

Ocena aktywności naukowej oraz osiągnięcia będącego przedmiotem wniosku habilitacyjnego dr Aleksandry Bocian

Przebieg pracy zawodowej.

Aleksandra Bocian ukończyła studia wyższe na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu i uzyskała tytuł zawodowy magistra biologii (specjalność biologia molekularna) w roku 2005, na podstawie pracy magisterskiej pt. „Elektroforeza dwukierunkowa białek i wybranych enzymów protoplastu i płaszczka pyłku trójślupkowych kwiatów *Lythrum salicaria*”, wykonanej w Pracowni Cytogenetyki Instytutu Genetyki Roślin PAN (IGR PAN) w Poznaniu. W latach 2006-2010 Aleksandra Bocian była doktorantką na Wydziale Biologii UAM realizując projekt doktorski w IGR PAN pod opieką prof. Zbigniewa Zwierzykowskiego, a w latach 2010-2011 pracowała w IGR PAN na stanowisku inżynierjno-technicznym. Stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie agronomia (z wyróżnieniem) nadała Jej w roku 2012 Rada Naukowa IGR PAN na podstawie rozprawy pt. „Analiza akumulacji wybranych białek i metabolitów pierwotnych u życicy trwałej (*Lolium perenne* L.) podczas hartowania na mróz”. W trakcie studiów doktoranckich Habilitantka odbyła dwa staże naukowe: w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (pod kierunkiem prof. Marcina Rapacza) oraz w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (pod kierunkiem dr Łukasza Marczaka). Ten drugi staż, w trakcie którego Habilitantka zapoznała się z podstawami spektrometrii mas i ich zastosowaniami w proteomice i metabolomice, okazał się mieć decydujące znaczenie dla Jej dalszych zainteresowań badawczych. Począwszy od roku 2011 dr Aleksandra Bocian jest pracownikiem Zakładu Biotechnologii i Bioinformatyki na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej, od 2019 jako profesor uczelni.

Zakres zainteresowań badawczych i tematyka projektów realizowanych przez dr Aleksandrę Bocian jest bardzo różnorodny. W trakcie studiów na UAM i pracy w IGR PAN Habilitantka zajmowała się genetyką i biochemią roślin, szczególnie w kontekście odpowiedzi na warunki stresu (niska temperatura). Efektem tego etapu kariery naukowej jest m.in. 5 publikacji w rozpoznawalnych czasopismach naukowych (dwie jako pierwszy autor). Po rozpoczęciu pracy na Politechnice Rzeszowskiej Habilitantka prowadziła badania proteomiczne w czterech obszarach tematycznych: 1) enzymy uczestniczące w metabolizmie roślin, 2) białkowe markery chorób nowotworowych, 3) enzymy bakteryjne uczestniczące w degradacji ksenobiotyków, oraz 4) analiza białek obecnych w produktach spożywczych (np. miodzie). Począwszy od roku 2016 głównym obszarem badań Habilitantki stają się molekularne składniki jadu węży, czyli tematyka będąca przedmiotem osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę wniosku. Warto podkreślić, że tylko część prac Habilitantki

dotycząca tej ostatniej tematyki stanowi cykl 7 publikacji wskazany jako osiągnięcie, natomiast trzy inne pierwszo-autorskie prace w czasopismach z IF (oraz dwie popularyzatorskie prace przeglądowe) nie zostały do niego włączone. Pozwoliło to zachować wysoki poziom spójności tematycznej prac tworzących cykl (dotyczy on wyłącznie jadu kobr z rodzaju *Naja*), co nie jest częstym wyborem osób przygotowujących rozprawy habilitacyjne (do których często włącza się prace dość „luźno” powiązane).

Na uwagę zwraca duża umiejętność nawiązywana przez Habilitantkę współpracy naukowej z badaczami z innych uczelni i instytutów badawczych (Uniwersytet Rzeszowski, Politechnika Śląska, Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie, Narodowy Instytut Onkologii, Instytut Chemii Bioorganicznej) oraz ośrodków klinicznych czy też z firmami biotechnologicznymi. Długoletnia współpraca z Uniwersytetem Medycyny Weterynaryjnej i Farmacji w Koszycach na Słowacji umożliwiła Habilitantce uzyskania wyników stanowiących przedmiot osiągnięcia naukowego będącego podstawą wniosku. Również w innych przypadkach współpraca nawiązana przez Habilitantkę stanowi przykład udanej synergii działań podjętych przez zespoły badawcze z nie zawsze dużych i liczących się ośrodków naukowych.

Osiągnięcie naukowe będące przedmiotem habilitacji.

