



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz
Katedra Biofizyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

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

Rola receptorów dopaminowych w funkcjonowaniu układu nerwowego, w etiopatogenezie chorób neuropsychiatrycznych i ich terapii jest trudna do przecenienia. Duża liczba badań poświęcona jest związkowi pomiędzy występowaniem polimorficznych form receptora D₂ a występowaniem takich chorób, szczególnie schizofrenii. Molekularne aspekty działania, a zwłaszcza współdziałania receptorów D₁ i D₂ są ciągle jednak kryją szereg tajemnic, przede wszystkim dlatego, że ich badania są niełatwe i wymagają dysponowania wyrafinowanym warsztatem badawczym. Te trudne, a fascynujące badania są od wielu lat prowadzone w zespole prof. Marty Dziedzickiej-Wasylewskiej, a kolejny ich etap został podsumowany w rozprawie doktorskiej mgr Ewy Błasiak.

Świetnie napisana rozprawa doktorska mgr Ewy Błasiak ma typowy układ. Rozpoczyna ją *Wstęp*, który zapozna Czytelnika z klasyfikacją i strukturą receptorów sprzężonych z białkami G, zwłaszcza z białkami najliczniej reprezentowanej klasy A, zagadnieniem oligomeryzacji receptorów sprzężonych z białkami G i jej rolą fizjologiczną, heterotrimerycznymi białkami G, mechanizmem przekazywania sygnału z udziałem białek G, a następnie bardziej szczegółowo z receptorami dopaminowymi – ich polimorfizmem, oligomeryzacją, mechanizmem przekazywania sygnału z udziałem receptorów D₁ i D₂ oraz funkcjonalnymi konsekwencjami oligomeryzacji tych receptorów. Dalsza część *Wstępu* przedstawia metody stosowane w pracy: systemy heterologicznej ekspresji białek wykorzystywane w badaniach receptorów sprzężonych z białkami G, spektroskopię fluorescencji, mikroskopię obrazowania czasów życia fluorescencji i metody wysokoprzepustowe. *Wstęp* jest znakomitym i kompetentnym wprowadzeniem w zagadnienia będące przedmiotem części doświadczalnej rozprawy.

Za cel pracy doktorskiej mgr Ewa Błasiak postawiła sobie zbadanie wpływu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu występujących w obrębie receptora dopaminowego D₂ na oddziaływanie receptorów dopaminowych D₁ i D₂. Poszczególne zadania badawcze służące realizacji tego celu obejmowały: (i) zbadanie wpływu wariantów genetycznych receptora dopaminowego D₂ na zmiany stężenia jonów wapnia w cytoplazmie wywołane aktywacją ścieżki sygnalizacyjnej indukowanej przez aktywację heterodimeru D₁D₂, (ii) zastosowanie techniki FLIM-FRET do badania oligomeryzacji receptorów sprzężonych z białkami G, (iii) zbadanie wpływu wariantów polimorficznych receptora dopaminowego D₂ na tworzenie heterodimerów w błonie komórkowej i wpływu ligandów na stopień asocjacji receptorów dopaminowych oraz

(iv) stworzenie układu modelowego *in vitro* do badania oddziaływania receptorów dopaminowych z podjednostkami białek G. Porównanie oddziaływań różnych form polimorficznych receptora D₂ wydaje się być zamysłem celnym, bowiem dane dotyczące molekularnych konsekwencji mutacji tego receptora są nieliczne.

Stosowane w pracy metody biologii molekularnej, biochemii, biofizyki i farmakologii opisane są należycie szczegółowo. Za bardzo dobry pomysł uznać należy zastosowanie techniki FLIM-FRET do badań oligomeryzacji receptorów, ze względu na jej wysoką rozdzielczość przestrzenną i czasową i znaczny stopień niezależności od stężenia fluoroforów, co jest niezwykle istotne w badaniach ekspresji konstruktyw kodujących białka hybrydowe w układach komórkowych.

