



Kraków 20.12.2022

Prof. dr hab. n. med. Irena Nalepa
Zakład Biochemii Mózgu
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
e-mail: [nfnalepa@cyf-kr.edu.pl](mailto:nnalepa@cyf-kr.edu.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Beaty Rysiewicz
pt. „Znaczenie N końcowego fragmentu podjednostki G α i3
w procesie lokalizacji błonowej trimerycznego białka G”**

Praca doktorska Pani mgr Beaty Rysiewicz została wykonana w Zakładzie Biochemii Fizycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Jej promotorem jest profesor dr hab. Marta Dziedzicka-Wasylewska a promotorem pomocniczym dr hab. Agnieszka Polit, profesor UJ

Przedmiot rozprawy i uzasadnienie podjęcia tematu

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opisuje wyniki badań, których bezpośrednim celem było zbadanie znaczenia wybranych czynników takich jak lipidacja, dimer G $\beta\gamma$ oraz region polizasadowy, w procesie asocjacji z błoną komórkową białka G α i3, a także wykonanie analogicznej analizy roli tych czynników dla asocjacji z błoną komórkową białka G α s. G α i3 i G α s są podjednostkami białek należących do rodziny heterotrimerycznych białek G, które są głównymi partnerami receptorów błonowych tworzących rodzinę GPCR (*G-protein-coupled receptor*). Kierowany przez prof. Martę Dziedzicką-Wasylewską Zespół Zakładu Biochemii Fizycznej, ma znaczące doświadczenie metodyczne w biochemicznych i biofizycznych analizach funkcji GPCR i duże osiągnięcia publikacyjne w tej tematyce, a więc omawiana praca doktorska jest osadzona w jednym z głównych nurtów badawczych Zakładu. GPCR reprezentują największą rodzinę białek spośród białek kodowanych przez ludzki genom. Zlokalizowane w błonie komórkowej odbierają i po aktywacji przetwarzają sygnały zewnętrzne, uruchamiając następnie wewnątrzkomórkowe procesy dzięki którym wywoływane są różnego typu fizjologiczne efekty. Za pośrednictwem GPCR działają między innymi różnego rodzaju neuroprzekaźniki



aminergiczne i aminokwasowe, hormony, chemokiny, odoranty jak również mogą je stymulować czynniki fizykalne jak fotony światła. W ten sposób GPCR są także wplątane w wiele schorzeń, między innymi schorzenia neuropsychiatryczne, neurodegeneracyjne czy kardiologiczne. A co za tym idzie, farmakoterapia tych schorzeń jest w dużym stopniu ukierunkowana na oddziaływanie leków bezpośrednio na GPCR bądź wykorzystywanie GPCR w sposób pośredni, poprzez spowodowaną przez lek modulację sygnału docierającego do receptora. Etapem krytycznym dla przekazania sygnału od receptora błonowego do wewnątrzkomórkowych enzymów efektorowych jest asocjacja białka G z błoną komórkową w której znajdują się receptory i ten proces był szczególnie analizowany w toku ocenianej rozprawy doktorskiej. Od rodzaju podjednostek α białka G zależy rodzaj uruchamianego sygnału wewnątrzkomórkowego – czy będzie to stymulacja lub hamowanie cyklicznej adenylowej, a w konsekwencji stymulacja lub hamowanie generacji cyklicznego AMP, albo czy po aktywacji fosfolipazy C zapoczątkowana będzie hydroliza błonowych fosfatydyloinozytoli. W ten sposób nasuwają się ważne pytania o mechanizmy oddziaływania pomiędzy partnerami białko G – GPCR oraz o czynniki wpływające na modulację procesu asocjacji białka G. Chociaż te procesy były i są nadal intensywnie badane jednak jeszcze wiele pytań czeka na odpowiedź. Zatem wybór tematu rozprawy jest dobrze uzasadniony, a wyniki badań zawarte w recenzowanej pracy dostarczają nowych informacji i mogą znaleźć zastosowanie w strategiach opracowywania nowych leków.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 110 stron ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozprawę rozpoczynają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz liczący 17 stron Wstęp, zawierający 4 główne podrozdziały i szereg mniejszych podrozdziałów, które wprowadzają czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. Po Wstępie, jako osobny rozdział, Doktorantka zamieściła założenia i cel główny oraz cele szczegółowe rozprawy, a następnie opis materiałów i metod. Rozdział ten podzielony na 2 główne części, dotyczące osobno materiałów i osobno opisujące metody, zawiera 11 mniejszych podrozdziałów i obejmuje 21 stron. Wyniki, liczące 38 stron podzielone zostały na 9 podrozdziałów. Następująca po tym rozdziale Dyskusja (14 stron), podzielona na 4 mniejsze podrozdziały omawia najważniejsze problemy naukowe rozprawy. Praca doktorska mgr Beaty Rysiewicz kończy się syntetycznymi wnioskami, rozdziałem obejmującym bibliografię oraz aneksami zawierającymi mapy plazmidów, przykładowe obrazy mikroskopowe dla analizowanych



