

Prof. dr hab. Andrzej Klein
Zakład Biochemii Ogólnej
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Ewy Błasiak pt. "Fluorescencyjne badania oddziaływań receptorów dopaminowych w układzie modelowym *in vitro* – rola polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w obrębie receptorów D₂".

Zaburzenia w funkcjonowaniu receptorów dopaminowych mogą powodować zmiany patologiczne prowadzące do szeregu schorzeń neuropsychiatrycznych takich jak: schizofrenia, ADHD czy choroba Parkinsona. Nic więc dziwnego, że mechanizm przekazu sygnałów zewnątrzkomórkowych z udziałem tych receptorów jest przedmiotem badań prowadzonych w wielu laboratoriach, między innymi w kierowanym przez prof. dr hab. Martę Dziejicką-Wasylewską Zakładzie Biochemii Fizycznej na naszym Wydziale. Szczególnym zainteresowaniem Zespołu kierowanego przez Panią Profesor cieszy się rola oligomeryzacji receptorów dopaminowych w przekazie sygnału zewnątrzkomórkowego.

Zagadnienie oligomeryzacji (głównie di- i tri- i tetrameryzacji) receptorów błonowych jest badane od dawna, szczególnie w przypadku receptorów jednokrotnie przebijających błonę komórkową. Przełom w tej dziedzinie stanowiły prace nad dimeryzacją receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej. Ale w tym przypadku uzasadnienie istotności procesu dimeryzacji w mechanizmie przekazu zewnątrzkomórkowego jest oczywiste, proces krzyżowej fosforylacji dwóch receptorów jest niezbędny do zakotwiczenia (i wyboru) substratów kinazy tyrozynowej receptora. W przypadku receptorów asocjujących z białkami G (GPCR), a do tej grupy należą receptory dopaminowe, zasadność biologiczna oligomeryzacji (dimeryzacji) receptorów wcale nie jest taka oczywista.

Celem pracy doktorskiej pani Ewy Błasiak było badanie dimeryzacji receptorów dopaminowych. Poszczególne zadania badawcze obejmowały między innymi:

- - użycie techniki FLIM-FRET do badania oligomeryzacji receptorów GPCR
- - zbadanie wpływu wybranych wariantów genetycznych receptora dopaminowego D2 (uzyskanych w wyniku mutacji V96A, P310S i S311C) na tworzenie heterodimerów receptorów D1-D2
- - wykazanie pośrednictwa ww. heterodimerów w stymulacji sygnału wapniowego
- - stworzenie układu modelowego *in vitro* nadającego się do badania oddziaływań receptory dopaminowe - białka G.

Pani mgr Ewa Błasiak podjęła badania procesu dimeryzacji receptorów dopaminowych D₁ i D₂ wykorzystując współczesne techniki biochemii fizycznej i biologii molekularnej. Zanim jednak o metodach, przyjrzyjmy się informacjom przedstawionym we „Wstępie”.

Bardzo obszerny wstęp można podzielić na dwie części: pierwszą – omawiającą receptory sprzężone z białkami G, same białka G, układ dopamina-receptory D₁ i D₂ oraz mechanizm ich aktywacji, i drugą – opisującą systemy ekspresji białek wykorzystywane m.in. do badania GPCR oraz nowoczesne metody badania tych białek.

Część pierwsza to konsekwentnie i w logicznej kolejności przedstawiane informacje na temat receptorów typu GPCR oraz mechanizmów przekazu sygnału z udziałem białek G. Są jednak pytania, na które albo nie ma jeszcze odpowiedzi albo jest tylko połowiczna odpowiedź. A najważniejsze z nich to: jaki jest sens biologiczny oligomeryzacji receptorów sprzężonych z białkami G? Doktorantka odpowiada na to pytanie w części zatytułowanej „Fizjologiczne znaczenie oligomeryzacji”, wymieniając: a) specyficzność wiązania, b) regulację siły sygnału, c) internalizację i d) zróżnicowanie ścieżek sygnałowych. Nie ulega wątpliwości, że podstawową, aczkolwiek nie jedyną, funkcją internalizacji receptorów (wszystkich receptorów błonowych) jest usuwanie kompleksów ligand receptor z powierzchni błony komórkowej. Dimeryzacja (oligomeryzacja) receptorów może regulować siłę sygnału, ale moim zdaniem tylko w przypadku niektórych typów receptorów błonowych (np. receptorów zbudowanych z kilku różnych podjednostek). Jeśli chodzi o zróżnicowanie ścieżek sygnałowych to w pełni zgadzam się z autorką, że heterodimery mogą indukować odmienny od monomerów sygnał wewnątrzkomórkowy, jak to ma miejsce np. w przypadku receptorów ErbB. Ponieważ wykazano istnienie homooligomerów receptorów dopaminowych, pytanie na które nie znalazłem odpowiedzi w recenzowanej pracy brzmi - czy mechanizm przekazu sygnału z udziałem monomeru receptora dopaminowego (np. D₁) jest taki sam jak z udziałem homodimeru (np. D₁-D₁) ?

