

Wch 11.05.2017

Uniwersytet Warszawski
WYDZIAŁ LEKARSKI
Pracownik ds. ...
M. Podhorska-Okolów

prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okolów

Katedra Fizyki

Wydział Technologii Drewna,

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,

02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159, Bud.34, p.68,

tel: (48)-225938610,

e-mail: krzysztof_dolowy@sggw.pl

Warszawa 11 maja 2017r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kisiel zatytułowanej „Rola procesu preaktywacji w funkcjonowaniu receptora GABA_A i jego modulacji przez wybrane czynniki”.

Przedstawiona rozprawa doktorska ma formę monografii liczącej 158 stron, zawiera 52 rysunki, 13 Tabel i 14sto stronicowy spis pozycji literatury. Dodatkowo rozprawa zawiera spis publikacji autorki.

Pierwszy rozdział zatytułowany „*Cel pracy*” jest nieco mylący ponieważ opisuje funkcję kanału GABA_AR i rolę jaką pełni jego modulacja w medycynie. Następny akapit poświęcony jest metodom badania tego kanału, a dopiero trzeci rozpoczyna się od tekstu „*Celem niniejszej rozprawy...*”. Ale również ten akapit jest niejasny ponieważ zawiera przynajmniej dwa różne cele: badanie roli dwóch reszt aminokwasowych α_1F64 oraz β_2E155 leżących w miejscu wiązania agonisty w procesie aktywacji receptora (co jest niewątpliwie pracą eksperymentalną) oraz modelowanie procesu preaktywacji przygotowującej kanał do otwarcia (co jest niewątpliwie pracą teoretyczną).

Rozdział 2 zatytułowany jest „*Wstęp teoretyczny*”. Na pierwszej stronie autorka szybko przechodzi od Ramona y Cajala do patch clampu. Na następnych dwóch omawia potencjał Nernsta i równanie Goldmana-Hodgkina-Katza oraz potencjał czynnościowy. Na kolejnej stronie krótko opisuje synapsy i już na piątej stronie przechodzi do kanału GABA_AR i jego agonistów. W kolejnym podrozdziale zatytułowanym „*Molekularne podstawy działania receptorów GABA_A*” autorka omawia na trzech stronach strukturę molekularną pentamerycznych receptorów zbadaną

rentgenograficznie i metodami chemii strukturalnej. Ten fragment pracy napisany jest zbyt oszczędnie. Za to następny fragment rozdział „2.4 Mechanizm aktywacji receptorów GABA_A” jest napisany ze zjawstwem. Na 15 stronach opisane są modele kinetyczne receptorów ich zalety i wady. Opisana jest koncepcja preaktywacji uwzględniająca stany ze związaną jedną lub dwiema molekułami agonistów. Szczegółowo omówione są zarówno hipotezy podobne, jak i konkurencyjne. Ze znajomością rzeczy wskazane są słabości pewnych modeli dopasowanych do niepełnych danych uzyskanych przy zastosowaniu krótkich pulsów i niskich stężeń agonisty, odrzucania części wyników przed poddaniem ich analizie kinetycznej oraz używania wyników uzyskanych przy zastosowaniu zbyt dużych filtrów czasowych odcinających najkrótsze otwarcia kanału. W kolejnym rozdziale autorka omówiła własności receptorów GABA_A różniących się składem podjednostek. Receptor GABA_A jest heteropentamerem – składa się z pięciu podjednostek. Najczęściej spotykany receptor ma dwie podjednostki α , dwie podjednostki β i jedną podjednostkę γ . Istnieją różne warianty podjednostek α , β , γ , oraz δ zastępująca w niektórych tkankach podjednostkę γ . Podjednostki są syntetyzowane w komórce oddzielnie, wbudowywane do błon, gdzie łączą się ze sobą spontanicznie. Co najbardziej niepokojące dla analizy otrzymanych wyników to, że funkcjonalne receptory (przewodzące jony) mogą być tworzone przez inne kombinacje podjednostek niż ta najczęściej spotykana. A receptory o innym składzie podjednostek mają nieco inne własności elektryczne. Może to oznaczać, że wyniki poddawane analizie nie pochodzą od tylko jednej struktury receptora. W kolejnych rozdziałach doktorantka szczegółowo omawia endogenne i egzogenne modulatory receptora GABA_A poczynając od pH przez neurosteroidy, anestetyki, benzodiazepiny, niektóre leki anty-epileptyczne i przeciw-psychotyczne.

