



### Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Terejko

pt.: *Wpływ wybranych mutacji w domenie zewnątrzkomórkowej*

*na wiązanie neuroprzebieżnika i bramkowanie rekombinowanego receptora GABA<sub>A</sub> typu  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$*

Podstawą opracowania recenzji jest, podjęta w dniu 25 lutego 2021 r., uchwała Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o powołaniu na recenzenta rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Katarzyny Terejko. Pani magister przygotowała pracę doktorską zatytułowaną „*Wpływ wybranych mutacji w domenie zewnątrzkomórkowej na wiązanie neuroprzebieżnika i bramkowanie rekombinowanego receptora GABA<sub>A</sub> typu  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$* ” w formie spójnego cyklu trzech artykułów naukowych o następujących tytułach:

**A1/** Distinct Modulation of Spontaneous and GABA-Evoked Gating by Flurazepam Shapes Cross-Talk Between Agonist-Free and Liganded GABA<sub>A</sub> Receptor Activity. Jatczak-Śliwa M., Terejko K., Brodzki M., Michałowski M.A., Czyżewska M.M., Nowicka J.M., Andrzejczak A., Srinivasan R., Mozrzykmas J.W. **Front Cell Neurosci**, 2018, 12:237.

IF = 3,921; punkty<sub>MNiSW</sub> = 35

**A2/** The C loop at the orthosteric binding site is critically involved in GABA<sub>A</sub> receptor gating. Terejko K., Kaczor P.T., Michałowski M.A., Dąbrowska A., Mozrzykmas J.W. **Neuropharmacology**, 2020, 166:107903.

IF = 4,431; punkty<sub>MNiSW</sub> = 140

**A3/** Interaction between GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_1$  and  $\beta_2$  subunits at the N-terminal peripheral regions is crucial for receptor binding and gating. Terejko K., Michałowski M.A., Dominik A., Andrzejczak A., Mozrzykmas J.W. **Biochem Pharmacol**, 2021, 183:114338.

IF = 4,960; punkty<sub>MNiSW</sub> = 100

Summaryzna wartość tzw. współczynnika oddziaływania (IF) prac wynosi 13,312, natomiast łączna liczba punktów MNiSW, liczonych zgodnie z punktacją obowiązującą w roku opublikowania manuskryptu, wynosi 275. Wymienione powyżej artykuły uzupełnione zostały o wprowadzenie

obejmujące zagadnienia związane z tematyką pracy, cele badawcze, podsumowanie wyników oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Dodatkowo do pracy dołączone zostały oświadczenia współautorów prac tworzących monotematyczny cykl publikacji. Z zawartych w rozprawie doktorskiej oświadczeń wynika, że udział Doktorantki w pracach eksperymentalnych był znaczący. Równie wysoko oceniam zaangażowanie Doktorantki w prace związane z przygotowaniem manuskryptów do publikacji. Pani mgr Katarzyna Terejko jest pierwszym i zarazem korespondencyjnym autorem, w dwóch z trzech, przedstawionych do recenzji prac.

Wszystkie opisane w publikacjach badania przeprowadzone zostały w ramach dwóch grantów przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki. Kierownikiem obu projektów był prof. Jerzy Mozrzyk, który sprawował także bezpośredni nadzór nad pracą doktorską mgr Katarzyny Terejko jako promotor.

### **Ocena merytoryczna pracy**

Podstawową jednostką strukturalną i funkcjonalną układu nerwowego są neurony, które komunikują się ze sobą bądź na drodze chemicznej bądź elektrycznej. W synaptycznej transmisji chemicznej nośnikiem informacji są związki chemiczne określane mianem neuroprzekaźników. Połączenie neuroprzekaźnika ze ściśle określonym białkiem receptorowym prowadzi do pobudzenia lub zahamowania aktywności neuronu docelowego. Jednym z głównych neuroprzekaźników biorących udział w procesie hamowania jest kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA), który łącząc się z receptorami GABAergicznymi wywołuje określony efekt fizjologiczny. Należy jednak podkreślić, że receptory GABAergiczne stanowią niejednorodną grupę białek receptorowych, w obrębie których wyróżniono trzy typy receptorów: receptory GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> oraz najmniej poznane receptory GABA<sub>C</sub>. Jak ważną rolę pełni kwas  $\gamma$ -aminomasłowy w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego może świadczyć chociażby fakt, że zaburzenia transmisji GABAergicznej leżą u podstaw patogenezy takich schorzeń neurologicznych i psychicznych jak padaczka, autyzm czy schizofrenia.