układów $G\alpha_i3$ i $G\alpha_s$, zestawienia szczegółów analizy $G\alpha_i3$ przy pomocy narzędzia ProtParam (Expasy) oraz tabeli pokazującej wartości krytyczne statystyki T wykorzystywanych w teście Grubbsa na punkty odstające. Na podkreślenie zasługuje fakt dużej liczebności pozycji piśmiennictwa cytowanego w rozprawie – 248 prac, w przeważającej części pochodzących z okresu ostatniego dziesięciolecia i adekwatnie cytowanego.

Ocena merytoryczna

Wstęp ocenianej rozprawy jest napisany w sposób przystępny i interesujący, równocześnie omówione w nim zostały wszystkie zagadnienia konieczne dla zrozumienia zarówno celów rozprawy jak i uzyskanych wyników. Pierwszy podrozdział zatytułowany „*Heterotrimeryczne białka G*” opisuje budowę i funkcję poszczególnych podjednostek białek G: α , β i γ , wchodzących w skład trimery. W Tabeli 1 przedstawiono klasyfikację funkcjonalną białek G dokonaną w oparciu o własności podjednostki α , wyróżniając 4 klasy trimerycznych białek G: $G\alpha_i/o$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{12/13}$ i $G\alpha_q/11$ oraz wskazano rodzaj lipidowej modyfikacji potranslacyjnej jakiej mogą podlegać $G\alpha$ poszczególnych klas trimerycznych białek G. W sposób klarowny omówione zostały funkcje dwóch domen $G\alpha$, GTP-azowej i helikalnej oraz trzy regiony $G\alpha$, które są postulowane jako zaangażowane w interakcje z receptorem. W Tabeli 2 zestawiono podjednostki $G\beta$ i $G\gamma$ produkowane w komórkach ludzkich. Interakcja GPCR z dimerem $G\beta\gamma$ odgrywa rolę w zapewnieniu styku $G\alpha$ z receptorem. Dimer $G\beta\gamma$ pełni też inne funkcje, na przykład związane z oddziaływaniem na kanały wapniowe bramkowane napięciem w wyniku czego dochodzi do hamowania uwalniania neurotransmiterów. W kolejnych częściach *Wstępu* Doktorantka scharakteryzowała modyfikacje lipidowe podjednostek $G\alpha$ i $G\beta\gamma$, odpowiednio N-mirystylację i S-palmitylację dla $G\alpha_i$ oraz prenylację w przypadku $G\beta\gamma$. Następnie przeszła do omówienia receptorów sprzężonych z białkami G, ze szczególnym uwzględnieniem receptorów dopaminowych, wśród których znajdują się przedstawiciele powiązani z białkiem G_i i białkiem G_s . Dwa kolejne podrozdziały *Wstępu* zostały poświęcone omówieniu budowy błony komórkowej i obecnym koncepcjom opisującym środowisko błony komórkowej oraz oddziaływaniu białka z dwuwarstwą lipidową. *Wstęp* zamyka podrozdział opisujący metody badania oddziaływania białek błonowych, w tym metody mikroskopowe – mikroskopii elektronowej, które zrewolucjonizowały obserwację białek błonowych w żywej komórce. Jednocześnie Autorka uzmysławia czytelnikowi jak wielkim



wyzwaniem są badania białek błonowych ze względu na ich niestabilność poza natywnym środowiskiem. Rozdział *Wstępu* został także zilustrowany czterema rysunkami, obrazującymi kolejno strukturę czwartorzędową trimerycznego białka G, kompleks białko G – receptor GPCR (D2), drzewo filogenetyczne receptorów GPCR z podziałem na klasy i drzewo filogenetyczne receptorów dopaminowych. W mojej opinii lektura tego rozdziału bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia opisywane w dalszych częściach rozprawy doktorskiej, zawiera wszystkie informacje istotne dla zrozumienia pracy i świadczy o rozległej wiedzy Autorki. Mam tutaj tylko drobne uwagi, które z obowiązku recenzenta przedstawiam:

