



Dr hab. Paweł Pomorski, prof. Instytutu
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego,
Polska Akademia Nauk

16 sierpnia 2021

Ocena merytoryczna i metodologiczna rozprawy oraz ocena dorobku naukowego i aktywności naukowej dr Agnieszki Polit w postępowaniu habilitacyjnym pt. **„Rola domen błonowych w przekazie sygnału zachodzącego z udziałem receptorów dopaminowych i białek G”**.

Dostarczona dokumentacja do oceny składa się: z wniosku, z autoreferatu w języku polskim, wykazu osiągnięć, wykaz sfinansowanych projektów badawczych i stypendium krajowego FNP. W składzie dokumentacji znajduje się również certyfikat z wydawnictwa MDPI, potwierdzający funkcję redaktora gościnnego Numeru Specjalnego „Membrane Domains on Protein-Lipid Interaction” czasopisma „membranes” oraz kopia dyplomu doktorskiego Pani Agnieszki Polit. Integralną częścią jest zbiór 4 publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne. Powyższa dokumentacja jest zgodna z Ustawą Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art.219 ust. 1 pkt.2).

Sylwetka Habilitantki

Pani Agnieszka Polit ukończyła w roku 1998 Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Tematem jej pracy była kinetyka fałdowania białek, co już zapowiadało dalszy rozwój kariery naukowej. Cztery lata później obroniła doktorat w Zakładzie Biochemii Fizycznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, zajmując się oddziaływaniami między białkiem, cAMP i DNA w bakteriach, konsekwentnie kontynuując swą drogę w świecie biofizyki doświadczalnej.

Od roku 1998 Habilitantka pracuje na Uniwersytecie Jagiellońskim. Najpierw jako technik w Zakładzie Immunologii, nieistniejącego już dziś Instytutu Biologii Molekularnej, potem, od roku 1999 jako asystent w Zakładzie Biochemii Fizycznej Wydziału Biotechnologii by wreszcie w roku 2006 osiągnąć stanowisko adiunkta w Zakładzie Biochemii Fizycznej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zmienność instytucji w których pracowała Habilitantka wydaje się ocenianemu raczej wynikiem burzliwych przemian organizacyjnych jakie odbywały się na Uniwersytecie Jagiellońskim niż wynikiem jej mobilności.

Pewną rysą na sylwetce Habilitantki jest na pewno brak stażu podoktorskiego. Zmiana środowiska badawczego i poznanie innej kultury naukowej jest ważnym etapem rozwoju naukowego i omijanie go na pewno nie jest godne polecenia. W pewnym stopniu tłumaczą tu Habilitantkę dwa urlopy macierzyńskie a posiadanie dzieci na pewno nie sprzyja mobilności.

Według Bazy Web of Science Habilitantka jest współautorem 42 prac cytowanych 798 razy (index H=16). Taki dorobek publikacyjny stanowi bardzo dobry wynik na tym etapie kariery.

Omówienie i ocena osiągnięcia habilitacyjnego stanowiącego znaczny wkład rozwój dyscypliny (zgodnie z art. 219 ust.1. pkt.2 Ustawy prawo o szkolnictwie wyższym i nauce)

W skład Osiągnięcia Naukowego Habilitantki wchodzi cztery prace doświadczalne opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych:

New insights into the model of dopamine D-1 receptor and G-proteins interactions, opublikowana w *BBA Molecular Cell Research* (IF 5,5) w roku 2015, gdzie Habilitantka jest ostatnim autorem. The role of cholesterol and sphingolipids in the dopamine D-1 receptor and G protein distribution in the plasma membrane, opublikowana w tym samym czasopiśmie w roku 2016 (IF 6,2), gdzie Habilitantka również jest ostatnim autorem. G gamma and G alpha Identity Dictate a G-Protein Heterotrimer Plasma Membrane Targeting, opublikowana w *Cells* (MDPI IF 4,8) w roku 2019, gdzie Habilitantka jest ostatnim autorem oraz The G alpha i protein subclass selectivity to the dopamine D-2 receptor is also decided by their location at the cell membrane, opublikowany w *Cell communication (IF 4,3) and signaling* gdzie Habilitantka jest pierwszym autorem. Te cztery prace do dzisiaj zacytowano 25 razy.

