

Prof. dr hab. Adam Szewczyk
Kierownik Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN
w Warszawie

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr. Marka Brodzkiego pt. „Wpływ składu podjednostkowego i mutacji w pętli G na właściwości kinetyczne receptorów GABA(A) oraz badanie mechanizmów modulacji tych receptorów przez benzodiazepiny”

Kanały jonowe stanowią uniwersalny system regulacji układów biologicznych. Uniwersalność wynika chyba z przesłanek ewolucyjnych? Kanały jonowe były być może pierwszymi białkami błonowymi obecnymi w proto-komórce. Umożliwiały one, przez swoją selektywność, tworzenie gradientów jonowych i formowanie potencjału elektrycznego, który stanowił „napęd” innych procesów w proto-komórce. Kanały jonowe stanowią w wielu przypadkach początkowy etap przekazywania sygnałów w komórce, a czasami końcowy etap kaskady sygnalizacyjnej. Pozorna sprzeczność tego zdania jest tylko, zdaniem recenzenta, dowodem jak ważną rolę pełnią te białka. Stąd kanały jonowe (błony plazmatycznej i błon wewnątrzkomórkowych) selektywne dla kationów i anionów, stanowią od wielu lat obiekt badawczy intensywnie eksplorowany w laboratoriach na całym świecie. Intensywność badań wynika nie tylko z ciekawości naukowej, ale także z potencjalnych korzyści jakie może odnieść medycyna w przypadku dogłębnego zrozumienia procesów regulacji, hamowania i aktywacji kanałów jonowych obecnych we wszystkich komórkach eukariotycznych.

Receptory jonotropowe GABA_A, aktywowane kwasem gamma-aminomastłowym, są przykładem białek kanałowych o niezwykle ważnej funkcji w różnych organizmach. Ich selektywność anionowa decyduje o ich podstawowej roli w inhibicji neuronalnej. Złożoność tych zjawisk w mózgu narzuca plejotropowość funkcjonalną receptorów GABA_A. A to zjawisko jest powodowane ekspresją różnych podjednostek tworzących pentamery kanału. Dysfunkcje inhibicji neuronalnej mogą być zaangażowane w zjawisku epilepsji, autyzmie, chorobie Alzheimerera, stanach lękowych lub bezsenności. Mimo wielu lat badań właściwości receptora GABA_A nadal uważa się, że mechanizmy regulacji tego białka, w kontekście budowy podjednostkowej czy farmakologii, są nadal pełne niejasności. Szczególnie, że receptory GABA_A są obecne nie tylko w neuronach.

Biorąc pod uwagę stan wiedzy dotyczący receptora GABA_A i jego właściwości elektrofizjologicznych, cele (przedstawione poniżej) rozprawy doktorskiej mgr Marka Brodzkiego są według recenzenta w pełni zasadne.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej zdefiniowano następujące cele:

- zbadanie regulacji aktywności receptorów GABA_A na drodze zmiany stechiometrii podjednostkowej w postaci braku kluczowej podjednostki beta oraz wpływu benzodiazepiny flurazepamu na spontaniczną aktywność receptorów GABA_A,
- wyjaśnienie roli elementu strukturalnego domeny zewnątrzkomórkowej – pętli G, w procesie aktywacji.

Rozprawa doktorska Marka Brodzkiego została wykonana w Uniwersytecie Wrocławskim, na Wydziale Nauk Biologicznych, w Katedrze Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Jerzego Mozrzymasa. Badania opisane w pracy doktorskiej był finansowane przez 3 projekty z Narodowego Centrum Nauki. Warto tu podkreślić, że badania właściwości elektrofizjologicznych receptora GABA w grupie badawczej prof. Jerzego Mozrzymasa są prowadzone, z dużymi sukcesami, od wielu lat.