**Tematyka recenzowanej pracy oscyluje wokół zagadnień związanych z budową oraz procesem aktywacji receptora GABA<sub>A</sub>.** Te pentameryczne kanały jonowe charakteryzują się niezwykle dużą różnorodnością funkcjonalną będącą wynikiem występowania 19 typów podjednostek białkowych wchodzących w skład receptora GABA<sub>A</sub>. W ośrodkowym układzie nerwowym najczęściej występującą postacią receptora GABA<sub>A</sub> jest postać o składzie jednostkowym  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ . Warto podkreślić, że obecność określonych typów podjednostek w danym receptorze determinuje jego podatność na modulację przez liczne związki farmakologiczne, w tym stosowane na szeroką skalę w klinicyście benzodiazepiny, barbiturany, anestetyki i neurosteroidy. Przyłączenie agonisty do, występujących w domenie zewnątrzkomórkowej, miejsc wiązania prowadzi najpierw do aktywacji receptora GABA<sub>A</sub>, a następnie



do otwarcia, zlokalizowanej w domenie transbłonowej, bramki kanału jonowego. **Co ciekawe, pomimo wieloletnich badań molekularne mechanizmy leżące u podstaw procesu aktywacji receptora GABA<sub>A</sub> oraz jego modulacji przez związki farmakologiczne wciąż nie są w pełni poznane.**

Głównym celem badań opisanych w spójnym cyklu publikacji było: **1/** określenie roli, zlokalizowanych w domenie zewnątrzkomórkowej, aminokwasów aromatycznych  $\alpha_1$ F14,  $\beta_2$ F31 i  $\beta_2$ F200 w procesie aktywacji oraz bramkowania receptora GABA<sub>A</sub> typu  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ ; **2/** określenie wpływu flurazepamu (leku z grupy benzodiazepin) na proces bramkowania rekombinowanego receptora GABA<sub>A</sub> zawierającego mutacje w miejscu wiązania agonisty (w pozycji  $\alpha_1$ F64 i  $\beta_2$ F200). Wszystkie zawarte w pracach dane pochodzą z badań, w których zastosowano wysokiej rozdzielczości techniki elektrofizjologiczne (technikę *patch-clamp*) oraz modelowanie kinetyczne.

W pierwszej z prac [**manuskrypt A1**], stanowiących spójny tematycznie cykl, poruszone zostało zagadnienie związane z modulacją aktywności receptora GABA<sub>A</sub> przez flurazepam. W omawianej pracy zamieszczone zostały wyniki dotyczące wpływu tego związku na spontaniczną oraz indukowaną podaniem agonisty aktywność receptorów typu dzikiego oraz receptorów z mutacją w pozycji  $\alpha_1$ F64. Analiza pozyskanych w trakcie badań elektrofizjologicznych danych wykazała, że flurazepam zwiększa aktywność zarówno receptorów typu dzikiego jak i receptorów rekombinowanych. Dodatkowo przedstawione zostały wyniki, które sugerują, że mechanizmy odpowiedzialne za modulację aktywności receptora GABA<sub>A</sub>, podczas aktywności spontanicznej i wywołanej podaniem agonisty, różnią się między sobą. Chciałam podkreślić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki są niezwykle cenne, bowiem poszerzają wiedzę na temat działania leków z grupy benzodiazepin na receptor GABA<sub>A</sub>. Co więcej rzucają nowe światło na temat zależności między strukturą a funkcją badanego receptora. Warto też dodać, że zawarte w pracy wyniki mają duży potencjał aplikacyjny i mogą stać się przyczynkiem do szerszych badań mających na celu opracowanie nowych leków z grupy benzodiazepin. Biorąc pod uwagę fakt, że receptory GABAergiczne odgrywają kluczową rolę w patogenezie licznych schorzeń neurologicznych i psychicznych uzyskane przez Doktorantkę wyniki wydają się być nie do przecenienia.

W drugiej z prac [**manuskrypt A2**] Autorzy podjęli się próby określenia roli fragmentu makrocząsteczki białka receptorowego, określanego mianem pętli C, w procesie aktywacji receptora GABA<sub>A</sub>. Z dostępnych w literaturze danych wiadomo, że pętla C po przyłączeniu agonisty do receptora ulega zmianom konformacyjnym, które prowadzą do tzw. „nakrywania” (ang. *capping*) miejsca wiązania. Wyniki badań przeprowadzonych na rekombinowanych receptorach GABA<sub>A</sub> (receptorach z mutacją reszty aminokwasowej w pozycji  $\beta_2$ F200) dostarczyły niezbitych dowodów na to, że rola badanego fragmentu białka jest znacznie większa w aktywacji receptora niż pierwotnie sądzono i nie ogranicza się wyłącznie do udziału w procesie wiązania agonisty. Zawarte w manuskrypcie dane

sugerują, że zasadniczo wszystkie etapy aktywacji receptora GABA<sub>A</sub>, czyli wiązanie agonisty, preaktywacja, zamykania i otwierania kanału, a także desesytyzacja zależne są od skuteczności „nakrywania” miejsca wiązania przez pętlę C. Dodatkowo zostało dowiedzione, że wywołująca deformację pętli C mutacja w pozycji  $\beta_2$ F200, zmienia wrażliwość rekombinowanego receptora na flurazepam.