Wszystkie cztery prace, wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego łączy wspólna metodyka. Dr Agnieszka Polit podjęła ambitne zadanie zbadania interakcji pomiędzy receptorem dopaminowym, będącym receptorem GPCR (ang. G Protein Coupled Receptor) a podjednostkami α , odpowiadającymi za przekazywanie sygnału przez ten receptor *in vivo*, w błonach żywych komórek. W tym celu zastosowano dwie fluorescencyjne techniki mikroskopowe: FRET oraz FRAP.

FRET jest metodą polegającą na pomiarze rezonansowego (niepromienistego) transferu energii między dwoma fluorofortami. Badacz pobudza do fluorescencji pierwszy z fluoroforów, zwany donorem a mierzy światło emitowane przez drugi z nich, zwany akceptorem. Jeśli fluorofory znajdują się wystarczająco blisko, to znaczna część energii jest transferowana niepromieniście i fluorescencja akceptora spada a pojawia się światło pochodzące od akceptora. Wydajność tego procesu spada w szóstej potęgę odległości pomiędzy donorem a akceptorem, co powoduje, że zachodzi on praktycznie tylko wtedy gdy białka znakowane fluorofortami tworzą kompleks. Technika ta jest trudną, ale doskonałą metodą przyżyciowego badania powstawania kompleksów białkowych. Metoda ta ma jednak wiele wad praktycznych, które powodują, że często trudno ją zastosować w praktyce. W klasycznych zastosowaniach mikroskopowych badacz pracujący metodą FRET musi się zmagać z blaknięciem fluoroforu donora i jego fotokonwersją. Częste są również problemy z obrazowaniem światła emitowanego przez donora w kanale rejestracyjnym dla akceptora i wzbudzaniu akceptora przez światło wzbudzające dla donora (ang. *spectral cross-talk*). Podczas gdy sama technika FRET nie jest nowością w badaniach mikroskopowych, to Habilitantka użyła jej zaawansowanego wariantu, FLIM-FRET (FLIM to ang. *Fluorescence Lifetime IMaging*). W tej wersji, zamiast porównywać intensywności światła emitowanego przez donora i akceptor, bada się czas w którym donor emituje foton po wzbudzeniu. Zjawisko FRET skraca ten czas. Tu recenzent musi wyjaśnić dlaczego dotychczas nie rozszyfrował skrótu FRET. Ma ten skrót bowiem dwa rozwinięcia: tradycyjne, europejskie: *Förster Resonance Energy Transfer* i współcześnie dominujące, częściej używane w USA: *Fluorescence Resonance Energy Transfer*. Oba rozwinięcia są oczywiście prawidłowe i Habilitantka oczywiście o tym wie, niemniej nie ustrzegła się związanego z tym bałaganu i na stronie 4 autoreferatu pisze o Försterowskim rezonansowym

transferze energii, który w nawiasie tłumaczy na angielski jako Fluorescence Resonance Energy Transfer. Na coś się jednak trzeba zdecydować.

Drugą metodą używaną we wszystkich pracach jest technika FRAP (ang. *Fluorescence recovery after photobleaching*). Metoda ta polega na wygaszeniu fluorescencji na niewielkim obszarze i obserwacji odzyskiwania świecenia przez ten obszar. Zdolność do emisji światła przez wygaszony obszar jest spowodowana napływem cząsteczek fluoroforu spoza wygaszonego obszaru i jej dynamika może być użyta do określenia jego stałej dyfuzji.

Obie metody są nowoczesne lub nawet bardzo nowoczesne (FLIM-FRET) i trudne. Wyniki prezentowane w pracach tworzących osiągnięcie habilitacyjne wskazuje, że habilitantka używa ich z pełnym sukcesem i można ją uznać za wysokiej klasy specjalistę od mikroskopii fluorescencyjnej.

