcjonowania receptorów GABA_A w układzie nerwowym. Została zaprezentowana jako stanowiący tematyczną całość cykl trzech publikacji, zaopatrzonej wstępem ogólnym oraz rozdziałami stanowiącymi wprowadzenie do każdej z publikacji, podsumowaniem i wnioskami oraz spisem aktualnej literatury. Tekst rozprawy poprzedza jej streszczenie w języku polskim i angielskim. Na końcu manuskryptu załączone są szczegółowe oświadczenia współautorów o ich udziale w powstaniu poszczególnych prac.

Receptory GABA_A występują w synapsach hamujących i są głównym czynnikiem decydującym o zjawisku inhibicji w układzie nerwowym. Są więc czynnikiem, którego dysfunkcja ma istotny wpływ na zjawiska patologiczne mogące pojawiać się w działaniu układu nerwowego. Przeprowadzone badania wpisują się w ważny kierunek badań, których celem jest dokładne poznanie funkcjonowania receptorów GABA i zjawiska hamowania synaptycznego. Istnieją potencjalne możliwości wykorzystania tej wiedzy w terapii medycznej, w przypadku schorzeń związanych z dysfunkcją zjawiska inhibicji w ośrodkowym układzie nerwowym. Wykonane prace były kontynuacją badań prowadzonych od wielu lat w pracowni elektrofizjologicznej pod kierownictwem Prof. Jerzego Mozrzymsa co w najwyższym stopniu gwarantowało wysoki poziom



przeprowadzonych eksperymentów i analizy ich wyników. Uzyskane wyniki są oryginalne, nowe, i stanowią istotny wkład w istniejący stan wiedzy na temat zależności strukturalno-funkcjonalnych w receptorach GABA_A. Zostały opublikowane w 3 recenzowanych, obszernych, oryginalnych artykułach w czasopismach o znacznym współczynniku oddziaływania, o łącznym IF = 12,05:

(1) Comparison of kinetic and pharmacological profiles of recombinant $\alpha 1\gamma 2L$ and $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA receptors - A clue to the role of intersubunit interactions

Marek Brodzki, Radosław Rutkowski, Magdalena Jatczak, Magdalena Kisiel, Marta M Czyzewska, Jerzy W Mozrzymas

Eur J Pharmacol . 2016 Aug 5; 784:81-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.05.015

IF = 3,170

(2) Distinct modulation of spontaneous and GABA-evoked gating by flurazepam shapes cross-talk between agonist-free and liganded GABA_A receptor activity

Magdalena Jatczak-Śliwa, Katarzyna Terejko, **Marek Brodzki**, Michał A. Michałowski, Marta M. Czyzewska, Joanna M. Nowicka, Anna Andrzejczak, Rakenduvadhana Srinivasan, Jerzy W. Mozrzymas

Front. Cell. Neurosci., 28 August 2018. doi.org/10.3389/fncel.2018.00237

IF = 3,921

(3) Mutations of $\alpha 1$ F45 residue of GABA_A receptor loop G reveal its involvement in agonist binding and channel opening/closing transitions

Marek Brodzki, Michał A Michałowski, Michalina Gos, Jerzy W Mozrzymas

Biochem Pharmacol 2020 Jul;177:113917. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113917

IF = 4,960

Publikacje te to prace zespołowe. Doktorant, mgr Marek Brodzki, w dwóch publikacjach jest pierwszym autorem i jego procentowy udział w powstaniu prac jest największy. Ponadto w obu publikacjach jest autorem korespondującym co ma bardzo istotne znaczenie w ocenie wkładu Doktoranta w powstanie publikacji. W trzeciej pracy jest autorem na 3 miejscu a jego udział nie jest mniejszy niż pozostałych współautorów. Udział Doktoranta jest więc w dwóch publikacjach jednoznacznie wiodący a w trzeciej znaczny co jest podstawą uznania wymienionych publikacji jako głównej części rozprawy doktorskiej.

Wartość merytoryczna rozprawy

We „wprowadzeniu” do Rozprawy doktorskiej została przedstawiona rola receptorów GABA_A oraz mechanizm ich aktywacji ze szczególnym zwróceniem uwagi na niedawno opisane



zjawisko preaktywacji, które zostało poddane szczegółowej analizie w jednej z publikacji. Opisany i pokazany jest też proces deaktywacji prądu wywołanego podaniem GABA oraz desensytyzacji receptorów przy wydłużonej obecności agonisty. Są to procesy, na które ma wpływ skład podjednostkowy receptora oraz czynniki modulujące i mutacje. Przedstawiony też został model kinetyczny działania receptora, do którego autor wraca w publikacjach i go uzupełnia. Prawidłowo dobrana treść „wprowadzenia” stanowi więc dobre przygotowanie czytelnika do zagadnień opracowanych i przedstawionych w załączonych artykułach.