1. str. 1, linia 1 jest „*mulit merem*” zamiast *multimetrem*
2. używanie określenia „kompartymet” (np. str. 12, linia 6 od góry; i str. 15 i 16), a w innych miejscach „kompartment”, wymaga ujednolicenia
3. na str. 5, konformacje przełącznika I i przełącznika II i ich znaczenie w kontekście aktywności podjednostki $G\alpha$ zasługują, moim zdaniem, na nieco bardziej szczegółowe omówienie.

Cele rozprawy zostały jasno sprecyzowane i zamieszczone jako osobny rozdział. Dla realizacji głównego celu, którym było zbadanie znaczenia lipidacji, dimeru $G\beta\gamma$ oraz regionu polizasadowego w procesie asocjacji z błoną komórkową białka $G\alpha i$ i dokonanie analizy porównawczej tych procesów dla $G\alpha s$, sformułowano 5 celów szczegółowych. Badania, których wyniki opisano w rozprawie skupiały się na następujących zadaniach: 1) zbadanie kolokalizacji z błoną komórkową form dzikich oraz mutein białek $G\alpha i3$ i $G\alpha s$ jako monomerów oraz trimerów z $G\beta\gamma$; 2) zbadanie zmian lokalizacji $G\alpha i3$ w błonie komórkowej wywołanych przez utratę części ładunku w regionie polizasadowym; 3) analiza funkcjonalności różnych układów trimerów formy dzikiej białka $G\alpha i3$, mutein $G\alpha i3$ pozbawionych palmitylacji lub mirystylacji oraz mutein $G\alpha i3$ z zaburzonym dodatnim ładunkiem w regionie N końcowej helisy; 4) analiza oddziaływania białka $G\alpha i3$ pozbawionego obu kotwic lipidowych z różnymi klasami lipidów *in vitro* w układzie modelowym; 5) analiza oddziaływania dzikich lub zmutowanych białek $G\alpha i3$ oraz $G\alpha s$ z liposomami *in silico* z zastosowaniem metody dokowania.

Materiały i Metody – stanowią obszerny rozdział zawierający opisy wszystkich zastosowanych metod. Cele rozprawy doktorskiej mgr Beata Rysiewicz zrealizowała przeprowadzając szereg dobrze zaplanowanych i konsekwentnie wykonanych doświadczeń, w których stosowała liczne techniki współczesnej biologii komórkowej i molekularnej,



biochemii i biofizyki. Wykorzystywane metody to, między innymi, hodowle komórkowe, hodowle bakteryjne, mutageneza, klonowanie, oczyszczanie białka Gαi3, obserwacje i analizy mikroskopowe różnego typu, w tym FLIM-FRET, pomiar cAMP metodą ELISA, analiza ekspresji białek, immunodetekcja, western blotting, analizy bioinformatyczne i inne. Uzyskane dane poddano wnikliwym analizom statystycznym. Rozdział został napisany w sposób systematyczny i wystarczająco dokładny, aby wykazać bardzo dobre opanowanie przez Autorkę bogatego warsztatu metodycznego. W dwudziestu tabelach zestawione zostały używane odczynniki, bufony, pożywki, plazmidy, startery, opisane parametry reakcji PCR, cechy spektralne fluoroforów wykorzystywanych w obserwacji mikroskopowej. Na umieszczonych w tym rozdziale 3 rysunkach pokazano m.in., widma wzbudzenia oraz emisji, przykładową krzywą zaniku fluorescencji. Zastosowane procedury wymagały dużego nakładu pracy ze względu na stopień skomplikowania i czasochłonność. Nie mam krytycznych uwag do tego rozdziału. Recenzowaną pracę oceniam wysoko pod względem metodycznym.

Wyniki są najobszerniejszym rozdziałem rozprawy. Uzyskane wyniki przedstawiono na 31 rysunkach, z których część stanowią zdjęcia elektroforezy DNA produktów reakcji PCR, zdjęcia analiz białek metodą western blot i zdjęcia z mikroskopu konfokalnego oraz wykresy obrazujące poziomy wewnątrzkomórkowego cAMP w różnych analizowanych układach doświadczalnych, mutein Gαi3 i innych. Ryciny cechuje przejrzysta konstrukcja, są prawidłowo i wystarczająco szczegółowo opisane. W rozdziale zamieszczone zostały także 22 tabele, zawierające głównie wyniki analiz statystycznych uzyskanych danych eksperymentalnych: statystyki opisowe współczynnika korelacji Pearsona, statystyki opisowe wartości analizowanych różnymi testami (T-Studenta, Test Grubbsa).

