Prof. dr hab. Aleksander F. Sikorski
Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Wrocławskiego

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. „Przekazywanie sygnałów w układzie dopaminoergicznym – lokalizacja i oddziaływanie receptora dopaminowego D1 z białkami G"
autorstwa mgr Pawła Mystka

Typowa komórka eukariotyczna wytwarza ponad 100 różnego rodzaju receptorów. Do najliczniejszych należą tzw. receptory związane z białkami G (GPCR). Są one typowymi, siedmiohelikalnymi białkami integralnymi błony. Uczestniczą one w wykrywaniu i odpowiedzi na różne typy sygnałów, jak np. neurotransmitery, hormony zaangażowane w metabolizmie glikogenu i trójglicerydów a nawet fotony. Niezależnie od tego, że badania struktury i funkcji tych receptorów trwają już od bardzo dawna, wiele pytań dotyczących ich organizacji w błonie i wynikających z niej aspektów funkcjonalnych pozostaje bez odpowiedzi, zatem podjęte w pracy badania są, zdaniem recenzenta, w pełni uzasadnione.
Autor przedstawionej do oceny dysertacji podjął się realizacji projektu badawczego mającego na celu odpowiedź na pytanie, czy receptor D1 dopaminy już przed stymulacją tworzy „prekompleks" z różnymi podjednostkami α białka G. Przypuszczając, że tworzenie „prekompleksu" jest raczej nieprawdopodobne a odległość pomiędzy receptorem D1 a Gαs lub Gαi3 jest niewielka, 9–10 nm, postanowił zweryfikować hipotezę, iż przyczyną braku homogenności lateralnej jest występowanie receptora i podjednostek białek G w domenach błonowych (tratwach lipidowych/błonowych).
Najwięcej uwagi poświęcił Autor lokalizacji receptora D1 oraz podjednostek Gαs lub Gαi3 i jej zmianom oraz oddziaływaniom poszczególnych elementów w różnych stadiach stymulacji układu.
W szczególności interesujące okazały się doświadczenia z zastosowaniem obniżania poziomu cholesterolu lub sfingolipidów. Celem tych eksperymentów było określenie różnic w lokalizacji błonowej heterotrimerycznych białek G i receptora D1 dopaminy.
System doświadczalny.
Podstawowym podejściem doświadczalnym, które zastosował Autor były obserwacje z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej oraz techniki FRAP (pomiar odzysku fluorescencji po fotoblaknięciu) komórek HEK293 przejściowo transfekowanych wektorami plazmidowymi kodującymi fluorescencyjne postaci receptora D1 (mCherry) oraz podjednostek Gαs (mCitrine) lub Gαi3 (mGFP) Gαi2 (mGFP) i Gαi1(mGFP). Zastosował także plazmidy kodujące wariant GαsIEK (mCitrine) oraz nieznakowane podjednostki dimeru β1γ2 lub γ9. Powyższe konstrukty były dziełem Autora. Autor dokonywał manipulacji zawartością cholesterolu traktując komórki w hodowli β-metylocyklodekstryną, a zawartością sfingolipidów fumonizyną B1, inhibitorem syntazy dihydroceramidowej.
Rezultaty recenzowanego projektu obejmują:

1. Lokalizację badanych białek w komórce

Autor wykazał głównie błonową lokalizację i współlokalizację receptora D1 oraz podjednostek α białka G w błonie pod wpływem stymulacji agonistą oraz szybką internalizację obu białek do pęcherzyków, które jak Autor pisze (str. 58) zidentyfikowano jako wczesne endosomy, niestety nie dokumentując tego faktu. O ile podjednostka Gαs

współllokalizowała z receptorem w pęcherzykach, to Gαi3 nie wykazała wspólnej lokalizacji z receptorem w małych pęcherzykach po stymulacji. Trochę brakuje mi informacji dotyczących optymalizacji warunków transfekcji, gdyż na zaprezentowanych obrazach nie widać skutków nadprodukcji rekombinowanych białek, co jest częstą przyczyną trudności w przeprowadzaniu takich doświadczeń jak i przyczyną ich krytyki. Brakuje mi też dowodu na produkcję nieznakowanych fluorescencyjnie białek, tzn. dimerów βγ. Można też było podjąć próbę ilościowych analiz lokalizacji poszczególnych fluoroforów, co mogłoby się przyczynić do większej czytelności rezultatów. Wśród sugestii mogłaby się znaleźć koimmunoprecypitacja, jako metoda weryfikująca poszczególne interakcje.