Osiągnięciem habilitacyjnym dr Aleksandry Bocian jest cykl publikacji pt. „Wykorzystanie narzędzi proteomicznych do analizy białek wchodzących w skład jadu kobr z rodzaju *Naja* oraz funkcjonalna analiza ich właściwości”. W skład cyklu habilitacyjnego wchodzi 7 prac naukowych opublikowanych w latach 2018-2021:

- [1] Hus K.K., Buczkowicz J., Petrilla V., Petrillová M., Łyskowski A., Legáth J., **Bocian A.*** (2018). First Look at the Venom of *Naja ashei*. *Molecules* 23(3), 609.
- [2] Hus K.K., Marczak Ł., Petrilla V., Petrillová M., Legáth J., Bocian A.* (2020). Different Research Approaches in Unraveling the Venom Proteome of *Naja ashei*. *Biomolecules*, 10(9), 1282.
- [3] **Bocian A.***, Sławek S., Jaromin M., Hus K.K., Buczkowicz J., Łysiak D., Petrilla V., Petrillová M., Legáth J. (2020). Comparison of Methods for Measuring Protein Concentration in Venom Samples. *Animals* 10(3), 448.
- [4] Lewinska A., **Bocian A.**, Petrilla V., Adamczyk-Grochala J., Szymura K., Hendzel W., Kaleniuk E., Hus K.K., Petrillová M., Wnuk M. (2019). Snake venoms promote stress-induced senescence in human fibroblasts. *Journal of Cell Physiology* 234(5), 6147-6160.
- [5] Kuna E., **Bocian A.**, Hus K.K., Petrilla V., Petrillová M., Legáth J., Lewinska A., Wnuk M. (2020). Evaluation of Antifungal Activity of *Naja pallida* and *Naja mossambica* Venoms against Three *Candida* Species. *Toxins* 12, 500.

- [6] **Bocian A.***, Ciszkowicz E., Hus K.K., Buczkowicz J., Lecka-Szlachta K., Pietrowska M., Petrilla V., Petrillová M., Legáth L., Legáth J. (2020). Antimicrobial Activity of Protein Fraction from *Naja ashei* Venom Against *Staphylococcus epidermidis*. *Molecules* 25(2), 293.
- [7] Dyba B., Rudolphi-Szydło E., Barbasz A., Czyżowska A., Hus K.K., Petrilla V., Petrillová M., Legáth J., **Bocian A.*** (2021). Effects of 3FTx Protein Fraction from *Naja ashei* Venom on the Model and Native Membranes: Recognition and Implications for the Mechanisms of Toxicity. *Molecules* 26, 2164.

* autor korespondencyjny

Znaczenie prac tworzących cykl habilitacyjny.

Przedmiotem badań opisanych w pracach tworzących cykl habilitacyjny są białka obecne w jadzie węży z rodzaju *Naja* (kobry), zarówno w kontekście składu charakterystycznego dla różnych gatunków jak i ich właściwości funkcjonalnych. W pracy [1] autorzy wykorzystali technikę rozdzielania elektroforetycznego 2D i analizę MALDI-ToF/ToF wyciętych obszarów żelu do pierwszej w historii analizy białek obecnych w jadzie kobry *Naja ashei*. Analiza ta pozwoliła na wykrycie 19 białek należących do siedmiu rodzin występujących w jadach węży: metaloproteiny (SVMP), białka wydzielnicze bogate w cysteinę (CRISP), 5'-nukleotydyazy, *cobra venom factor*, fosfolipazy A2 (PLA2), czynnik wzrostu nerwów (VNGF) i toksyny z motywem trzech palców (3FTx). Wykazano, że najliczniejsze białka obecne w jadzie *Naja ashei* to białka z rodzin 3FTx oraz PLA2. W pracy [2] autorzy ponowili analizę białek obecnych w jadzie kobry *Naja ashei* stosując bardziej czułą metodę analityczną – kombinację chromatografii cieczowej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas z zastosowaniem analizatora typu Orbitrap. W przeprowadzonej analizie typu „shotgun” porównano dwa narzędzia bioinformatyczne: program PeptideShaker (który umożliwił identyfikację 37 białek) i program MaxQuant (który umożliwił identyfikację 39 białek). Co istotne, listy białek zidentyfikowanych z wykorzystaniem obu narzędzi pokrywały się tylko częściowo. W celu zwiększenia liczby zidentyfikowanych białek autorzy wprowadzili dodatkowy etap frakcjonowania – filtracji przez membranę z punktem odcięcia 30 kDa. Pozwoliło to na wykrycie większej liczby peptydów i identyfikację większej liczby białek, odpowiednio 53 i 58. Przy okazji stwierdzono, że we frakcji „nisko cząsteczkowej” znajdowały się niemal wyłącznie białka z rodziny 3FTx. Praca [3] miała charakter metodyczny, a autorzy porównali w niej wyniki pomiaru poziomu białka za pomocą pięciu powszechnie stosowanych metod. Okazało się, że w przypadku jadu *Naja ashei* różne metody bazujące na różnych zasadach pomiaru aminokwasów lub wiązań peptydowych generują bardzo różne wyniki (stosowany jako punkt odniesienia jad mokasyna *Agkistrodon contortrix* dawał bardziej jednorodne wyniki), co wskazuje na konieczność dostosowania techniki pomiarowej do składu konkretnej mieszaniny białek. W pracy [4] autorzy testowali efekty

