



Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego PAN

02-106 Warszawa, ul. A. Pawińskiego 5

Warszawa, 17.08.2017 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Satały
pt.: „Allosteryczna modulacja receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i 5-HT₇ przez jony cynku”

Jednym z ważniejszych współczesnych problemów badawczych w medycynie jest zrozumienie podstaw chemicznych procesów zachodzących w organizmach żywych. Do tych zagadnień należy poznanie działania poszczególnych receptorów i ich ligandów, zarówno orto- i allosterycznych. Bowiern wiedza o rodzaju oddziaływań, o wpływie poszczególnych czynników na aktywację i modulację receptorów umożliwia następnie racjonalne projektowanie leków. Grupa prof. dr hab. Andrzeja Bojarskiego z Zakładu Chemii Leków Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie należy do światowej czołówki ośrodków badawczych, które się tymi zagadnieniami zajmują i ma na tym polu duże osiągnięcia.

Recenzowana praca doktorska dotyczy zagadnień związanych z oddziaływaniami allosterycznymi, które wykazują na ogół znacznie wyższą selektywność działania receptorowego. Może to mieć szczególne znaczenie w przypadku receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR) z powodu potencjalnego wykorzystania ich w terapii. Obiektem badawczym doktoranta były jony cynku, które mogą m.in. modulować selektywność ligandów serotoninowych, a przez to mieć wpływ na procesy zaburzeń w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Cynk wchodzący w skład wielu białek odgrywa dużą rolę w różnorodnych procesach komórkowych, a zaburzenia w homeostazie cynku stanowią przyczynę wielu chorób, w tym neurologicznych. Jednak pomimo dobrze udokumentowanych przeciwdepresyjnych własności cynku mechanizmy leżące u podstaw jego działania nie są wyjaśnione.

Podstawą do podjęcia przez doktoranta szczegółowych badań nad oddziaływaniem jonów cynku z receptorami serotoninowymi były:

- doniesienia w literaturze o negatywnej modulacji *in vitro* powinowactwa selektywnych ligandów receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}: antagonisty ([3H]WAY-100635) i agonisty ([3H]8-OH-DPAT).
- wyniki badań *in vivo* w behawioralnych modelach depresji prowadzone w Instytucie Farmakologii PAN, które wskazywały na odwrotny kierunek wpływu jonów cynku na agonistę ([3H]WAY-100635).

Doktorant włączył się w prace nad rozwiązaniem tego problemu definiując cele swojej pracy doktorskiej jako:

1. wyjaśnienie mechanizmu bezpośredniego oddziaływania jonów cynku z receptorami serotoninowymi 5-HT_{1A}
2. sprawdzenie czy jony cynku mogą allosterycznie modulować receptory serotoninowe 5-HT₇

Praca doktorska mgr Grzegorza Satały ma układ klasyczny dla prac doświadczalnych, składa się z rozdziału omawiającego podstawy teoretyczne badań (40 stron), celu pracy (2 strony), opisu wyników badań (29 stron) oraz dyskusji wyników (6 stron). Praca zawiera też wykaz stosowanych materiałów i opis stosowanych metod, oraz wykaz skrótów i spis literatury cytowanej (227 pozycje). Zamieszczone jest również streszczenie w języku polskim i angielskim.

Do pracy dołączone są 2 publikacje (*Molecular Neurobiology* 2016, 2017) z wyników uzyskanych w pracy doktorskiej, w których doktorant jest pierwszym autorem.

W części wstępnej swojej rozprawy doktorant przedstawił stan obecnej wiedzy dotyczący allosterii, rodzajów modulacji allosterycznej (PAM, NAM - positive i negative allosteric modulators), oraz allosterię w rodzinie receptorów sprzężonych z białkami G. Następny rozdział dotyczył omówienia modeli oddziaływań ligand-receptor, który doskonale pokazuje, że różnorodność efektów modulacji allosterycznej stanowi duże wyzwania zarówno w eksperymentalnej identyfikacji ligandów allosterycznych, jak i w ilościowym ujęciu obserwowanych zmian. Kolejny rozdział części wstępnej dotyczył omówienia roli cynku i jego roli w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Część literaturową kończył rozdział omawiający receptory serotoninowe i ich rolę w OUN, w szczególności rolę receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ w zaburzeniach depresyjnych i regulacji ich funkcji przez jony cynku.

Przedstawione wprowadzenie literaturowe jest bardzo dobrze i treściwie napisane. W szczególności na uznanie zasługuje opis modeli oddziaływań ligand-receptor, który świadczy o ogromnej wiedzy i doświadczeniu doktoranta w zakresie badań receptorowych.

Przedmiotem pracy doktorskiej mgr Grzegorza Satały była charakterystyka oddziaływań jonów cynku z receptorami serotoninowymi 5-HT_{1A} i 5-HT₇ pod względem ilościowej oceny obserwowanych zmian w aktywności receptorów w wyniku modulacji allosterycznej. Ponieważ wszystkie wyniki uzyskane przez doktoranta zostały już opublikowane, dlatego nie będą ich szczegółowo omawiała, a przedstawię tylko krótkie podsumowanie.