Powyżej opisane metody zostały użyte przez Habilitantkę do zbadania oddziaływań receptora Dopaminy z towarzyszącymi mu podjednostkami białka G. Od lat wiadomo, że receptory z grupy GPCR transmitują sygnał do wnętrza komórki przez aktywację trójpodjednostkowego białka G. Wcale jednak nie było jasne, jak ten proces przebiega w szczegółach. W pierwszej z prac, Habilitantka postanowiła sprawdzić, czy receptor jest skompleksowany z białkiem G przed pobudzeniem czy nie i jak wpływa na to lokalne środowisko lipidowe. Habilitantka odnosi się tu do dwóch obecnych w literaturze koncepcji: hipotezy prekompleksowania (ang. *precoupling model*) zakłada, że białko G jest fizycznie związane z receptorem przed aktywacją, co dobrze wyjaśnia szybką odpowiedź receptora i dominującą hipotezę sprzęgania kolizyjnego (ang. *collision coupling*), w której kompleks powstaje dopiero po napotkaniu białka G przez aktywowany receptor. Habilitantka bada zdolność do tworzenia kompleksów i ruchliwość trzech białek: receptora dopaminowego D₁, konstytutywną dla niej podjednostkę białka G G_{αs} (odpowiedzialną za indukcję syntezy cAMP) i podjednostkę G_{αi} (odpowiedzialną za hamowanie syntezy cAMP), z którą receptor dopaminowy normalnie kompleksów nie tworzy. Podczas badań pokazała, że kompleks D₁- G_{αs} pokazywany metodą FRET powstaje dopiero po pobudzeniu receptora a kompleks D₁- G_{αi} nie powstaje. W ten sposób potwierdzono hipotezę sprzęgania kolizyjnego. Jednocześnie zarówno wyniki pochodzące z doświadczeń wykonanych metodą FRET jak i pomiary mobilności białek metodą FRAP wskazały nie tylko na okoliczności powstawania kompleksów ale i pokazały, że niezwiązane białka są relatywnie blisko siebie w błonie. Tylko takie położenie wyjaśnia szybkość powstawania kompleksu receptora z białkiem G, konieczną do efektywnego przekazywania sygnału. Habilitantka stawia hipotezę, że za lokalizację obu białek w błonie komórkowej odpowiadają ich interakcje z tworzącymi je lipidami. Zakłada przy tym, że za lokalizację białek odpowiadają mikrodomeny lipidowe, zwane również tratwami lipidowymi (ang. *lipid rafts*). Taka interpretacja była jednak utrudniona przez duże różnice w ruchliwości pomiędzy podjednostkami G_{αi} i G_{αs}, które zachowywały się wyraźnie inaczej mimo skłonności do wiązania się z podobnym środowiskiem błonowym, przy czym ruchliwość kompleksu receptora z konstytutywną dla niej podjednostką G_{αs} była wyraźnie niższa niż ruchliwość kompleksu z G_{αi}.

Konsekwencją obserwowanej różnicy w ruchliwości badanych podjednostek G_α była hipoteza, że mimo podobieństwa, mają one powinowactwo do nieco innego składu lipidowego otaczającej je błony. Wynikiem doświadczalnej weryfikacji tej hipotezy jest druga praca z cyklu stanowiącego osiągnięcie habilitacyjne. Podczas gdy receptor dopaminy jest białkiem transbłonowym, trój podjednostkowe białko G jest jedynie związane z wewnętrzną stroną błony komórkowej. Podstawową rolę odgrywają tu kowalencyjnie związane z aminowym końcem łańcucha polipeptydowego podjednostki G_α. Habilitantka postanowiła sprawdzić, jak zmiany w składzie lipidowym błony będą wpływać na zdolność receptora do wiązania białka G jak i na ruchliwość błonową poszczególnych białek. Zastosowano dwie modyfikacje składu lipidowego



błony, zmieniające wyraźnie jej strukturę i często wykorzystywane do badań nanodomien lipidowych. W pierwszym rodzaju eksperymentów, Habilitantka obniżała zawartość cholesterolu w błonie przy użyciu cyklodekstryny oraz hamowała syntezę sfingolipidów przy pomocy fumonizyny. Okazało się, że każda modyfikacja błony silnie zwiększa wiązanie podjednostki $G_{\alpha s}$ przez niepobudzony receptor, nie wpływając zasadniczo na zdolność tego receptora do wiązania podjednostki $G_{\alpha i}$. Co ciekawe, obie modyfikacje składu lipidowego błony raczej obniżają, jeśli w ogóle zmieniają, ruchliwość receptora i podjednostki $G_{\alpha s}$ niż ją zwiększają. Narzucają się tu dwa wnioski, których jednak Habilitantka nie wyciąga, że skład lipidowy ma wpływ na sam proces aktywacji receptora i to, że raczej nie ma wpływu na specyficzność receptora do jego kanonicznej podjednostki G_{α} . Jest to bardzo ciekawy wynik, jako że znamy przypadki zmiany preferencji receptora GPCR do podjednostki G_{α} i zazwyczaj jest to wynik oddziaływania białko-białko (Bagchi *et al.*, J Biol Chem., 2005).