Doktorantka przygotowała konstrukty kodujące trzy muteiny receptora D₂ (V96A, P310S i S311C), uzyskała przejściową ekspresję białka wyjściowego i mutein oraz stabilną ekspresję obu receptorów w komórkach HEK 293. Zbadła wiązanie znakowanego liganda (³H-rakloprydu). Wyniki tych badań wskazują na około dwukrotne podwyższenie wartości stałej dysocjacji w przypadku mutanta V96A. Niemożliwe okazało się badanie zmian poziomu cytoplazmatycznego wapnia w komórkach wykazujących przejściową ekspresję receptora D₂. Doktorantka posłużyła się więc konstrukty zawierającymi oba receptory, stymulując receptory specyficznymi agonistami (chloro-APB dla receptora D₁, kwinirolu dla receptora D₂ i SKF 83959 dla dimeru D₁D₂) i stwierdziła wzrost poziomu cytoplazmatycznego wapnia po stymulacji mieszaniną chloro-APB i kwinirolu lub związkiem SKF 83959. Niezbyt oczywiste są przyczyny wzrostu poziomu wapnia w cytoplazmie komórek ekspresujących jedynie receptor D₁; jak to jednak wyjaśnia Doktorantka w Dyskusji (s. 100), komórki HEK 293 wykazują endogenną ekspresję receptora D₂.

Doktorantka skonstruowała białka fuzyjne łączące sekwencje receptorów D₁ i D₂ z sekwencją białka fluoryzującego mEGFP lub mCherry. Założeniem wyjściowym w tego typu badaniach jest brak zaburzenia lokalizacji i funkcji białek w wyniku połączenia ich sekwencji z sekwencją reporterowego białka fluoryzującego; słuszność tego założenia winna być jednak każdorazowo zweryfikowana. Sprawdzając lokalizację białek fuzyjnych Autorka rozprawy stwierdziła brak błonowej lokalizacji konstruktyw białka D₂; co uniemożliwiało badania ich oddziaływań w błonie plazmatycznej, pokonała jednak ten problem stosując konstrukty cDNA kodujący wydłużony odcinek C-końcowy receptora. Oddziaływanie pomiędzy receptorami D₁ i D₂ badała poprzez pomiar czasów życia fluorescencji ich konstruktyw zawierających białka fluoryzujące. Stwierdziła, że jakkolwiek stymulacja agonistą receptora D₁ powoduje skrócenie czasu życia fluorescencji donora, to dopiero stymulacja agonistami obu receptorów lub zastosowanie liganda rozpoznającego kompleks D₁D₂ powodowały istotną zmianę wydajności FRET świadczącą o oligomeryzacji receptorów dopaminowych. Stosując przejściową transfekcję komórek HEK 293 plazmidami kodującymi D₁-mEGFP i różnymi formami genetycznymi D₂ zawierającymi sekwencję linker-mCherry Doktorantka wykazała, poprzez pomiar czasów życia fluorescencji tych białek, że mutacja w pozycji 311 receptora D₂ zmniejsza poziom jego konstytutywnej dimeryzacji z receptorem D₁. Ta muteina (S311C) dawała też silniejszą indukcję sygnału wapniowego po stymulacji komórek związkiem SKF 83959. To nieco nieoczekiwany wynik, bowiem mutacja dotyczy zamiany seryny na cysteinę, a więc zastąpienia natywnego aminokwasu aminokwasem dość podobnym; widocznie taka zamiana jest jednak wystarczająca

dla zmiany konformacji białka lub warunkuje nowe oddziaływania receptora czy jego reakcje redoks niemożliwe w przypadku formy natywnej. Obserwacje te są tym bardziej interesujące, że chorzy na schizofrenię będący nosicielami mutacji S311C mają słabsze objawy choroby i wymagają krótszego czasu hospitalizacji.

W ramach realizacji ostatniego zadania badawczego Doktorantka próbowała uzyskać konstrukty łączące sekwencję podjednostki $G_{\alpha q}$ i białka mCherry, by wykorzystać je do badania oddziaływania z receptorami dopaminowymi znakowanymi białkiem mEGFP w komórkach HEK 293. Sporządziła dwa konstrukty, zawierające sekwencję białka mCherry przyłączone do C-końca i w środku sekwencji białka $G_{\alpha q}$. Niestety, żadne z uzyskanych w ten sposób białek nie wykazywało lokalizacji podbłonowej, a pomiary FLIM nie wykazały oddziaływania pomiędzy receptorem D_2 a białkami $G_{\alpha q}$ -mCherry. W tej sytuacji Doktorantka zdecydowała się na stworzenie innego systemu *in vitro*, poprzez ekspresję podjednostek białka G oraz receptora D_1 w systemie bakulowirusowym. Było to bardzo pracochłonne przedsięwzięcie obejmujące przygotowanie pięciu bakulowirusów zawierających cDNA receptora D_1 oraz białek $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha s}$, $G_{\beta 1}$ i $G_{\gamma 2}$, optymalizację produkcji bakulowirusa P3 w komórkach owadzych Sf9 i High Five, dobór parametrów infekcji bakulowirusem i optymalizację produkcji białka D_1 , określenie wiązania związku [3 H]-SCH23390 przez białko receptorowe oraz oczyszczanie receptora D_1 , podjednostki $G_{\alpha q}$ i kompleksu $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha s}$, $G_{\beta 1}$ i $G_{\gamma 2}$ w oparciu o metki histydynowe na końcach podjednostek $G_{\beta 1}$ i $G_{\gamma 2}$.

