

wpł. 10.05.2017
M. Podhorska-Okolów
WYDZIAŁ LEKARSKI
Prodziekan ds. Nauki
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okolów

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO	
wpl. dnia	10-05-2017
L. dz. DL/	1552 / 2017
Znak sprawy DL	

Prof. dr hab. Grzegorz Hess
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
Kraków

Kraków, 27.04.2017 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kisiel
pt. Rola procesu preaktywacji w funkcjonowaniu receptora GABA_A oraz jego modulacji
przez wybrane czynniki**

Układ GABAergiczny jest podstawowym neuroprzebieżnikowym systemem hamującym w mózgu, który reguluje czynności praktycznie wszystkich jego obszarów. Badania receptora GABA_A, odpowiedzialnego za generowanie szybkich hamujących potencjałów postsynaptycznych, mają niezwykle istotne znaczenie, ponieważ zaburzenia czynności układu GABAergicznego leżą u podłoża licznych chorób neurologicznych. Również mechanizm działania wielu leków opiera się na oddziaływaniu na receptory dla kwasu γ -aminomasłowego. Z tych powodów dokonany przez doktorantkę wybór podjętej problematyki badawczej jest trafny i aktualny. Zespół profesora Jerzego Mozrzymasa, promotora rozprawy doktorskiej, jest znany z nowatorskich badań nad budową i funkcją receptora GABA_A, a przedstawiona rozprawa stanowi ważny etap rozwoju tych badań w ostatnim czasie.

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Kisiel zawiera omówienie wyników szeroko zakrojonego projektu badawczego, którego celem było określenie roli reszt aminokwasowych, położonych w miejscu wiązania agonisty, w przebiegającym na poziomie molekularnym procesie, prowadzącym do aktywacji receptora GABA_A. Doktorantka postawiła hipotezę, według której cząsteczka receptora po związaniu cząsteczki ligandu wchodzi w stan preaktywacji, czyli szczególnej konformacji, poprzedzającej przejście receptora w stan otwarty bądź zdesensytyzowany, i przeprowadziła jej weryfikację.

Przedstawiona mi do recenzji 158-stronicowa rozprawa doktorska ma typowy układ edytorski. W obszernym, liczącym 37 stron wstępie autorka omawia najpierw podstawy zjawisk elektrochemicznych, zachodzących w błonach komórek pobudliwych, by następnie

przejsć do szczegółowego omówienia, w oparciu o bardzo dobrze dobraną literaturę, znanych endo- i egzogennych agonistów receptora GABA_A a także budowy cząsteczek pentamerycznych receptorów jonotropowych, do których należy receptor GABA_A. Dużo miejsca we wstępie poświęcono omówieniu zbadanych dotąd molekularnych podstaw działania receptora GABA_A, w tym przede wszystkim prac poświęconych dynamice zmian strukturalnych cząsteczki receptora, do których dochodzi pod wpływem wiązania agonisty. Opisując mechanizm aktywacji receptora GABA_A doktorantka w sposób bardzo interesujący przedstawia stopniową ewolucję modeli opisujących poszczególne fazy zmian konformacyjnych cząsteczki receptora, prowadzących do jego aktywacji a także desensytyzacji. Następnie słusznie podkreśla, iż istnieje potrzeba uzupełnienia zaproponowanych dotąd przez innych badaczy modeli liniowych i rozgałęzionych o opis stanów konformacyjnych, w których nie ma pełnego wysycenia miejsc wiążących przez agonistę. Wstęp kończą podrozdziały dotyczące strukturalno-funkcjonalnego zróżnicowania receptora GABA_A i jego modulatorów.

Szczegółowy opis zastosowanych materiałów i metod zajmuje 25 stron. Uzyskane wyniki przedstawiono na 54 stronach, zawierających 23 ryciny i 12 tabel a dyskusja zajmuje 11 stron. Godny uwagi jest obszerny spis piśmiennictwa, liczący 241 pozycji.