W drugiej części wstępu doktoranta omawia systemy heterologicznej ekspresji białek oraz wskazuje na zalety stosowanych przez nią metod fluorescencyjnych w badaniach receptorów asocjujących z białkami G. Nie ulega wątpliwości, że rozwój technik inżynierii genetycznej i wprowadzenie metod spektroskopii fluorescencyjnej przyspieszyło tempo badań nad wieloma problemami, związanymi z przekazywaniem sygnału przez ww. receptory, między innymi mechanizmów wiązania liganda i aktywacji receptorów, oddziaływań między-receptorowych, interakcji z białkami G itp. Konstrukcja wprowadzenia w część doświadczalną pracy doktorskiej pani Ewy Błasiak oraz zakres omawianych w niej problemów bardzo dobrze świadczą o przygotowaniu teoretycznym doktorantki.

Autorka posługuje się swobodnie licznymi i zróżnicowanymi metodami biochemii, biologii molekularnej i komórkowej, które szczegółowo omawia w rozdziale „Materiały i Metody”. Trudno je wymienić wszystkie. Wymienię tylko niektóre, aby podkreślić szeroki wachlarz doświadczeń, których wyniki składają się na całość pracy doktorskiej mgr E. Błasiak. Są to między innymi: hodowle komórek ludzkich, owadzie i bateryjnych, techniki manipulacji DNA (wprowadzanie cDNA do wektora plazmidowego i tworzenie białek fuzyjnych, wprowadzanie mutacji punktowych, metoda PCR, analiza restrykcyjna i sekwencjonowanie DNA). Ponadto, analiza wiązania ligand-receptor, mikroskopia konfokalna, metody pomiaru zmian wydajności transferu energii (FLIM-FRET), metody chromatograficzne (jonowymienna i powinowactwa). Wszystkie one wskazują na wszechstronne przygotowanie doświadczalne doktorantki do realizacji założonych celów badawczych. Wiele metod może być adoptowanych do badań interakcji białko-białko, ale

tylko niektóre z nich mogą być użyte w żywych komórkach. Między innymi są to metody: mikroskopii obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM, ang. Fluorescence lifetime imaging microscopy) oraz rezonansowego przeniesienia energii fluorescencji (FRET, ang. fluorescence resonance energy transfer). Mimo wielu zalet, metody te mają także szereg ograniczeń. Wynika to z faktu, że wydajność transferu zależy od wzajemnej orientacji cząsteczek fluorescencyjnych i od odległości między nimi. W praktyce, ilościowe pomiary metodami FLIM i FRET są ograniczone przez jakość sygnału i poziom szumów. Dlatego, jednym z zadań badawczych, które postanowiła rozwiązać doktorantka było dostosowanie techniki FLIM-FRET do badania oligomeryzacji receptorów dopaminowych.

Część doświadczalna (wyniki pracy obejmujące wiele aspektów doświadczalnych) napisana jest zwięźle i precyzyjnie. Poszczególne podrozdziały: analiza zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, badanie heterodimeryzacji receptorów dopaminowych, tworzenie układu modelowego do badania receptorów dopaminowych z białkami G są napisane poprawnie. Duża ilość wyników sprawia, że prezentowane są tylko rezultaty przykładowe, co dobrze wpływa na ich czytelność. Dobre jakościowo zdjęcia z mikroskopu konfokalnego oraz rozdziałów elektroforetycznych, dobrze opracowane tabele oraz przejrzysta (poza rysunkiem 5.26) ilustracja graficzna stanowią, iż ta część pracy prezentuje się bardzo dobrze. Znaleźć można drobne potknięcia w opisach rysunków, np. Rys.5.1 „Przykładowe zdjęcia elektroforezy...”, prawdopodobnie chodziło o zdjęcia elektroforogramów (rozdziałów elektroforetycznych) nie mają wpływu na ocenę tej części pracy.