2. Badania dyfuzji lateralnej znakowanych fluorescencyjnie białek

Autor dokonał wyznaczenia pozornych współczynników dyfuzji lateralnej dla receptora D1 oraz poszczególnych elementów systemu a także kompleksów częściowych (D1-podjednostka Gα) jak i pełnych (D1-podjednostka Gα-dimer βγ). Analizował też zmiany tych współczynników po potraktowaniu komórek analogiem GTP. Tu uwagę zwraca niewielka zmiana współczynnika dyfuzji D1 Gαi3 a także podobieństwo pozornych współczynników dyfuzji Gαs i jej kompleksów z receptorem i dimerem βγ. Natomiast, w przypadku Gαs-D1, istotnej zmianie pozornego współczynnika dyfuzji układu pod wpływem agonisty A68930 towarzyszyła istotna statystycznie zmiana udziału frakcji mobilnej. Tu mam pytanie: na stronie 66 Autor pisze: „....A68930...Ligand ten jest pełnym agonistą receptora dopaminowego D1..", podczas gdy na str. 58: „Podobne rezultaty zaobserwowano po stymulacji układu częściowym agonistą A69930 (Rysunek 5.5)." Który z opisów zatem, lepiej charakteryzuje ten związek? W dalszym ciągu tej serii badań doktorant poddał analizie wpływ dimerów βγ i zaobserwował, że β1γ2 powoduje znaczący wzrost współczynnika dyfuzji lateralnej większości podjednostek Gα (za wyjątkiem Gαi1), natomiast dimer β1γ9 powodował wzrost ruchliwości lateralnej wszystkich typów Gα w porównaniu do wolnych podjednostek.

Interesującą obserwacją jest fakt, że mutant GαsIEK, który charakteryzuje się trzema podstawieniami reszt w miejscu wiązania dimeru Gβγ w dalszym ciągu tworzy kompleks, co potwierdzono w analizach „pull-down". Jednakże doświadczenie „pull-down" zdaniem recenzenta nie może stanowić dowodu w dyskutowanej kwestii, gdyż ma charakter tylko jakościowy, nie wskazujący w żadnym stopniu różnic powinowactwa. Być może wynik mógłby okazać się bardziej przekonujący, gdyby został dokładniej i jaśniej opisany. Co stanowiło kontrolę negatywną?

3. Badania wpływu cholesterolu i sfingolipidów na lokalizację i ruchliwość lateralną receptora D1 oraz badanych podjednostek Gα w błonie komórek HEK293.

Zastosowanie inhibitora syntezy sfingolipidów wg. Autora nie wykazało istotnych zmian lokalizacji badanych białek. Jednak uważna obserwacja Rys. 5.11 B pozwala zauważyć, że pod wpływem podjednostek Gβ1γ2 następuje całkowita separacja receptora i podjednostki Gαs. Po redukcji zawartości sfingolipidów obserwował wzrost ruchliwości Gαs w obecności receptora D1 i dimeru Gβγ i brak zmian w ruchliwości Gαi3. Zmiana zawartości cholesterolu owocuje również odwracalnym obniżeniem ruchliwości lateralnej receptora D1, Gαs oraz Gαi3. Zabrakło tu komentarza odnośnie zmian lokalizacji bądź ich braku pod wpływem zwiększenia zawartości cholesterolu w błonie.

Dyskusja i wnioski

Bardzo obszerną, może trochę zbyt obszerną, częścią dysertacji jest rozdział „Dyskusja". Autor na ponad 20 stronach szczegółowo analizuje uzyskane rezultaty na tle literatury przedmiotu, w tym prac, których sam jest współautorem. Jak się wydaje, jednym z głównych osiągnięć tej pracy jest wykluczenie możliwości tworzenia kompleksu receptora D1 z podjednostka Gαs w stanie spoczynkowym (prekompleks). Istotne, jak się wydaje, choć nie