Trzecia praca z Osiągnięcia Habilitacyjnego dotyczy wpływu podjednostek $G_{\beta\gamma}$ na zachowanie się całego kompleksu i jego zdolność do oddziaływania z lipidami błony. Już poprzednie dwie prace pokazywały, że kompleks receptora z całym, trójpodjednostkowym białkiem G zachowuje się inaczej niż jego kompleks z samą podjednostką G_{α} . Aby zbadać wpływ podjednostki $G_{\beta\gamma}$ Habilitantka postanowiła sprawdzić, jaki będzie wpływ zamiany podjednostki $G_{\gamma 2}$, którą badała dotychczas na podjednostkę $G_{\gamma 9}$. Te dwie podjednostki różnią się bardzo, opisaną w literaturze zdolnością do translokacji między błoną komórkową a wewnątrzkomórkowymi strukturami błoniastymi. Metodą FRET badano skłonność poszczególnych kombinacji podjednostek G_{α} i G_{γ} na powstawanie białka trójpodjednostkowego białka G, co było mierzone transferem energii pomiędzy podjednostką G_{α} a kompleksem $G_{\beta\gamma}$. Habilitantka uzyskała bardzo ciekawe wyniki, w których rodzaj podjednostki G_{γ} miał niewielki lub żaden wpływ na powstawanie kompletnego białka G. Niemniej rodzaj ten miał wyraźny wpływ na skutki aktywności receptora, przy czym kompleksy zawierające podjednostkę $G_{\alpha s}$ były testowane z purynergicznym receptorem A_{2A} , gdzie spadek stężenia cAMP w cytoplazmie był ponad dwukrotnie większy gdy białko G zawierało podjednostkę $G_{\gamma 2}$ Te zawierające podjednostkę $G_{\alpha i}$ były testowane z receptorem dopaminy D_2 i tu z kolei wzrost stężenia cAMP był dużo większy dla podjednostki $G_{\gamma 2}$, mimo że nie zaobserwowano żadnych różnic w wydajności tworzenia trimerów. Zastanawiające jest swoją drogą, dlaczego Habilitantka w pierwszych dwóch pracach używa receptora D_1 a w kolejnych dwóch D_2 .

Czwarta i ostatnia praca dotyczyła różnic w obrębie jednej rodziny podjednostek G_{α} , konkretnie podjednostki $G_{\alpha i}$. Istnieją trzy warianty podjednostki $G_{\alpha i}$, kodowane przez trzy różne geny. Sekwencje tych genów są bardzo podobne ale wciąż możemy obserwować wyraźne różnice pomiędzy ich zdolnością do tworzenia kompleksów z receptorem i podjednostką $G_{\beta\gamma}$ oraz różną ruchliwość w błonie. Habilitantka konstatuje, że mimo znacznego podobieństwa, różne białka $G_{\alpha i}$ mają nieco inny rozkład w błonie komórkowej.

Podsumowując, użycie nowoczesnych, przyżyciowych metod badawczych, pozwoliło na całkiem nowy wgląd w działanie skomplikowanego układu czterech białek jakim jest receptor GPCR. Najważniejszym wynikiem osiągniętym przez Habilitantkę jest pokazanie, że tworzenie kompleksu białka receptora z białkiem G następuje dopiero po związaniu liganda przez receptor i, że wszystkie elementy tej układanki nie są losowo rozrzucone w błonie, tylko tworzą cały czas luźną strukturę, pozostającą w gotowości do działania. Głębsza interpretacja tego faktu budzi jednak pewne wątpliwości. Habilitantka bowiem rozpatruje swoje wyniki jedynie w świetle bezpośredniego otoczenia lipidowego badanych białek i ortodoksyjnie stosuje hipotezę o samoorganizującej funkcji mikrodomen lipidowych. Musimy jednak pamiętać, że hipoteza ta ma swoje wady i w analizie błony komórkowej trzeba pamiętać również o licznych białkach,

które towarzyszą receptorom, w przypadku receptora Dopaminy mówimy tu o tzw. DRIPs (ang. *dopamine receptor-interacting proteins*) oraz DRAPs (ang. *dopamine receptor associated proteins*), całej licznej grupie białek, które razem tworzą strukturę zwaną „signalplex”. Struktura ta składa się nie tylko z białek wykazujących aktywność sygnałową ale także białek adaptorowych i jest zakotwiczona w cytoszkielecie. Z tej perspektywy interpretacja uzyskanych wyników w kontekście trzech białek pływających w zróżnicowanej co do składu błonie jest niekompletna i komponent białkowy utrzymujący strukturę powinien być przedyskutowany, zwłaszcza w autoreferacie habilitacyjnym, który zbiera wszystkie wyniki i pokazuje zagadnienie w szerszym kontekście. Zgodzić się bowiem można z tym, że eksperymentator, projektujący doświadczenie, musi ograniczać liczbę badanych elementów, tak by wyniki były klarowne.