W ostatniej z prac [manuskrypt A3] zaprezentowane zostały z kolei wyniki wskazujące na kluczową rolę peryferyjnych obszarów domeny zewnątrzkomórkowej receptora GABA<sub>A</sub> w procesie jego aktywacji. Przedstawione w omawianej pracy dane są również bardzo wartościowe, ponieważ wspomniany powyżej obszar białka receptorowego jest stosunkowo słabo zbadany, a jego rola w procesie aktywacji i bramkowaniu receptora GABA<sub>A</sub> nie do końca poznana. Doktorantka, wraz ze współautorami pracy wykazała, że mutacje zlokalizowanych w domenie zewnątrzkomórkowej fenyloalanin  $\alpha_1$ F14 i  $\beta_1$ F31 upośledzają w zasadzie wszystkie procesy związane z aktywacją i bramkowaniem receptora GABA<sub>A</sub>.

**Podsumowując opisane w monotematycznym cyklu publikacji wyniki badań wyraźnie wskazują, że mutacje kluczowych aminokwasów aromatycznych, występujących w domenie zewnątrzkomórkowej receptora GABA<sub>A</sub>, upośledzają większość etapów związanych z jego aktywacją oraz bramkowaniem kanału jonowego. Co więcej, dostarczają nowych informacji na temat zależności między wybranymi rejonami domeny zewnątrzkomórkowej i ich rolą w procesie aktywacji receptorów GABA<sub>A</sub>.**

Chciałam podkreślić, że zawarte w rozprawie doktorskiej wyniki badań poddane zostały już ocenie merytorycznej przez ekspertów podczas procesu ich publikacji w prestiżowych czasopismach naukowych, dlatego też nie mam większych uwag do zawartych w pracach danych eksperymentalnych. Niemniej jednak chciałabym poprosić Doktorantkę, żeby podczas publicznej obrony:

- 1/ odniosła się do danych, które sugerują, że kwas  $\gamma$ -aminomasłowy w określonych warunkach może prowadzić, nie do zahamowania aktywności neuronu docelowego, lecz jego podbudzenia;
- 2/ przedstawiła krótką charakterystykę pozostałych dwóch typów receptorów GABAergicznym (receptorów GABA<sub>B</sub> i GABA<sub>C</sub>) wskazując na podobieństwa oraz różnice między tymi receptorami, a badanym przez siebie typem receptora (receptorem GABA<sub>A</sub>).

### **Ocena formalna pracy**

Treść rozprawy doktorskiej odpowiada tytułowi pracy oraz sformułowanym celom badawczym. Dobór piśmiennictwa jest poprawny, a zamieszczony w pracy wykaz bibliografii nie budzi żadnych



zastrzeżeń. Wszystkie pozycje posiadają pełne noty bibliograficzne oraz swoje odpowiedniki w tekście. Precyzyjnie wyselekcjonowane materiały źródłowe pozwoliły na przygotowanie ciekawego wstępu i umożliwiły syntetyczne omówienia uzyskanych wyników.

Pod względem językowym praca została napisana poprawnie. Choć nie ma w niej rażących błędów stylistycznych, ani niezgrabności językowych, to Doktorantce niestety nie udało się uniknąć błędów interpunkcyjnych. Mam też uwagę, która dotyczy obecnych w pracy sformułowań będących „kalką językową” anglojęzycznych zwrotów. Sugerowałabym, aby w polskojęzycznych opracowaniach naukowych unikać tego typu sformułowań, tym bardziej, że większość z nich posiada swoje odpowiedniki w języku polskim (i tak np. słowo „inhibicja” można zastąpić słowem „hamowanie”). Przedstawione powyżej drobne uwagi nie mają absolutnie żadnego wpływu na bardzo wysoką ocenę recenzowanej pracy.

### **Podsumowanie i ostateczne wnioski**

Zastosowanie właściwych metod doświadczalnych oraz prawidłowe wnioskowanie przyczyniło się do uzyskania przez mgr Katarzynę Terejko wartościowych wyników o nowatorskim charakterze. Godny uwagi jest fakt, że otrzymane przez Doktorantkę rezultaty mogą wyznaczać nowe kierunki badań farmakologicznych i przyczynić się do opracowania leków nowej generacji, które mogłyby nie tylko w precyzyjny, ale także pożądany z punktu klinicznego, sposób modulować aktywność receptorów GABA<sub>A</sub>. **Zatem stwierdzam, że w mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Terejko spełnia wszelkie wymogi określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami).** Z związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Katarzyny Terejko do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zważywszy na ciekawe koncepcje badawcze zawarte w pracy doktorskiej, potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników, formę przedstawionej rozprawy doktorskiej (3 publikacje w czasopiśmie o stosunkowo wysokich współczynnikach oddziaływania) **wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o wyróżnienie zarówno recenzowanej rozprawy doktorskiej, jak i Doktorantki, stosowną nagrodą.**

  
dr hab. Renata Bocian