

Lublin, 15 stycznia 2018 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki  
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Pawła Mystka pt. „Przekazywanie sygnałów w układzie dopaminergicznym – lokalizacja i oddziaływanie receptora dopaminowego D<sub>1</sub> z białkami G”**

Jedną z moich fascynacji rozwiązaniami jakie stosuje Natura w organizmach żywych wiąże się z wykorzystywaniem bardzo podobnych struktur, oraz działających w oparciu o nie mechanizmów molekularnych, do realizacji różnorodnych, odległych i pozornie niezwiązanych funkcji fizjologicznych. Reprezentatywnym przykładem tego typu rozwiązań wydaje się być klasa transmembranowych receptorów błonowych oddziałujących z białkami G, które, na przykład, mogą brać udział w recepcji i przewodzeniu sygnałów związanych z zapachem, z drugiej zaś strony stanowią bazę fotoreceptorów w narządach wzroku. Okazuje się, że do tej samej klasy receptorów wpisuje się również receptor dopaminowy D<sub>1</sub> pełniący kluczową rolę w przekazywaniu oraz modulowaniu sygnałów nerwowych. Pomimo wagi zagadnień związanych z aktywnością układu dopaminergicznego, w znacznej mierze związanych z leczeniem chorób układu nerwowego, oraz znacznej aktywności wielu ośrodków badawczych na świecie, w obszarze badawczym związanym z transdukcją sygnałów z udziałem dopaminy, wiedza w tym zakresie wydaje się być daleka od kompletnej. Tematyka rozprawy doktorskiej przedstawionej przez pana mgr. Pawła Mystka dotyczy bezpośrednio najbardziej aktualnych problemów

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki  
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1  
20-031 Lublin  
tel. (81) 537 62 50  
fax (81) 537 61 91  
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



poznawczych związanych z mechanizmami molekularnymi zaangażowanymi w funkcjonowanie receptora dopaminowego D<sub>1</sub>, w szczególności jego oddziaływania z białkami G. W świetle powyższych uwag, tematykę rozprawy doktorskiej postrzegam nie tylko jako aktualną oraz interesującą ale również bardzo ważną.

Praca doktorska mgr. Pawła Mystka przygotowana została w renomowanym Zakładzie Biochemii Fizycznej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem pani profesor Marty Dziejickiej-Wasylewskiej oraz pani dr Agnieszki Polit, w charakterze promotora pomocniczego. Rozprawa zredagowana została na 125 stronach standardowego maszynopisu, w języku polskim, według typowego, optymalnego w moim odczuciu układu. Rozprawę otwiera wykaz ważniejszych skrótów i oznaczeń stosowanych w rozprawie oraz obszerne, dwustronicowe streszczenie, które dzięki swojemu przemyślanemu układowi już stanowi niejako wprowadzenie w problematykę badawczą związaną z pracą doktorską. Bardziej szczegółowa prezentacja zarówno klasycznych, ugruntowanych oraz otwartych problemów poznawczych związanych z udziałem białek G w transdukcji sygnałów w żywych organizmach oraz z receptorami z grupy GPCR (ang. G Protein Coupled Receptors), w szczególności receptorów dopaminowych, znalazła miejsce w rozprawie w ramach rozdziału 1. pt. „Wstęp”. Rozdział ten stanowi, moim zdaniem, doskonale zredagowany przegląd literaturowy, o ogromnej wartości dla studentów oraz młodych adeptów nauki, ze względu na to iż prezentuje najbardziej aktualny stan wiedzy w tym zakresie. Cele rozprawy, zarówno cel strategiczny jak i cele cząstkowe stanowiące wyzwania poznawcze poszczególnych zadań badawczych, sformułowane zostały w ramach jednostronicowego rozdziału 2. pt. „Cel pracy”. Rozdział 3., zawierający klarowne, tabelaryczne zestawienia używanych materiałów otwiera część prezentującą wyniki prac prowadzonych w ramach projektu doktorskiego. Kolejny element tej prezentacji stanowią precyzyjne i obszerne opisy stosowanych metod preparatyki oraz procedur pomiarowych, zamieszczone w ramach rozdziału 4. pt. „Metody”. Z jednej strony, poziom szczegółowości prezentowanych opisów odpowiada standardowi, zgodnie z którym analogiczne eksperymenty mogłyby być odtworzone w innych laboratoriach, z drugiej strony, lektura tych opisów stanowi zapowiedź analizy zaawansowanych a nawet, można by powiedzieć, „wyrafinowanych” eksperymentów precyzyjnie zaprojektowanych w celu weryfikacji mechanizmów molekularnych postulowanych w ramach dwóch konkurencyjnych, popularnych