Niestety w dalszym ciągu nie jest pewne w którą stronę zmierza doktorantka. Czy dalsza część pracy będzie eksperymentalna, czy teoretyczna? Oraz co jeszcze bardziej niepokojące, którą część pracy doktorantka wykonała samodzielnie. Nie pomaga przeczytanie znakomitej publikacji współautorstwa doktorantki zamieszczonej w *Journal of Neuroscience*, w której za poszczególne zadania w pracy odpowiadają oprócz doktorantki także inni współautorzy. Dopiero w rozdziale czwartym „Wyniki” pojawia się stwierdzenie, że głównym celem rozprawy doktorskiej było opisanie mechanizmu aktywacji receptora, a zwłaszcza procesu preaktywacji. Najbardziej informatywne zdanie dotyczące zakresu pracy wykonanej przez

doktorantkę znajduje się, moim zdaniem, na stronie 63 i 64 rozprawy: "W niniejszej rozprawie zaprezentowane zostaną wyniki pomiarów mikroskopowych wywołanych podaniem różnych stężeń GABA w receptorach $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, $\alpha_{1F64L}\beta_2\gamma_2$, $\alpha_{1F64}\beta_2\gamma_2$. Prądy te zmierzone zostały przez cały zespół, z którym współpracuję (prof. Jerzego Mozrzymasa, Magdalenę Jatczak i Marka Brodzkiego) a ich skrótowej prezentacji wymagało przedstawienie symulacji kinetycznych mojego autorstwa, do których stanowiły bazę." Pominę rozbiór logiczno-gramatyczny przytoczonych zdań i użytych w nim terminów, ale wynika z nich, że zespół profesora Mozrzymasa przeprowadził pomiary, a doktorantka zrobiła symulacje kinetyczne otrzymanych przez nich wyników. Przy okazji to jedyne miejsca w rozprawie, w którym doktorantka nie użyła liczby mnogiej lub formy bezosobowej opisując swoją rolę w pracy. Powyższa analiza celu pracy pozwoliła na rozwianie głównej wątpliwości jaka narzuciła się recenzentowi po pierwszym, pobieżnym przeczytaniu pracy, czyli odpowiedzi na wymagane ustawowo pytanie, którą część zbiorowej pracy wykonała doktorantka samodzielnie Art. 13 ust. 4 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 roku Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). Mamy więc do czynienia z pracą teoretyczną, a nadmiar informacji z różnych dziedzin zamieszczony we wstępnych częściach pracy sprawia z jednej strony wrażenie chaosu, ale z drugiej świadczy o dobrej orientacji doktorantki w szerokiej dziedzinie wiedzy o własnościach pentamerycznych kanałów jonowych. Oczywiście teoretyczna część pracy nie przesądza, że doktorantka nie współprowadziła badań eksperymentalnych prowadzących do otrzymania wyników poddawanych przez nią analizie *in silico*.

Zanim przejdę do analizy wyników osiągniętych przez doktorantkę najpierw wyrażę moją odosobnioną opinię o metodzie analizy kinetycznej. Już pierwsze obserwacje wykonane metodą patch-clamp wskazały, że kanały jonowe znajdują się w stanie zamkniętym (nie przewodzącym jonów) bądź otwartym (przewodzącym). Nie wykryto stanów pośrednich. Używając metod rentgenograficznych udokumentowano istnienie struktury otwartej i zamkniętej kanałów. Wykazano, że do pentamerycznej molekuly GABA_AR wiążą się dwie molekuly agonisty. Obserwacje rentgenograficzne i elektrochemiczne doprowadziły do stworzenia pierwszych modeli kinetycznych. Szybko okazało się, że model, w którym istnieje przejście ze stanu otwartego do zamkniętego i z powrotem nie pasuje do obserwacji elektrochemicznych otworzyć kanału jonowego, który wykazywał rosnące

prawdopodobieństwo seryjnych otwarć (bursts) w wyższych stężeniach agonisty. To z kolei sugerowało, że mogą istnieć dwa stany otwarte kanału - dające pojedyncze lub seryjne otwarcia. Tę obserwację powiązano to z przyłączeniem jednej lub dwóch cząsteczek agonisty do receptora. Ale i to nie wystarczyło do opisu procesów zachodzących przy przepływie jonów przez kanały. Zaobserwowano bowiem, że po rozpoczęciu przepływu, po krótkim okresie czasu kanały ulegają desensytyzacji i przestają przewodzić jony. Ta obserwacja wymagała uwzględnienia kolejnych stanów strukturalnych kanałów. Analiza kinetyczna, którą zajmowała się doktorantka w swej pracy weszła do dziedziny badań kanałów najpierw niemal jako ciekawostka, a w ciągu ostatnich 25 lat rozbudowała się do integralnej części analizy funkcjonowania kanałów jonowych i bez przeprowadzenia takiej wyrafinowanej analizy nie można opublikować pracy w liczącym się czasopiśmie naukowym. Recenzent jest nieustająco krytyczny wobec tej metody spekulowania na temat funkcjonowania kanałów jonowych. Po pierwsze postulowanie istnienia określonego stanu kanału powinno być wsparte strukturą rentgenograficzną, ukazującą, że stan taki rzeczywiście istnieje. Ale badania rentgenograficzne są bardzo trudne i niewiele struktur różnych kanałów zostało zobrazowanych. Po drugie postulat istnienia każdego dodatkowego stanu wymaga dołożenia kolejnych dwóch fitowanych parametrów do modelu kanału. Najprostszy model Jones'a-Westerbrook'a ma 6 stałych dopasowywanych parametrów (Modele 6 i 7 str. 65). Po uwzględnieniu stanu preaktywowanego liczba parametrów rośnie do 8 (Modele 8 i 9 str. 65). Kolejne modele ponumerowane 13 i 14 wymagają 16 parametrów, model 15 nawet 24 parametrów, a rekordowy model 16 aż 32 parametrów. Użycie takiej liczby parametrów powoduje, że można prawdopodobnie dopasować model do dowolnego zestawu danych. Przy okazji analiza kinetyczna narzuca, aby każda z użytych funkcji miała charakter eksponencjalny. Można wyobrazić sobie, że użycie funkcji periodycznych (pulsujących molekuł) mogłoby być bardziej skuteczne w opisie funkcjonowania kanałów jonowych i nie wymagałoby użycia aż tylu parametrów. Najbardziej niepokojący w analizie kinetycznej jest hipotetyczny postulat istnienia kilku a nawet kilkunastu stanów strukturalnych kanału, których nie zaobserwowano żadną inną metodą doświadczalną. Pisząc krytycznie o metodzie analizy kinetycznej recenzent wie, że jest w całkowitej mniejszości badaczy w tej dziedzinie, a analiza kinetyczna opisana w tej pracy została opublikowana przez zespół prof. Mozrzymasa w czołowych światowych czasopismach z tej dziedziny wiedzy.