Wszystkie wyniki eksperymentów przeprowadzonych w procesie przygotowywania rozprawy doktorskiej zostały ujęte w pracach już opublikowanych. Podlegały one krytycznej ocenie recenzentów w poszczególnych czasopismach. To samo dotyczy analizy, opisu wyników i ich interpretacji. Fakt, że artykuły zostały przyjęte do druku świadczy o tym, że spełniają one w 100 % wymogi naukowych prac badawczych i w związku z tym ponowna analiza ich jakości wydaje się zbyteczna. Jednak pragnę zwrócić uwagę, że przedstawione problemy zostały potraktowane wieloaspektowo. Podstawową metodą, którą wykorzystano w badaniach była metoda elektrofizjologiczna (*patch clamp*, w dwóch konfiguracjach). Badania uzupełnione zostały modelowaniem strukturalnym wraz z dokowaniem ligandów oraz modelowaniem kinetyki działania receptorów. Doświadczenia przeprowadzono również na mutantach receptorów. Opracowanie statystyczne jest znacznie rozwinięte. Razem zastosowane metody dają przekonujący, z nowymi elementami, obraz biofizyki i farmakologii funkcjonowania receptorów GABA_A.

Efektom poszczególnych publikacji są konkretne stwierdzenia. W pierwszej z nich **(1)** udowodniono, że **receptor pozbawiony dwóch jednakowych podjednostek, w których znajdują się miejsca wiązania agonisty (GABA) nie przestaje funkcjonować i wykazuje szereg podobieństw w działaniu do receptora natywnego**. Muszę przyznać, że taki wynik był dla mnie zaskoczeniem. Powstaje pytanie, na które pewnie odpowiedź nie jest znana....”po co było w procesie ewolucji komplikować strukturę receptora jak prostsza jego forma równie dobrze działa?”. Pewnie część odpowiedzi by brzmiała....że ”musiała powstać struktura bardziej skomplikowana by precyzyjniej pełnił swoje funkcje”A może Doktorant ma inną opinię w tym zakresie? Ponadto wydaje mi się, że jeżeli receptory w formie $\alpha_{1\gamma_{2L}}$ występują w ośrodkowym układzie nerwowym (co jak jest podane w dyskusji nie do końca jest pewne) to być może będą zachowywały się one jednak inaczej



w naturalnym ich środowisku niż w postaci białek sztucznie ekspresjonowanych. A co myśli o tym Doktorant? Oczekiwałamby również od Doktoranta kilku słów na temat w jaki sposób dane uzyskane przez porównanie funkcji receptora natywnego oraz receptora pozbawionego podjednostek beta wskazują że „long-range communication between subunits may shape receptor functioning” – jest to ostatnie zdanie z dyskusji w pierwszej pracy.

Druga publikacja **(2)** poświęcona jest głównie aktywności spontanicznej receptorów GABA_A oraz jej modulacji przez flurazepam –modulator receptorów GABA_A z grupy benzodiazepin. Aktywność spontaniczna receptorów GABA_A jest ważnym czynnikiem wpływającym na poziom inhibicji tonicznej w mózgu i jest uważana jako potencjalny „target” dla środków terapeutycznych w schorzeniach związanych ze zbyt niskim poziomem hamowania w mózgu. Wykazano, że **benzodiazepina podnosi aktywność spontaniczną receptora**. Ponadto uzyskano **wyniki, które podważają opinię, że receptory GABA_A mogą być aktywowane przez beznodiazepiny w nieobecności agonisty (GABA)**.

Trzecia publikacja **(3)** poświęcona jest roli pętli G w strukturze receptora. Mutacje w reszcie aminokwasowej (F45) istotnej dla funkcji pętli G w procesie aktywacji i porównanie zmutowanych receptorów z dzikimi w zakresie dawka (agonisty)-odpowiedź oraz kinetyki receptora pozwoliło wykazać, które etapy aktywacji zostają zmienione w wyniku mutacji. Tym samym wykazano, że **pętla G jest kluczowym elementem zarówno**

dla wiązania się agonisty jak i dla bramkowania w receptorze. Jest to istotne stwierdzenie, które wskazuje na „kompleksową funkcję” białka receptorowego i pokazuje, że proces jego aktywacji po związaniu agonisty angażuje poszczególne fragmenty białka, często odległe, przy pomocy elementów „sprzęgających” jakim w przypadku receptora GABA jest, jak wykazano, pętla G.