Badania związane z receptorami serotoninowymi 5-HT_{1A} obejmowały eksperymenty saturacji, kompetycji, testy kinetyczne asocjacji i dysocjacji przeprowadzone dla specyficznego agonisty, liganda ([³H]8-OH-DPAT) w obecności jonów cynku, z wykorzystaniem komórek linii HEK293, ze stabilną ekspresją receptorów 5-HT_{1A}. Na podstawie wyników swoich badań mgr Satała wykazał, że mechanizm działania jonów cynku na receptory 5-HT_{1A} w obecności agonisty zależy od stężenia, w stęż. sub-mikromolarnych (10 μM) jony cynku wzmacniają wiązanie agonisty do receptorów 5-HT_{1A}, a w większym stęż. (500 μM) obniżają.

Podobne badania przeprowadzone dla receptorów serotoninowych 5-HT₇ wskazały na negatywną modulację allosteryczną jonów cynku zarówno wobec agonistów, jak i antagonistów.

Podsumowując, rezultaty uzyskane przez mgr Satałę wykazują zbieżność z agonistyczno/antagonistycznym profilem działania cynku w badaniach *in vivo* i wyjaśniają niejasności dotyczące danych literaturowych o modulacji receptorów serotoninowych przez jony cynku.

Doktorant może mieć naprawdę dużą satysfakcję z przeprowadzonych badań i osiągniętych wyników. Wynikiem jego badań jest szczegółowa charakterystyka oddziaływań jonów cynku z receptorami 5-HT_{1A} i 5-HT₇ i wykazanie istnienia allosterycznych miejsc wiążących cynk w obu typach receptorów. Poszerza to w dużym stopniu wiedzę na temat roli jonów cynku w OUN, jak również mechanizmów modulacji allosterycznej w receptorach serotoninowych.

Pracę doktorską mgr Grzegorza Satały przeczytałam z bardzo dużym zainteresowaniem. Praca jest napisana bardzo dobrą polszczyzną, zwięźle, niezwykle logicznie i przejrzysto. Muszę podkreślić również niezwykle starannie wykonaną korektę pracy (nie udało mi się znaleźć żadnych literówek!).

I tylko z obowiązku recenzenta chciałabym zadać pytanie, dlaczego nie wszystkie używane skróty znalazły się w spisie np. SSRI, FST?

Podsumowując stwierdzam, że zakres pracy doktorskiej mgr Grzegorza Satały był niezwykle szeroki. Wszystkie przeprowadzone przez niego badania wymagały wszechstronnego przygotowania, zarówno teoretycznego, jak i eksperymentalnego i ze wszystkich etapów pracy doktorant wywiązał się znakomicie!

Również bardzo wysoko oceniam sposób prezentacji wyników i sposób prowadzenia dyskusji przy ich omawianiu. Wszystkie te umiejętności klasyfikują już mgr Satałę jako wszechstronnego badacza, świetnie przygotowanego do podejmowania kolejnych wyzwań naukowych.

Chciałabym również podkreślić, że mgr Satała jest pierwszym autorem 2 publikacji w *Molecular Neurobiology*, bardzo dobrym czasopiśmie z listy filadelfijskiej, w których przedstawione są wyniki jego badań z zakresu pracy doktorskiej. Oprócz tego doktorant jest współautorem 42 innych publikacji i 76 wystąpień konferencyjnych, a na swoje badania otrzymał w 2013 r. z NCN grant Preludium.

Wszystkie powyżej przedstawione dane świadczą o posiadaniu przez mgra Satałę wielkiego doświadczenia w zakresie badań farmakologicznych, w szczególności badań receptorowych, jak również o osiągnięciu już przez niego ogromnego dorobku naukowego.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona rozprawa mgr Grzegorza Satały zatytułowana „Allosteryczna modulacja receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i 5-HT₇ przez jony cynku” spełnia wszelkie wymagania stawiane ustawą o stopniach i tytule naukowym i zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Grzegorza Satały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę niezwykle aktualną tematykę pracy, staranność przeprowadzonych badań, korzystanie z wielu nowoczesnych technik związanych z badaniami receptorowymi, perfekcyjny opis przeprowadzonych badań, bardzo dojrzałą dyskusję otrzymanych wyników i opublikowanie wyników zawartych w rozprawie doktorskiej zwracam się do Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu o wyróżnienie tej pracy.

Wyniki badań mgr Grzegorza Satały zostały opublikowane w 2 pracach w czasopiśmie z listy filadelfijskiej *Molecular Neurobiology* (IF=5,46), w których doktorant jest pierwszym autorem. Odbitki tych prac zostały zamieszczone w załączniku pracy doktorskiej.

J. Piścula