hipotez naukowych. W celu przeprowadzenia badań zaprojektowane zostały specyficzne modyfikacje genetyczne eukariotycznej linii komórkowej HEK 293, umożliwiające wprowadzenie oraz znakowanie białkami fluorescencyjnymi o różnej fali emisji światła, białek fuzyjnych podjednostki  $G\alpha$  oraz receptora  $D_1$ . W celu analizy porównawczej dyfuzji tych białek w różnych, istotnych z fizjologicznego punktu widzenia układach, między innymi w warunkach obniżonego stężenia cholesterolu, Doktorant zastosował nowoczesną i precyzyjną metodę opierającą się na konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej, umożliwiającą analizę odrostu intensywności fluorescencji po fotowysbieleniu impulsem światła laserowego o znacznej intensywności (tzw. FRAP, fluorescence recovery after photobleaching, ang.). Podejście to umożliwia wyznaczenie pozornych współczynników dyfuzji lateralnej w środowisku membranowym badanych, znakowanych fluorescencyjnie białek. Porównywalnie precyzyjne analizy można by również przeprowadzić w oparciu o podejście tzw. „Planar-FCS”, jednakże, zapewne przy niższych stężeniach białek membranowych. Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej, przedstawione są w rozprawie w ramach rozdziału 5. pt. „Rezultaty”. Układ tego rozdziału odpowiada sekwencji zadań badawczych realizowanych w ramach projektu doktorskiego, zapowiadanych już w ramach rozdziału drugiego. Interpretacja wyników zamieszczona została równoległe i bezpośrednio wraz z ich prezentacją oraz poddana wszechstronnej dyskusji w ramach rozdziału 6. pt. „Dyskusja”. Zasadnicze rezultaty uzyskane w ramach pracy doktorskiej zebrane zostały i przedstawione w formie punktowej w ramach rozdziału 7. pt. „Wnioski końcowe”. Rozprawę zamyka wykaz cytowanego piśmiennictwa, prezentowany jako rozdział 8. pt. „Bibliografia”.

W pełni podzielam zdanie Doktoranta w zakresie wskazania najważniejszych osiągnięć pracy, wyartykułowanych w ramach rozdziału „Wnioski końcowe”. Szczególnie interesujące, oryginalne oraz wartościowe wydaje mi się wykazanie, iż żadna z dwóch popularnych a zarazem konkurencyjnych koncepcji dotyczących mechanizmów oddziaływania białek G z receptorem dopaminowym  $D_1$  nie jest do końca uzasadniona, zaś najbardziej prawdopodobne wydają się poglądy postulujące funkcjonowanie mechanizmu pośredniego. Oznacza to, iż wyniki eksperymentów nie potwierdzają koncepcji zakładającej związanie receptora  $D_1$  z podjednostką  $G\alpha$  jeszcze przed aktywacją receptora przez cząsteczkę agonisty, co mogłoby tłumaczyć wyjątkową szybkość i sprawność szlaku transdukcji sygnału, ale również nie wskazują na pełne uzależnienie oddziaływania tych białek od statystycznych kolizji w ich ruchu dyfuzyjnym.



Koncepcja, która wyłania się w oparciu o wyniki badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej pana mgr. Pawła Mystka wskazuje natomiast na kluczową rolę lokalnych domen membranowych, stanowiących wspólne środowisko dla białek receptorów  $D_1$  oraz podjednostek  $G\alpha$ .

Na podkreślenie zasługuje również klarowność języka rozprawy oraz jej wyjątkowo wysoki poziom edytorski, w tym również w odniesieniu do jakości prezentowanych grafik. Mógłbym zaproponować Autorowi jedynie kilka drobnych korekt. Oto ich krótka lista:

1. Str. 13., 14. wiersz od góry, zamiast „transdukują sygnału, raczej „transdukują sygnał”, a może nawet „przekazują sygnał”,
2. Str. 19, 6. wiersz od dołu, „konformacją spoczynkową” w miejsce „konformacją spoczynkowa”,
3. Str. 50., Rysunek 4.1, proponuje zamieścić pasek skali na prezentowanych obrazach mikroskopowych,
4. Str. 89., 5. wiersz od góry, proponuję „palmitoilacji” zamiast „palmotoilacji”.

Tak wieloaspektowe oraz obszerne opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską mgr. Pawła Mystka, dostarcza wielu ważnych i nowych informacji pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Bardzo interesujące wyniki dotyczą, moim zdaniem, wpływu obniżenia poziomu cholesterolu w błonach na szybkość dyfuzji białek. Osobiście spodziewałbym się, iż niższe stężenie cholesterolu wpłynie na podniesienie płynności membrany oraz wzrost pozornego współczynnika dyfuzji białek błonowych. O ile wynik taki obserwowany jest w przypadku podjednostki  $G\alpha$  to już nie w przypadku samego receptora  $D_1$ . Wskazuje to na bardziej złożony mechanizm molekularny związany ze swobodą dyfuzyjną białek membranowych i ich związkiem z obecnością małych cząsteczek, jak cholesterol, wpływających na właściwości fizyczne i organizację błon lipidowo-białkowych. W ramach dyskusji proponowany jest w rozprawie wpływ cholesterolu na formowanie struktur