Podsumowując – efekt przeprowadzonych badań to bardzo dobrze udokumentowane, znacznie pogłębione poznanie struktury i funkcji receptorów GABA_A. Jest to z pewnością sukces, którego należy Doktorantowi pogratulować. Ale czas płynie....i interesuje mnie problem „co dalej”? W przedstawionej dysertacji nie znalazłam chociaż małego akapitu poświęconego ewentualnym dalszym pomysłom/planom na kontynuację tematu badań jakim są receptory GABA_A. Zapewne Doktorant ma w tym zakresie jakieś przemyślenia – chętnie je poznam. A przy okazji może coś zasugeruję....choć być może problem jest już znany. Jeżeli dla właściwego funkcjonowania („w



spokoju”) układu nerwowego jest tak istotna aktywność spontaniczna receptorów GABA_A to co dzieje się z nią w warunkach stresu? Problem zapewne niełatwy do zweryfikowania, że względu na ogromną ilość „ogniw” to mimo to proszę Doktoranta o ocenę możliwości przeprowadzenia jakiś badań w tym zakresie. Jestem ogromnie ciekawa opinii Pana Marka.

Kończąc ocenę merytoryczną jeszcze raz pragnę podkreślić bardzo wysoki poziom badań przeprowadzonych przez Doktoranta w ramach przygotowywania pracy doktorskiej - tak w zakresie koncepcji badań, stosowanych metod, jakości uzyskanych wyników (zapisy elektrofizjologiczne są perfekcyjne), ich analizy, opracowania (również modeli), interpretacji i opisu.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Na koniec pozostaje kilka drobnych uwag natury edytorskiej, które jeśli recenzent ma to musi je podać. Nie mają one jednak wpływu na ogólną wartość rozprawy doktorskiej.

- str. 7 -sformułowanie „obniżenie napięcia błonowego” – tak, rzeczywiście chodzi o napięcie, czyli różnicę potencjałów między środowiskiem zewnętrznym i wewnętrznym ale bardziej powszechnie w elektrofizjologii używa się określenia „potencjał błonowy”i problem czy w przypadku hiperpolaryzacji to „obniżenie” – rzeczywiście wartość bardziej ujemna, czy może „wzrost/podniesienie”- bo de facto jest to wzrost różnicy potencjałów. Jest to często pojawiający się problem. Na str. 8 „obniżeniu potencjału błonowego” towarzyszy słowo hiperpolaryzacja – i sytuacja jest już jasna. Mogłam ten problem pominąć bo sformułowanie pojawiło się jednorazowo ale mówiąc o nim chciałam zwrócić uwagę, że może lepiej mówić właśnie o hiperpolaryzacji jako większej elektroujemności wnętrza komórki.

str. 8 – jest rycina (nr 2), która nie wnosi istotnych informacji do opisu zagadnienia i nie została w tekście zacytowana

str 9 – wygląda, że automatyczne wstawianie cytowania nie zadziałało.....ale może należało ten błąd wykryć zwłaszcza, że jest wyłuszczone

- str 10 – słowo „kontrybuowanie” – to zbyt bezpośrednie tłumaczenie z angielskiego – mamy lepszy polski wyraz „udział”,

str. 14 – Czy receptor rzeczywiście „odwiązuje” agonistę w procesie wychodzenia ze stanu desensytyzacji? A może lepiej „uwalnia”?

str. 16 – roztwór wymieniany z prędkością – ok. 200 us – jak prędkość to droga/czas



Ocena końcowa

Ja niżej podpisana stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr. Marka Macieja Brodzkiego pt. „Wpływ składu podjednostkowego i mutacji w pętli G na własności kinetyczne receptorów GABA(A) oraz badanie mechanizmów modulacji tych receptorów przez beznodiazepiny” spełnia warunki określone w Art. 187 Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 20 lipca 2018 i wnoszę do Wysokiej Rady o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na nowatorski charakter przeprowadzonych badań oraz uzyskanych wyników dających pogłębiony obraz i lepsze zrozumienie funkcjonowania hamujących receptorów GABA_A w układzie nerwowym, wysoką jakość publikacji naukowych jakie ukazały się na bazie uzyskanych wyników oraz wiodącą rolę Doktoranta w opublikowanych artykułach, wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Marka Brodzkiego.

Maria Stankiewicz