Zadania badawcze zostały więc zrealizowane; ostatnie z nich oznacza wprawdzie „jedynie” stworzenie warunków dla właściwych badań, jednak zakres badań przeprowadzonych w ramach tego zadania i ich pracochłonność budzi ogromne uznanie.

Zwieńczeniem rozprawy jest obszerna, znakomicie napisana 24-stronicowa *Dyskusja*. Zawiera ona nieco powtórzeń z opisu wyników (bez których byłaby jednak mniej zrozumiała), budzi uznanie wnikliwością i szczegółowością analizy, dostrzeganiem ograniczeń stosowanych technik i znajomością piśmiennictwa przedmiotu. Dyskusja wystawia znakomite świadectwo dojrzałości naukowej Autorki rozprawy.

Krótki podrozdział poświęcony perspektywom dalszych badań syntetycznie przedstawia zarówno te perspektywy, jak i ich ograniczenia.

Pracę oceniam szczególnie wysoko pod względem metodycznym. Doktorantka zwraca uwagę i dyskutuje problemy napotkane w pracy doświadczalnej i często pomijane i znajduje ich rozwiązanie; przykładami mogą być: odrywanie się komórek od podłoża przy pomiarach poziomu wapnia na płytkach czy trudności w solubilizacji rekombinowanego białka D1-StrepTag przed elektroforezą, rozwiązane poprzez zimną denaturację dodecylosiarczanem litu. Wysoko oceniam dystans do własnych wyników, gdy trudności metodyczne mogą rzutować na ich wiarygodność i ostrożność w wyciąganiu wniosków w takich przypadkach.

Z obowiązku recenzenta mam kilka marginalnych uwag do treści rozprawy.

Zastosowana do detekcji jonów wapnia sonda fluorescencyjna (Fluo-4) jest sondą nieracjometryczną, co stwarza nieco trudności eksperymentalnych, tym bardziej, że sonda jest substratem m. in. dla transportera MRP1 (ABCC1). Warto byłoby więc uzasadnić wybór tej

właśnie sondy (choć *Dyskusja* zawiera obszerne omówienie jej wad i zalet, s. 97), a nie sondy racjometrycznej.

Doktorantka zastosowała nie w pełni konsekwentną numerację poszczególnych części rozprawy, ograniczając przypisywanie numerów do podrozdziałów pozostawiając nienumerowane podpodrozdziały, jednak przełamana tę zasadę przy opisie wyników (rozdział 5); można zastanawiać się, czy nie należałoby tak zrobić w pozostałych częściach pracy.

Niewłaściwym terminem jest „prędkość” w odniesieniu do warunków wirowania, (s. 59 i inne), w sytuacji, gdy chodzi o przyspieszenie dośrodkowe, wyrażone w jednostkach *g*. Termin „pelet” czy „peleta” (s. 59) jest raczej żargonowy; zamiast „homogenizatu” (s. 54) lepiej byłoby użyć słowa :”homogenat”. Ogólnie praca jest bardzo dobrze zredagowana, literówki są rzadkie; w kilku miejscach (s. 31, wiersz drugi od dołu i s. 70/71) wycięte zostały części zdań. W pełni zachowana jest konsekwencja w sposobie cytowania obszernego piśmiennictwa.

W posumowaniu, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr Ewy Błasiak, ze względu na ważki i aktualny problem podjęty w badaniach, bogatą i zaawansowaną metodykę, nakład pracy, pomysłowość w pokonywaniu trudności metodycznych, staranną edycję i dojrzałość naukową Doktorantki.

Uważam, że rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Ewy Błasiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Sądzę też, że ze względu na wymienione walory rozprawa zasługuje na wyróżnienie.

Łódź, dnia 20 lipca 2013


Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz