

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

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr. Michała Adama Michałowskiego pt. „Rola oddziaływań w ortosterycznym miejscu wiążącym agonistę oraz pomiędzy podjednostkami w aktywacji i modulacji receptora GABA_A”

Białka błonowe, a w szczególności kanały jonowe (o różnej selektywności) stanowią uniwersalny system regulacji układów biologicznych. „Uniwersalność” wynika z powszechności występowania białek kanałowych zarówno w błonie plazmatycznej jak i w błonach wewnątrzkomórkowych. Kanały jonowe stanowią często początkowy etap przekazywania sygnałów w komórce – to kolejny argument dowodzący jak ważną rolę pełnią te białka. Kanały jonowe stanowią od wielu lat obiekt badawczy intensywnie eksplorowany w laboratoriach na całym świecie. Intensywność badań wynika nie tylko z fundamentalnej ciekawości naukowca, ale także z możliwych korzyści jakie może odnieść współczesna medycyna. Resumując: kanały jonowe to bardzo ważna klasa białek błonowych, których badania mają zasadnicze znaczenie dla rozumienia funkcjonowania komórek!

Receptory jonotropowe GABA_A, aktywowane kwasem gamma-aminomasłowym, należą do rodziny pentametrycznych kanałów jonowych bramkowanych ligandem. W podjednostkach kanału można wyróżnić (ze względu na topologię) trzy domeny: zewnątrzkomórkową (ECD), transbłonową (TMD) oraz wewnątrzkomórkową. Po związaniu cząsteczki kwasu gamma-aminomasłowego z miejscem zlokalizowanym w/w domenie ECD następują zmiany konformacyjne umożliwiające przepływ jonów chlorkowych przez białko kanałowe. Receptory jonotropowe GABA_A są przykładem białek kanałowych o fundamentalnej funkcji w różnych organizmach.

Ich selektywność chlorkowa (anionowa) decyduje o ich podstawowej roli w inhibicji neuronalnej (transmisji hamującej) w centralnym układzie nerwowym. Dysfunkcje inhibicji neuronalnej mogą być zaangażowane m.in. w zjawisku epilepsji, autyzmie, chorobie Alzheimera, stanach lękowych lub bezsenności. Receptor jest także celem działania takich leków jak benzodiazepiny, barbiturany oraz neurosteroidy. Mimo wielu lat badań właściwości receptora GABA_A nadal uważa się, że mechanizmy regulacji

tego białka, w kontekście budowy podjednostkowej czy farmakologii, są wciąż pełne niejasności.

Biorąc pod uwagę stan wiedzy dotyczący receptora GABA_A i jego interesujących właściwości elektrofizjologicznych, podstawowy cel tzn. zrozumienie molekularnego procesu aktywacji receptora, czyli mechanizmu od związania ligandu do otwarcia się bramki poru, w rozprawie doktorskiej mgr Michała Adam Michałowskiego jest według recenzenta w pełni zasadny.

Dla uporządkowania pewnych pojęć występujących w tytule rozprawy warto przytoczyć pewną wiedzę podręcznikową. Znane są dwa sposoby modyfikowania aktywności receptorów: przez mechanizm ortosteryczny lub allosteryczny. Pierwszy z nich polega na podaniu substancji, która współzawodniczy o dostęp do miejsca ortosterycznego z endogennym ligandem receptora. Mechanizm allosteryczny polega natomiast na wykorzystaniu związków niskocząsteczkowych, które wiążą się z receptorem w innym miejscu niż substancja endogenna.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej zdefiniowane cele są silnie związane z szczegółowym obiektem badań tzn.:

- obiektem badań był receptor o konfiguracji podjednostek alfa1-beta2-gamma2,
- większość przeprowadzonych badań skupiona była wokół rejonu miejsca wiązania natywnego agonisty, czyli interfejsu podjednostek beta2 oraz alfa1,
- szczególna uwaga została poświęcona rejonowi pętli B i C na podjednostce beta2 oraz pętli D i G na podjednostce alfa1 oraz rejonowi N-końca białka.

Celem badań był także proces modulacji funkcji receptora przez zewnątrzkomórkową kwasowość środowiska tzn. pH.

W badaniach zostały wykorzystane tzw. techniki modelistyczne, bazujące zarówno na danych strukturalnych jak i badaniach elektrofizjologicznych.

Rozprawa doktorska Michała Adama Michałowskiego została wykonana w Uniwersytecie Wrocławskim, na Wydziale Nauk Biologicznych, w Zakładzie Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Jerzego Mozrzymasa. Badania opisane w pracy doktorskiej były finansowane przez 2 projekty z Narodowego Centrum Nauki: Etiuda i Preludium. Opisane wyniki wpisują się w badania właściwości elektrofizjologicznych i strukturalnych receptora GABA, które są realizowane od wielu lat, z dużymi sukcesami, w grupie badawczej prof. Jerzego Mozrzymasą.

Praca doktorska została przygotowana w formie tzw. zestawu publikacji. Zestaw stanowi 6 publikacji.

Pierwsza publikacja to praca: Michałowski MA, Kraszewski S, Mozrzymas JW. Binding site opening by loop C shift and chloride ion-pore interaction in the GABAA receptor model. **Phys Chem Chem Phys**. 2017 May 31;19(21):13664-13678. doi: 10.1039/c7cp00582b. PMID: 28429004. Michał Adam Michałowski jest tu pierwszym autorem wśród 3 autorów.

Druga publikacja to: Michałowski MA, Czyżewska MM, Iżykowska I, Mozrzymas JW. The $\beta 2$ subunit E155 residue as a proton sensor at the binding site on GABA type A receptors. **Eur J Pharmacol**. 2021 Sep 5; 906:174293. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174293. Epub 2021 Jun 30. PMID: 34214584. Michał Adam Michałowski jest pierwszym autorem wśród 4 autorów.

Trzecia publikacja to Terejko K, Kaczor PT, Michałowski MA, Dąbrowska A, Mozrzymas JW. The C loop at the orthosteric binding site is critically involved in GABAA receptor gating. **Neuropharmacology**. 2020 Apr; 166:107903. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107903. Epub 2019 Dec 3. PMID: 31972511. Michał Adam Michałowski jest tu trzecim autorem (z adnotacją równorzędności z pierwszym autorem), wśród 5 autorów.

Czwarta publikacja to Terejko K, Michałowski MA, Iżykowska I, Dominik A, Brzóstowicz A, Mozrzymas JW. Mutations at the M2 and M3 Transmembrane Helices of the GABAARs $\alpha 1$ and $\beta 2$ Subunits Affect Primarily Late Gating Transitions Including Opening/Closing and Desensitization. **ACS Chem Neurosci**. 2021 Jul 7;12(13):2421-2436. doi: 10.1021/acchemneuro.1c00151. Epub 2021 Jun 8. PMID: 34101432; PMCID: PMC8291490.

Piąta publikacja to Brodzki M, Michałowski MA, Gos M, Mozrzymas JW. Mutations of $\alpha 1$ F45 residue of GABAA receptor loop G reveal its involvement in agonist binding and channel opening/closing transitions. **Biochem Pharmacol**. 2020 Jul; 177:113917. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113917. Epub 2020 Mar 17. PMID: 32194055. Autor rozprawy jest tu drugim autorem na 4 autorów.

Szósta publikacja to: Terejko K, Michałowski MA, Dominik A, Andrzejczak A, Mozrzymas JW. Interaction between GABAA receptor $\alpha 1$ and $\beta 2$ subunits at the N-terminal peripheral regions is crucial for receptor binding and gating. **Biochem**

Pharmacol. 2021 Jan; 183:114338. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114338. Epub 2020 Nov 13. PMID: 33189674. Autor rozprawy jest 2 autorem na 5 autorów.

We wszystkich publikacjach promotor prof. Jerzy Mozrzymas jest ostatnim autorem. Wszystkie czasopisma w których opublikowano wyniki są z bardzo dobrym tzw. *impact factorem*: od 3.676 do 5.858. Jest oczywiste, że tzw. punkty ministerialne są adekwatne do w/w *impact factors*. W czasach oceny pracy naukowej przez pryzmat parametrów naukometrycznych należy uznać, że wyniki będące postawą rozprawy doktorskiej zostały bardzo dobrze opublikowane.

Prezentowaną rozprawę Michał Adam Michałowski otwiera Streszczenie (także w języku angielskim), następnie w pierwszych rozdziałach opisano właściwości oraz strukturę receptorów GABA_A. Następnie opisano metodyczne podstawy badania receptorów GABA A (badania strukturalne, elektrofizjologiczne oraz *in silico*). Kolejny rozdział opisuje cel i założenia pracy doktorskiej. Następnie przedstawiono cykl publikacji będących podstawą rozprawy. Rozprawę kończy rozdział Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografia. Zamieszczono także oświadczenia (21 oświadczeń) współautorów w/w publikacji: udział deklarowany od 2% do 40%. Oświadczenia, współautorów wskazują na jednoznacznie podstawową (w zakresie właściwym dla doktoranta) rolę Adama Michała Michałowskiego w publikacjach składających się na rozprawę doktorską.