Dr Agnieszka Polit jest również pierwszym autorem interesującej pracy przeglądowej „Every Detail Matters. That Is, How the Interaction between G α Proteins and Membrane Affects Their Function:”, *Membranes* 2021, 11(3), 222. Nieco mnie dziwi brak tej pracy w składzie „Osiągnięcia Habilitacyjnego”, co tłumaczę sobie zbyt późnym jej ukazaniem się w czasopiśmie (koniec marca 2021).

Ocena pozostałego dorobku naukowego Habilitanta

Dr Agnieszka Polit posiada warsztat badawczy z dziedziny szeroko pojętej biochemii i biofizyki, który pozwala jej na badania strukturalne i funkcjonalne białek, a co za tym idzie może być aktywną w każdym w zasadzie obszarze współczesnej biochemii i biologii molekularnej. Świadczy o tym szeroki zakres podejmowanych zagadnień badawczych, które podejmuje zarówno samodzielnie jak i we współpracy z licznymi zespołami z innych ośrodków naukowych niż Uniwersytet Jagielloński. Oprócz mechanizmu aktywacji białek G Habilitantka bada również oligomeryzację receptorów, zarówno poprzez tworzenie homooligomerów jak i heterooligomeryzację różnych receptorów, takich jak heterooligomery receptorów dopaminy i serotoniny czy receptorów dopaminy i bradykininy. Habilitantka bada jednak również tak odległe od biofizyki receptorów procesy jak zmiany konformacyjne w cząsteczkach wysokotemperaturowych proteaz serynowych HtrA, które bada wraz z zespołem z Uniwersytetu Gdańskiego, czy struktura laktoglobulin, badana przez nią wspólnie z badaczami z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w celu opracowania nośników leków o wysokiej toksyczności. We współpracy z grupą z Helsinek Habilitantka prowadzi również badania ściśle strukturalne. Nie ma tu na pewno miejsca na wymienianie wszystkich technik, których opanowanie przez Habilitantkę znajduje dowód w licznych pracach, których jest autorem. Można jedynie podsumować, że jest ona bardzo sprawnym technicznie badaczem, posiadającym dostęp do szerokiego wachlarza nowoczesnych metod biofizycznych.

Dr Agnieszka Polit jest również kierownikiem dwóch grantów OPUS, jednego już zrealizowanego i rozliczonego, drugiego w trakcie realizacji.

Dr Agnieszka Polit jest również aktywnym nauczycielem akademickim, od początku swej kariery prowadzącym ćwiczenia ze studentami kierunków: Biochemia, Biofizyka, Biotechnologia, Biotechnologia Molekularna i Chemia Biologiczna. Habilitantka prowadzi też autorski wykład dla studentów studiów podyplomowych „Struktura i funkcja białek: od sekwencji do konsekwencji”. Habilitantka prowadzi także wykłady dla studentów I i II stopnia w ramach kursów: „Biochemia fizyczna”, „Biochemia fizyczna - kurs podstawowy”, „Struktura i funkcja makrocząsteczek- metodologia badań”, „Co to są białka, jak je badamy i dlaczego są ważne w zdrowiu i chorobie” (cykl *Artes Liberales*: dwa wykłady: „Białka błonowe”, „Badania strukturalne białek”).

Dr Agnieszka Polit opiekowała się wykonaniem jedenastu prac licencjackich i szesnastu prac magisterskich. Była recenzentem dwudziestu czterech prac magisterskich. W ostatnich latach została też promotorem pomocniczym dla dwóch prac doktorskich. Jeden z wypromowanych doktorantów, dr Paweł Mystek jest współautorem wszystkich prac wchodzących w skład „Osiągnięcia Habilitacyjnego”.

Podsumowanie i ocena końcowa

Dokładna analiza dorobku naukowego oraz aktywności naukowej dr Agnieszki Polit pozwala stwierdzić, że Jej dorobek naukowy oraz osiągnięcia we współpracy naukowej spełniają wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. poz.1668 ze zm.) Biorąc pod uwagę powyższe fakty, popieram wniosek o nadanie doktorowi stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne i wnioskuję o dopuszczenie dr Agnieszki Polit do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