Rozdział **Wyniki** rozpoczyna szczegółowy opis wykonanej mutagenezy – mutacji punktowej, która polegała na substytucji wybranych reszt aminokwasowych na alaninową w białkach fuzyjnych Gαi3-citrine i Gαs-citrine. W celu zniesienia lipidacji wprowadzono resztę alaninową zamiast reszty glicynowej w pozycji 2 łańcucha polipeptydowego lub reszty cysteinowej w pozycji 3. Stosując substytucję kodonów dla reszt aminokwasowych zasadowych na resztę alaninową Autorka przygotowała konstrukty Gαi3 PB1 i Gαi3 PB2, w których został zniesiony dodatni ładunek w dwóch fragmentach N-końcowej helisy podjednostki Gαi3. Przygotowane plazmidy były następnie wykorzystane w mikroskopowych badaniach kolokalizacji oraz FLIM-FRET. Przygotowano wektor plazmidowy pET28a+ zawierający sekwencję białka Gαi3, który był następnie



wykorzystywany przy ekspresji białka $G\alpha i3$ w systemie bakteryjnym. W ten sposób zostały wytworzone „narzędzia molekularne” niezbędne dla realizacji dalszych zaplanowanych badań. W kolejnym etapie przeprowadzono obrazowanie lokalizacji komórkowej zmodyfikowanych białek fuzyjnych – stworzonych mutein. A następnie Autorka dokonała analizy kolokalizacji aby ocenić lokalizację poszczególnych układów trimerów w błonie komórkowej oraz siateczce śródplazmatycznej. W tym przypadku znakowano podjednostkę $G\alpha$ fluoroforem citrine, a siateczkę śródplazmatyczną i błonę komórkową dwoma innymi fluoroforami, odpowiednio RFP i Deep Red. Muteiny wykorzystywane w badaniach zostały także zweryfikowane pod względem funkcji odnoszącej się do ich zdolności do hamowania cyklaz adenylowych, co oceniano poprzez pomiary stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP. Wyniki jakie uzyskała Autorka z pomiaru poziomu cAMP, w komórkach transfekowanych $G\alpha i3$ oraz różnymi układami dimerów $G\beta\gamma$, potwierdziły hipotezę o znaczeniu dimera $G\beta\gamma$ w efektywności aktywacji $G\alpha$ przez receptor D2. Badania wykonane w ostatnich etapach projektu dotyczyły analizy oddziaływania $G\alpha i3$ z lipidami (z wykorzystaniem techniki *dot blot*) oraz obejmowały analizy bioinformatyczne z wykorzystaniem narzędzia HADDOCK i oparte o badanie wiązania – dokowania. Analiza *in silico* oddziaływania białek z fosfolipidami błonowymi wskazała na najsilniejsze oddziaływanie $G\alpha i3$ i $G\alpha s$ z fosfolipidem DOPG o ujemnym ładunku.

Przeprowadzone w ocenianej rozprawie badania dostarczyły wielu interesujących i nowych informacji o charakterze odkryć naukowych. Uzyskane wyniki badań pozwoliły pani mgr Beacie Rysiewicz na stwierdzenie, że dla białka $G\alpha i3$ lipidacja, zarówno mirystylacja jak i palmitylacja, mają nadrzędne znaczenie w utrzymaniu lokalizacji błonowej, i że obecność dimera $G\beta\gamma$ nie rekompensuje braku lipidacji. Natomiast w przypadku białka $G\alpha s$ utrata jednej z lipidacji upośledza asocjację z błoną, ale w tym przypadku efekt może być rekompensowany oddziaływaniem z dimerem $G\beta\gamma$. Następnie, wykazała zróżnicowane znaczenie regionu polizasadowego w lokalizacji błonowej dla badanych białek G, który w przypadku $G\alpha s$ odgrywa znaczącą rolę, a mniejszą w przypadku $G\alpha i3$, chociaż nadal jest tutaj ważny dla błonowej lokalizacji trimera białka G. Doktorantka stwierdziła, że oddziaływanie reszt aminokwasowych N-końca białka $G\alpha$ odbywa się głównie poprzez oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowanymi fosfolipidami. Poczyła także ważne obserwacje odnośnie roli dimera $G\beta\gamma$. Wykazała, że obecny w badanym układzie dimer $G\beta\gamma$ ma wpływ na lokalizację trimera białka G w przestrzeni błony komórkowej i siateczki śródplazmatycznej i także wpływa na lokalizację