Praca doktorska została przygotowana w formie tzw. zestawu publikacji. Pierwsza publikacja to praca opublikowana w *European Journal of Pharmacology* 784 (2016) 81-89. Marek Brodzki jest tu pierwszym autorem wśród 6 autorów. Druga publikacja to *Frontiers in Cellular Neuroscience* (2018) 12, article 237. Marek Brodzki jest trzecim autorem (z adnotacją tzw. *equall contribution*) wśród 9 autorów. Trzecia publikacja to *Biochemical Pharmacology* 177 (2020) 113917. Marek Brodzki jest tu pierwszym, korespondencyjnym autorem wśród 4 autorów. We wszystkich publikacjach promotor proj. Jerzy Mozrzymas jest ostatnim autorem. Wszystkie trzy czasopisma to czasopisma z bardzo dobrym tzw. *impact factorem*, co w dzisiejszym świecie analiz naukometrycznych, jest postrzegane jako duża zaleta publikowanych wyników.

Prezentowaną rozprawę Marka Brodzkiego otwiera Streszczenie (także w języku angielskim), następnie w pierwszych rozdziałach opisano właściwości oraz strukturę receptorów GABA_A. Następnie opisano mechanizmy aktywacji receptorów GABA_A oraz badania kinetyki odpowiedzi prądowych receptorów GABA_A. W kolejnym rozdziale przedstawiono wpływ podjednostkowego składu na właściwości kinetyczne receptorów GABA_A. Tu, w tekście rozprawy umieszczono publikację z *European Journal of*

Pharmacology. Kolejny rozdział opisuje wpływ benzodiazepin na spontaniczną aktywność receptorów GABA_A. Tu w tekście rozprawy umieszczono publikację z *Frontiers in Cellular Neurosciences*. Ostatni tzw. eksperymentalny, krótki rozdział, dotyczy roli pętli G w aktywacji receptorów GABA_A. Tu w tekście umieszczono publikację z *Biochemical Pharmacology*. Rozprawę kończy rozdział Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografia. Zamieszczono także oświadczenia (16 oświadczeń) współautorów trzech w/w publikacji: udział deklarowany od 2% do 22,5%. Oświadczenia, współautorów wskazują na jednoznacznie podstawową (w zakresie właściwym dla doktoranta) rolę Marka Brodzkiego w publikacjach składających się na rozprawę doktorską.

Doświadczenia będące podstawą rozprawy doktorskiej zostały przeprowadzone głównie z wykorzystaniem technik elektrofizjologicznych patch-clamp (w różnych konfiguracjach). Jest to technika, która od wielu lat umożliwia fundamentalne badania kanałów jonowych. Jej wiarygodność jest powszechnie postrzegana bardzo wysoko w środowisku naukowym.

Otrzymane wyniki rozprawy doktorskiej Marka Brodzkiego można streścić (dodatkowo wzbogacone o wnioski) w sposób następujący:

- opisano właściwości kinetyczne i farmakologiczne kanałów składających się wyłącznie z podjednostek alfa i gamma co doprowadziło do wniosku o wysokim „podobieństwie” funkcjonalnym między receptorami typu dzikiego i tymi pozbawionymi podjednostki beta.
- analiza przebiegów prądowych z pojedynczych kanałów pozwoliła na wyjaśnienie natury wpływu flurazepamu na spontaniczną aktywność, który znacznie wydłuża otwarcia kanału przy nieobecności agonisty.
- pomiary mikro- i makroskopowe na receptorach zmutowanych w pętli G ukazały istotne zmiany w kinetyce mierzonych prądów wskazując na istotną rolę pętli G w końcowych fazach procesu aktywacji kanałów.

Podsumowując. Badania opisane w rozprawie doktorskiej Marka Brodzkiego dotyczą ważnego zagadnienia regulacji receptora GABA_A. Wyniki przedstawione w publikacjach będących podstawą rozprawy doktorskiej Marka Brodzkiego uważam za ciekawe i ważne dla zrozumienia mechanizmów molekularnych regulacji receptora GABA_A. Jestem głęboko przekonany, że otrzymane wyniki poszerzają naszą wiedzę o badanym

receptorze. Opublikowanie wyników rozprawy doktorskiej w bardzo dobrych czasopiśmie z tzw. impact factor jest wysoce pozytywne.