podkreślone przez umieszczenie w podrozdziale „Wnioski końcowe", jest wykazanie zmian ruchliwości lateralnej po aktywacji przez agonistę.
Autor stwierdza m.in., że zmierzone przez Niego pozorne współczynniki dyfuzji lateralnej podjednostek Gαs i Gαi okazały się znacząco różne, co wskazuje na ich zróżnicowaną dystrybucję w płaszczyźnie lateralnej błony. Sugeruje mianowicie preferencyjną lokalizację białek Gαs w mniej płynnych domenach błony (tratwy lub kaweole), podczas gdy Gαi preferują bardziej płynne rejony błony. Nie wyjaśnione wg. Autora pozostają znaczące różnice w ruchliwości lateralnej pomiędzy badanymi białkami Gαi.
W wyniku dyskusji lokalizacji białek Gαs oraz Gαi w błonie Autor zaproponował model ich oddziaływania z błoną. Sugeruje mianowicie, że miejsca oddziaływania stanowią dwa punkty: dla Gαs są to N-końcowa helisa bogata w posttranslacyjne modyfikacje lipidowe oraz niekompletna domena CBM (domena wiążąca kaweolinę), natomiast miejsce wiązania z błoną białka Gαi stanowi domena CBM.
W dyskusji powyższego modelu nie zauważyłem potencjalnej roli miejsc wiązania cholesterolu (CRAC lub CARC), które mogą mieć znaczenie w wiązaniu powyższych białek z błoną, szczególnie białka Gαi. Jest natomiast uwaga na str. 102 (koniec podr. 6.3 dotyczącego receptora D1), sugerująca, że żaden z powyższych motywów nie może oddziaływać z błonowym cholesterolem ze względu na lokalizację w cząsteczce białka.
Kolejnym zagadnieniem stanowiącym przedmiot dość szczegółowej dyskusji jest wpływ redukcji zawartości cholesterolu lub sfingolipidów w błonie na ruchliwość/dyfuzję lateralną receptora D1 dopaminy. Autor podsumowując dane z pomiarów FRAP (ta praca) oraz FLIM-FRET (opublikowana praca zespołu) stwierdza, że uzyskane dane nie zaprzeczają wcześniejszym danym sugerującym oligomeryzację receptorów po redukcji zawartości cholesterolu w błonie. Chyba trochę szkoda, że Autor nie wziął pod uwagę znacznego zmniejszenia frakcji lo jako czynnika odpowiedzialnego za zmniejszenie pozornego współczynnika dyfuzji lateralnej i odległości pomiędzy cząsteczkami receptora. Dyskusja skutków redukcji zawartości sfingolipidów w błonie zaczyna się od stwierdzenia, że zmniejszenie to nie spowodowało znaczących zmian w dyfuzji lateralnej receptora ale wywołało podobny wzrost wydajności FRET, co zapewne przemawia za znaczącym zmniejszeniem odległości pomiędzy cząsteczkami receptora. Jeśli dobrze odczytuję dane FRAP, to był to wzrost z 0.08 do 0.093 (czyli 0.013), podczas gdy w przypadku obniżenia zawartości cholesterolu spadek o 0.03 (dwukrotnie większy) zakwalifikowany został jako znaczący (str. 97). Czy w obu przypadkach nie należało by zastosować kwalifikacji statystycznej? Tę część dyskusji podsumował Autor stwierdzeniem, iż sfingolipidy i cholesterol, ze względu na występowanie motywów wiążących cholesterol lub sfingolipidy może mieć wpływ na relokację receptora do domen błonowych, choć nie jest to pewne.
Analiza wpływu dimerów Gβγ wykazała, że pełni on ważną rolę determinując lokalizację trimeru białek G w błonie, a właściwie w mniej uporządkowanych rejonach błony. Zasadnicze znaczenia mają tu wg, Autora, kotwice lipidowe podjednostki Gγ.
Finalnym wnioskiem Autora jest sugestia, że „organizacja białek zaangażowanych w początkowe etapy transdukcji sygnału w swoiste platformy sygnalizacyjne stanowi interesującą alternatywę dla proponowanych dotychczas wykluczających się teorii".

Uwagi ogólne
Ważną częścią rozprawy jest rozdział „Wstęp", który poświęcony został receptorom związanym z białkami G (GPCR), szczególnie receptorom dopaminy oraz ich lokalizacji w błonie, a szczególnie w domenach błonowych. Rozdział ten został bardzo dobrze napisany (może za wyjątkiem tytułów podrozdziałów, np. „błona komórkowa") i może zdaniem recenzenta stanowić artykuł przeglądowy, np. w Postępach Biochemii).

Oprócz powyższych uwag, które powinny stać się przedmiotem dyskusji zauważyłem bardzo niewiele usterek technicznych, o których z racji wykonywanego obowiązku recenzenta wspominam:

1. Brak odniesienia do pozycji lit.: Rogasevskaia and Coorssen, 2006,
2. Żargonowe przeniesienia z angielskiego, np. linkery (łączniki), ale jest ich jak widać, niewiele.

Wniosek końcowy

Podsumowując, uzyskane przez Autora rozprawy dane doświadczalne stanowią zdaniem recenzenta poważny wkład w tę dziedzinę wiedzy. Uważam rozprawę Pana mgr Pawła Mystka za oryginalne dzieło naukowe. Znaczna część przedstawionych w tej rozprawie rezultatów została już opublikowana w dwóch poważnych artykułach Biochim. Biophys. Acta Biomembranes. Moim zdaniem recenzowana rozprawa z powodzeniem spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Zatem wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii o dopuszczenie mgr Pawła Mystka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę fakt opublikowania większości danych zawartych w rozprawie, wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Wrocław, 21 lutego 2018