Doświadczenia będące podstawą rozprawy doktorskiej zostały przeprowadzono głównie z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych: modelowania homologicznego, dynamiki molekularnej, dokowania ligandów, estymacji pK_a a także modelowania kinetycznego opartego na pomiarach elektrofizjologicznych.

Otrzymane wyniki rozprawy doktorskiej Michała Adama Michałowskiego można streścić syntetycznie w sposób następujący:

- wykazano rolę pętli C w sterycznym domykaniu miejsca wiązania oraz wpływu pętli B oraz D i G na kształtowanie odpowiedniego środowiska elektrostatycznego niezbędnego do związania cząsteczki GABA,
- przedstawiono wpływ pH na w/w rejon białka oparty na zmianie stanu protonacji jednej z reszt ułożonej na pętli B,
- wykazano rolę rejonu N-końca białka (helisa alfa1) w domykaniu powierzchni kontaktu podjednostek powyżej miejsca wiązania.

Podsumowując. Badania opisane w rozprawie doktorskiej Michała Adama Michałowskiego dotyczą ważnego zagadnienia regulacji receptora GABA_A. Wyniki przedstawione w publikacjach będących podstawą rozprawy doktorskiej Michał Adam Michałowski uważam za nowatorskie 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 czasopismach z wysokim *impact factor* jest wysoce pozytywne.

Jak każda praca doktorska, wyjaśniając pewne zjawiska, jednocześnie inspiruje do nowych pytań. Forma rozprawy tzn. zestaw publikacji poniekąd „zwalnia” recenzenta z pewnej „czujności” dotyczącej np. analizy statystycznej i szczegółów natury metodycznej. Wszystkie sześć publikacji podlegały recenzji w ramach procedur wydawniczych. Jest to sytuacja wybitnie komfortowa, bo pozwala ona recenzentowi na sformułowanie pewnych pytań do doktoranta dotyczących kwestii bardziej ogólnych, prawdopodobnie intelektualnie ciekawych.

Czas więc na komentarze recenzenta dotyczące wykonanych badań jak i przygotowanej rozprawy doktorskiej. Z racji specjalności naukowej recenzenta poniższe pytania będą dotyczyć także relacji między badaniami eksperymentalnymi kanałów jonowych a wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych:

1. realizując cele rozprawy doktorskiej przedstawiono wyniki opisujące nowe właściwości receptora GABA eksplorując nowoczesne narzędzia bioinformatyczne. Recenzent chciałby jednak usłyszeć o ograniczeniach i potencjalnych słabościach stosowanych metod bioinformatycznych. Do jakiego stopnia uzyskane wyniki są zależne od dostępności określonych narzędzi bioinformatycznych? Do jakiego stopnia pojawienie się nowych narzędzi bioinformatycznych w przyszłości może zmienić opis właściwości receptora?
2. lipidy stanowią oczywiste środowisko dla białek błonowych, dla kanałów jonowych. Czy otrzymane rezultaty z wykorzystaniem technik bioinformatycznych zależą od „składu” lipidowego błon biologicznych?
3. czy wykorzystane narzędzia pozwalają uwzględnić pewne zdarzenia biochemiczne, dynamicznie zachodzące w komórkach jak np. zakwaszenie w procesie niedotlenienia komórkowego czy oksydacja lipidów w pewnych stanach patologicznych komórki?

4. recenzent był zobowiązany za przybliżenie pojęcia „potencjalnych sensorów pH” w (wykorzystanego np. na stronie 110 rozprawy) w kontekście białek błonowych.
5. jedna uwaga natury redakcyjnej: czytelnikowi ułatwiłoby śledzenie otrzymanych wyników przez ich syntetyczne przedstawienia tzn. szerzej niż w streszczeniu na stronie 6, ale bardziej syntetycznie niż na stronach 118-120 rozprawy,
6. na zakończenie pytanie dotyczące metodologii badań naukowych w przyszłości. Jakie są przyszłe wyzwania stosowanych metod bioinformatycznych i jaka jest ich „docelowa” relacja z pracami eksperymentalnymi. Czy w przyszłości prace eksperymentalne staną się zbędne w pracy naukowej? Czy prace eksperymentalne będą tylko „dodatkiem” czy sposobem walidacji wyników otrzymanych metodami bioinformatycznymi tzn. prace eksperymentalne nie będą służyć odkrywaniu nowych właściwości białek kanałowych?

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska Michała Adama Michałowskiego jest napisana bardzo dobrze, otrzymane wyniki opublikowane w 6 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 Michał Adam Michałowskiego za odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie Michała Adama Michałowskiego 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 Michała Adama Michałowskiego.

Warszawa, 23 czerwiec 2022 r.

(Prof. dr hab. Adam Szewczyk)