Jak każda praca eksperymentalna, wyjaśniając pewne zjawiska, jednocześnie inspiruje do nowych pytań. Forma rozprawy tzn. zestaw publikacji zwalnia recenzenta z pewnej „czujności” dotyczącej np. analizy statystycznej i szczegółów natury metodycznej. Wszystkie trzy publikacje podlegały recenzji w ramach procedur wydawniczych a patrząc na daty przesłania artykułów do czasopism i daty akceptacji można mieć pewność, że podlegały one krytycznej i ostrej weryfikacji. Jest to sytuacja wybitnie komfortowa, bo pozwala ona recenzentowi na sformułowanie pewnych pytań i wątpliwości do doktoranta dotyczących kwestii bardziej merytorycznych, intelektualnie ciekawych i prawdopodobnie ważniejszych.

Czas więc na komentarze i uwagi krytyczne recenzenta dotyczące wykonanych doświadczeń jak i przygotowanej rozprawy doktorskiej:

- nieobecność podjednostki beta2 nie wpływa znacząco na właściwości (farmakologiczne) receptora GABA_A. Jak można wytłumaczyć właściwości kanału GABA_A bez podjednostki beta2? Czy faktycznie jest ona zbędna? Czy otrzymane wyniki można wytłumaczyć innymi zjawiskami (np. fosforylacja) niż tylko obecnością określonych podjednostek.
- w/w badaniach dokonywano transfekcji cDNA odpowiednich podjednostek w różnych proporcjach (praca w European Journal of Pharmacology: Materials and Methods, Cell Culture and Transfection). Jak zmiana tych proporcji cDNA wpływa faktycznie na ostateczny skład podjednostkowy receptora GABA_A? Czy weryfikowano skład białkowy receptora w komórkach HEK?
- wiadomo, że napływ jonów wapniowych przez kanały typu L może aktywować różne ścieżki sygnałowe, które mogą wpływać na funkcje receptora GABA_A; czy ewentualne zmiany stężenia jonów wapniowych mogą tworzyć nowy kontekst interpretacyjny otrzymanych w rozprawie rezultatów np. tworzenie klastrów czy dyfuzja lateralna receptora GABA_A?
- pytanie dotyczące wyników opublikowanych w Biochemical Pharmacology: czy pętla G jest jedynym elementem strukturalnym receptora GABA_A, który może być zaangażowany w otwarcie bramki kanału?
- recenzent ma pełną świadomość, że wybór komórek HEK jako komórek modelowych w przedstawionych badaniach wynika z ogromnej literatury przedmiotu. Ale jednocześnie

recenzent z największą ciekawością wysłucha opinii doktoranta jakie przesłanki spowodowały wybór takiego modelu komórkowego.

- kolejne pytanie dotyczy także zastosowanych komórek HEK: czy ekspresja podjednostek receptora GABA_A wpływa na profil ekspresji endogennych białek tej linii komórek np. innych kanałów chlorkowych? Czy białka obecne (endogennie) w komórkach HEK mogą „przypadkowo” wspierać tworzenie funkcjonalnego receptora GABA_A?

- w opisie wyników rozprawy doktorskiej znajduje się następujące stwierdzenie, że mogą one „przyczynić się do projektowania nowych terapii schorzeń związanych z inhibicją neuronalną”. Czy można prosić doktoranta o rozwinięcie tego wątku?

Podsumowując, uważam, że opis rozprawy doktorskiej Marka Brodzkiego jest napisany bardzo dobrze, otrzymane wyniki opublikowane w trzech publikacjach są bardzo interesujące a zgłoszone uwagi i komentarze recenzenta nie rzutują na moją ogólnie bardzo pozytywną ocenę pracy. Autor wykazuje dobrą orientację w zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy. Wnioskuje zatem o uznanie pracy Marka Brodzkiego za odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie Marka Brodzkiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę otrzymane rezultaty w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej oraz ich opublikowanie w bardzo dobrych angielskojęzycznych czasopismach z *impact factor* zgłaszam wniosek rekomendujący Radzie Dyscypliny Naukowej - Nauki Biologiczne - Uniwersytetu Wrocławskiego podjęcie uchwały o wyróżnienie rozprawy mgr. Marka Brodzkiego.



Warszawa, 15 czerwiec 2021 r.

(Prof. dr hab. Adam Szewczyk)