W swej pracy doktorantka najpierw zastosowała analizę kinetyczną do porównania kinetyki prądów wywołanych przez wysycające stężenia GABA (kwas γ -amino-masłowego) i P4S (kwasu 4-sulfonopiperidynowego). Już ta analiza wykluczyła z rozważań najprostszy model Jones'a i Westbrook'a, który nie pasował do uzyskanych wyników. Otrzymane wyniki mogły być opisane równie dobrze przez dwa konkurencyjne modele: liniowy oraz model przewidujący dodatkowy stan zamknięty kanału odpowiadający preaktywacji (czyli stanowi zamkniętemu tuż przed otwarciem kanału). Rozróżnienie między tymi dwoma modelami było możliwe dzięki skonstruowaniu mutantów kanałów α_1F64L i α_1F64C i użyciu muscimolu, substancji występującej w muchomorach, będącej agonistą receptora $GABA_A$ R i odpowiedzialną za surrealistyczne wizje występujące po wypiciu naparu z muchomorów - zwyczaju praktykowanego podczas rytuałów plemiennych w przedchrześcijańskiej Europie. Badania z muscimolem i mutantami pozwoliły na wykluczenie modelu liniowego i wskazanie, że właściwym do opisu kinetycznego kanału $GABA_A$ R jest model stan preaktywowany kanału.

Badania wykonane na kanałach $GABA_A$ R niosących mutację α_1F64C wykazały zwiększenie wrażliwości tego kanału na alkalizację środowiska. W tej ciekawej części pracy autorka wydaje się nie dostrzec jeszcze innej możliwości działania wprowadzonej mutacji. Cysteina nie jest aminokwasem obojętnym. Jej łańcuch boczny zakończony grupą $-SH$ może oddysocjować proton i przejść w ujemnie naładowaną elektrycznie grupę $-S^-$ z $pK_a=8,37$. W badanym $pH=8,0$ niemal połowa reszt cysteiny była naładowana ujemnie.

Opisany model preaktywacji receptora $GABA_A$ R otrzymany dla prądów makroskopowych został następnie zastosowany do badania wyników pomiarów uzyskanych metodą patch-clamp. Na podstawie analizy wyników autorka wykazała, że kanał ulega preaktywacji również po związaniu tylko jednej molekuly agonisty, a jego aktywacja jest podobna, ale mniej efektywna, od tej, która występuje po związaniu dwóch cząsteczek agonisty.

Doktorantka wykonała ogromną pracę. Przeanalizowała prawidłowo wielką liczbę danych i rozważyła wiele możliwych modeli kinetycznych. Z analizy wyciągnęła poprawne wnioski i wskazała na najbardziej prawdopodobny model kinetyczny obejmujący preaktywację kanału. Tematyka przez nią podjęta jest nowoczesna, o czym świadczy, że wyniki pracy zostały opublikowane w najlepszych światowych czasopiśmie. Praca jest napisana dobrym językiem choć nie jest wolna od żargonu

naukowego. Praca ma klasyczny układ i podział treści. Doktorantka wykazała się znakomitą znajomością literatury przedmiotu.

Wniosek końcowy

Po opisanu pracy i występujących w niej drobnych błędów pragnę w podsumowaniu, z pełnym przekonaniem stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Kisiel pomimo pewnych niedoskonałości jest pracą bardzo dobrą. Doktorantka dokonała szeregu ważnych odkryć naukowych. Jest współautorką aż 3 prac posiadających IF. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska mgr Magdaleny Kisiel zatytułowana „Rola procesu preaktywacji w funkcjonowaniu receptora GABA_A i jego modulacji przez wybrane czynniki” spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim wymienione w artykule 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 roku Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie jej do publicznej obrony.



Prof. dr hab. Krzysztof Dołowy