Pierwsza część przeprowadzonych badań dotyczyła porównania amplitudy i kinetyki desensytyzacji oraz deaktywacji prądów makroskopowych, rejestrowanych techniką whole-cell. Prowadząc analizę rejestracji prądów wywoływanych przez podania GABA albo kwasu piperydino-4-sulfonowego (P4S), będącego częściowym agonistą receptora GABA_A, z komórek wykazujących ekspresję receptora zbudowanego z podjednostek $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\gamma 2$ doktorantka wykazała, iż uzyskane dane doświadczalne można opisać przy pomocy modelu liniowego przemian konformacyjnych receptora. Jednak w kolejnym etapie doświadczeń, stosując inne związki o charakterze agonistycznym i badając reakcje komórek wykazujących ekspresję receptora z mutacją $\alpha 1$ F64C w miejscu wiążącym agonistę, obniżającą prawdopodobieństwo otwarcia kanału receptora, pokazała że obserwacje doświadczalne najlepiej odtwarza model uniwersalny, zawierający fragmenty liniowe i rozgałęzione oraz uwzględniający występowanie stanu preaktywacji. Kolejna seria doświadczeń zmierzała do zbadania wpływu zmian stężenia protonów w środowisku na działanie receptora z mutacją $\alpha 1$ F64C. Po ich przeanalizowaniu doktorantka zaproponowała 2 modele, opisujące wpływ pH na mechanizmy aktywacji receptora GABA_A.

W drugiej części badań doktorantka zastosowała technikę rejestracji prądów metodą patch-clamp z fragmentów błony komórek, zawierających pojedyncze receptory GABA_A. Zaproponowała model, który dobrze opisuje rezultaty doświadczeń z zastosowaniem wysycającego stężenia GABA, oddziałującego na receptor o budowie $\alpha 1\text{-}\beta 2\text{-}\gamma 2$ a ponadto wyniki eksperymentów, w których rejestrowano spontaniczną aktywność receptora. Następnie dokonała opisu kinetyki receptora w obecności niewysycającego stężenia GABA, przedstawiając dwa modele: (1) z pojedynczym stanem preaktywowanym i (2) z dwoma stanami preaktywowanymi. Ponadto, zaproponowała model kinetyczny dla receptora z mutacją $\alpha 1\text{F64L}$ oraz wykazała w jaki sposób mutacja $\alpha 1\text{F64C}$ wpływa na aktywację receptora o budowie $\alpha 1\text{-}\beta 2\text{-}\gamma 2$. Rozdział przedstawiający wyniki kończy opis serii doświadczeń dotyczących wpływu mutacji, zachodzącej w podjednostce β w pozycji $\beta 2\text{E155}$, na aktywację receptora o budowie $\alpha 1\text{-}\beta 2$.

Podsumowując powyższe należy stwierdzić, że doktorantka uzyskała nowe, interesujące wyniki posiadające duże znaczenie dla rozwoju badań nad strukturą i funkcją receptora GABA_A, które w dalszej perspektywie mogą mieć również znaczenie praktyczne w terapii chorób neurologicznych. Postawiona hipoteza, według której cząsteczka receptora po związaniu dwóch cząsteczek agonisty wchodzi w stan preaktywacji poprzedzający dalsze zmiany konformacyjne, okazała się słuszna. Wykazano również, że związanie jednej cząsteczki agonisty prowadzi do preaktywacji, która jest mniej efektywna niż w przypadku związania dwóch jego cząsteczek. Wyniki zaprezentowane w przedstawionej do oceny rozprawie zostały uzyskane w efekcie starannego przeprowadzenia bardzo trudnych od strony technicznej doświadczeń elektrofizjologicznych a także modelowania, opartego o wyniki tych doświadczeń, co świadczy o doskonałym przygotowaniu metodycznym i dużej wiedzy doktorantki.

Nie mam większych zastrzeżeń do strony edytorskiej przedstawionej rozprawy, która została napisana poprawnym językiem a jej treść została podzielona na odpowiednie części, w tym ułatwiające zapoznanie się z jej treścią: spis skrótów, spis tabel i spis rycin. Jednak wydaje mi się, iż pracę czytałoby się łatwiej gdyby jej cel został przedstawiony w sposób bardziej zwięzły i został zamieszczony po a nie przed rozdziałem dotyczącym materiałów i metod. Natomiast podsumowanie, stanowiące zakończenie pracy, powinno znaleźć się na jej początku jako streszczenie. Wysoka wartość merytoryczna rozprawy nie ucierpiałaby również, gdyby zrezygnować z rozpoczynającego pracę podrozdziału 2.1, zatytułowanego „Zasady funkcjonowania układu nerwowego”. Wymienione uwagi mają jednak przede

wszystkim charakter edytorski i nie obniżają mojej ogólnej, wysokiej oceny merytorycznej strony rozprawy.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i dlatego zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Magdaleny Kisiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Składam również wniosek o jej wyróżnienie.