Obszerna dyskusja przeprowadzona jest wszechstronnie i wyczerpująco. Zarówno układ tekstu, z wyraźnie postawionymi problemami w formie podtytułów (wybór obiektu badań, wpływ zmian polimorficznych na wiązanie liganda, oddziaływanie z receptorem D1 i przekaz sygnału oraz zaproponowany układ modelowy do badania oddziaływań receptory dopaminowe-białka G) jak i sposób prowadzenia wywodu są bez zarzutu. Bardzo dobrym otwarciem dyskusji jest zwrócenie uwagi na niejednoznaczne (a czasami sprzeczne) informacje na temat roli receptorów sprzężonych z białkami G w aktywacji układów efektorowych. Różnice we właściwościach oligomerów receptorów i receptorów monomerycznych stanowią interesujący problem z punktu widzenia nie tylko teorii ale także terapii chorób neuropsychiatrycznych. I to potencjalne znaczenie fizjologiczne heterodimerów receptorów dopaminowych jest wystarczającym uzasadnieniem wyboru tematyki badawczej pracy doktorskiej mgr Ewy Błasiak.

Główny nurt badań recenzowanej pracy obejmował wpływ zmian polimorficznych receptora D2 na mechanizm przekazu sygnału zewnątrzkomórkowego przez heterodimer D1-D2. Sugerowany przez autorkę brak wpływu mutacji punktowych na wiązanie liganda jest moim zdaniem w przypadku mutacji V96A (dwukrotna różnica w wartości stałej dysocjacji) dyskusyjny. Dobrze udokumentowana jest hipoteza aktywacji fosfolipazy C jako układu efektorowego heterodimeru D1-D2. Natomiast, nie wiem co miała na myśli autorka twierdząc, że jest to „unikalna kaskada sygnalizacyjna”, bowiem pośredniczy ona w różnych szlakach sygnalizacyjnych indukowanych wieloma ligandami.

Zastrzeżenia autorki w stosunku do stosowanych obecnie metod określania wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia (także z użyciem stosownego w recenzowanej pracy znacznika Flou-4) są uzasadnione, zwłaszcza że poziom ten jest regulowany przez wiele mechanizmów stymulowanych zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowo, trudnych do kontroli, nawet w warunkach *in vitro*. Dyskusja stosowanych przez doktorantkę metod fluorescencyjnych w odniesieniu do połączenia

mikroskopii czasu życia fluorescencji z rezonansowym przeniesieniem energii fluorescencji przeprowadzona jest rzeczowo i obiektywnie. Zarówno w odniesieniu do wyników własnych jak i uzyskanych przez innych autorów. Brakuje mi jednak odpowiedzi wprost na pytanie czy zahamowanie dimeryzacji (w przypadku heterodimru D1-D2) blokuje przekaz sygnału z udziałem jonów wapniowych i czy takie doświadczenia były prowadzone, podobnie jak to miało miejsce w przypadku receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej.

Praca doktorska mgr Ewy Błasiak napisana jest prawie bezbłędnie, pomijam nieliczne błędy maszynowe i nieszczęśliwe sformułowania typu: „...pomiarów czasów życia fluorescencji przeprowadzono na mikroskopie konfokalnym..” (str. 56) lub „komórki....zawieszano w 7 ml odpowiedniej ciepłej pożywki i pozostawiano na butelce hodowlanej” (str.51). Ale tego rodzaju wpadki można policzyć na palcach jednej ręki. Niewątpliwą zaletą tej pracy jest wszechstronne podejście do problemu jakościowej i ilościowej analizy wyników, ich właściwa interpretacja oraz obszerna dyskusja z wynikami uzyskanymi przez innych.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi rozprawy doktorskiej i występuję z wnioskiem do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Ewy Błasiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej pani mgr E. Błasiak za istotny wkład w badania interakcji receptorów dopaminowych i nowe spojrzenie na mechanizm sygnalizacji z udziałem heteroligandów D₁-D₂, co może mieć także znaczenie w nowym podejściu do leczenia wybranych chorób neurologicznych.