trimerycznego białka G względem receptora dopaminowego D2. Ponadto, jak Doktorantka zauważa, dimer $G\beta\gamma$, wpływając na lokalizację błonową $G\alpha$, może modulować efektywność przekazywania sygnału generowanego w konsekwencji stymulacji receptora GPCR.

Uważam, że wyniki zostały przedstawione w sposób klarowny i logicznie uporządkowany i nie budzą żadnych zastrzeżeń.

Dyskusja jest mocną stroną rozprawy, wszystkie wyniki zostały skrupulatnie omówione, przedyskutowane na tle bogato i odpowiednio cytowanego piśmiennictwa i podsumowane w postaci wniosków końcowych. Sposób prowadzenia dyskusji rozprawy doktorskiej pokazuje, że mgr Beata Rysiewicz posiada dużą wiedzę i zdolność krytycznego podejścia do własnych wyników. Pomimo dużej ilości wyników *Dyskusja* jest dobrze osadzona w uzyskanych danych. Wyniki mają nowatorski charakter i wnoszą do nauki istotne wartości. Zamieszczone przy końcu *Dyskusji* wnioski wskazują wyraźnie że cele rozprawy zostały osiągnięte. Zarówno przy czytaniu *Dyskusji* jak i całej dysertacji można zauważyć utrzymywanie przez Doktorantkę logistycznej dyscypliny, stosowanej przy pisaniu rozprawy i logiczny ciąg przyczynowo skutkowy zaplanowanych doświadczeń, co sprawiło, że czytanie tekstu dysertacji było dla mnie nie tylko obowiązkiem, ale także przyjemnością.

Ocena edytorskiej strony rozprawy: Oceniana rozprawa ma dopracowaną szatę graficzną i, co warto podkreślić, w całości jest opracowana bardzo starannie. Tekst rozprawy został napisany w sposób klarowny, i nie budzi zastrzeżeń pod względem poprawności językowej. Doktorantce udało się zdecydowanie uniknąć większej liczby błędów edytorskich, chociaż pojedyncze jednak zauważyłam i z obowiązku recenzenta wykazuję: str. 29 – powinno być „potencjalne”, str. 79 – podpis pod Rysunkiem 32 powinno być „po”, str. 86 – powinno być „na wiązanie”, str. 99 – powinno być „w pracach tych nie zaobserwowano”. Nazewnictwo cyklaza adenylova lub adenyłanova powinno być ujednolicone w obrębie rozprawy. „Retikulum endoplazmatyczne” ma nazwę w języku polskim – siateczka śródplazmatyczna.

Wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Beaty Rysiewicz oceniam wysoko. Przeprowadzone doświadczenia zostały starannie zaplanowane i wykonane. Rozprawa zawiera interesujące wyniki, które noszą cechy odkryć naukowych. Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą i umiejętnością prowadzenia badań naukowych. Poprawny styl i



logiczny układ dysertacji, odpowiednio cytowana literatura, sposób przedstawienia i omówienia wyników wskazują na dobre opanowanie przez Doktorantkę warsztatu pracy naukowej. Przytoczone powyżej nieliczne niedopatrzenia edytorskie nie mają wpływu na wartość naukową ocenianej rozprawy i nie umniejszają mojej bardzo dobrej oceny. Ponadto wyniki stanowiące podstawę rozprawy zostały już częściowo opublikowane w dwóch pracach: w *Cell Communication and Signaling* (BMC) oraz *Cells* (MDPI), w których Doktorantka jest drugim autorem.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Znaczenie N końcowego fragmentu podjednostki *Gai3* w procesie lokalizacji błonowej trimerycznego białka *G*” autorstwa mgr Beaty Rysiewicz spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Beaty Rysiewicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej

W związku z moją wysoce pozytywną oceną i mając na uwadze nowatorski charakter badań oraz wysoką wartość naukową rozprawy, której wyniki zostały już częściowo opublikowane w renomowanych czasopismach, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Beaty Rysiewicz.

Prof. dr hab. Irena Nalepa