toksyczne jadu czterech gatunków węży (kobr *Naja siamensis* i *Naja melanoleuca*, mamby *Dendroaspis viridis* oraz mokasyń *Agkistrodon contortrix*) na prawidłowe fibroblasty ludzkie (analiza *in vitro*). Wykazano, że analizowane jady (przede wszystkim pochodzące od *Naja melanoleuca* i *Agkistrodon contortrix*) powodowały spadek liczby żywych komórek, hamowały ich migrację, zatrzymywały cykl komórkowy w fazie G0/G1 oraz indukowały programowaną śmierć komórek (co ciekawe, aktywność antyproliferacyjną wykazywały subtoksyczne dawki jadów). Ponadto, autorzy wykazali, że subtoksyczne dawki jadu indukowały adaptacyjną reakcję na stres (modulacja stresu oksydacyjnego i starzenia wywołanego stresem). Obserwowane efekty autorzy przypisali wysokiej zawartości białek z rodzin oksydaz L-aminokwasowych, PLA2 i SVMP w najbardziej aktywnych jadach. W pracy [5] autorzy przeprowadzili analizę składu białek obecnych w jadzie kobr *Naja mossambica* i *Naja pallida*, oraz przetestowali ich aktywność cytotoksyczną w stosunku do grzybów z rodzaju *Candida*. Autorzy opisali szereg mechanizmów swoistych dla gatunku węży i gatunków grzybów (w tym działanie cytotoksycznie i antyproliferacyjne, hamowanie formowania biofilmu, zmiany metabolizmu i sekrecji enzymów), które wskazują na duże spektrum możliwych efektów mykobójczych składników jadu węży. W pracy [6] autorzy badali antybakteryjne właściwości jadu kobry *Naja ashei*. Analizowana była aktywność różnych frakcji jadu (po rozdziale chromatograficznym na kationicie). Wykazano, że najwyższą aktywność bakteriobójczą w stosunku do dwóch szczepów *Staphylococcus epidermidis* (wyższą niż ampicylina i tetracyklina) miała frakcja, w której poza białkami z rodzin 3FTx i PLA2 obecne były również oksydazy L-aminokwasowe. W pracy [7] autorzy testowali hipotezę, że przyczyną toksycznego działania białek z rodziny 3FTx są ich oddziaływania z lipidowymi składnikami błon komórkowych. Do badań wykorzystano frakcje jadu kobry *Naja ashei* (rodział typu *size-exclusion chromatography*) i wykazano wyższy poziom uszkodzeń błon komórek HL-60 niż komórek U-937 (nie mający jednak bezpośredniego związku z poziomem peroksydacji lipidów błonowych). Następnie aktywność frakcji wzbogaconej w białka z rodziny 3FTx badano z wykorzystaniem sztucznej membrany lipidowej utworzonej na granicy faz powietrze-woda, o składzie odzwierciedlającym skład lipidów w obu liniach komórkowych. W badaniu tym wykazano wyższy poziom zaburzeń struktury membrany o składzie charakterystycznym dla komórek HL-60 (m.in. większy udział lipidów zwitterjonowych, cholesterolu i nienasyconych łańcuchów kwasów lipidowych).

Do najważniejszych elementów osiągnięcia naukowego dr Aleksandry Bocian stanowiącego przedmiot jej wniosku habilitacyjnego należą:

- przeprowadzenie porównania składu białek obecnych w jadzie kobr z gatunków *Naja ashei*, *Naja siamensis*, *Naja mossambica* i *Naja pallida*,
- wykazanie aktywności biologicznej niskich dawek jadu, który nawet w stężeniach subtoksycznych ma negatywny wpływ na komórki ludzkie, obejmujący apoptozę, zatrzymanie proliferacji i stres oksydacyjny,

- wykazanie aktywności przeciwgrzybiczej i antybakteryjnej jadów kobr,
- wykazanie odmiennych interakcji jadu kobr z membranami lipidowymi o różnym składzie, co może sugerować swoistość interakcji z różnymi błonami biologicznymi.

Uzyskane wyniki, poza wartościami poznawczymi, mogą być w przyszłości podstawa do wykorzystania składników jadów kobr w wielu ważnych zastosowaniach medycznych.

Badane przez Habilitantkę implikacje techniczne wybranych procedur analitycznych, w tym:

- wykazanie wpływu wybranej metody bioinformatycznej analizy danych proteomicznych (szczególnie w podejściu *shotgun*) na uzyskany wynik końcowy,
- wykazanie, że różne techniki pomiaru stężenia białka dają inny efekt w przypadku mieszanin o innym składzie,

choć ciekawe i mające duże znaczenie praktyczne, należą do zagadnień dobrze rozpoznanych w środowisku badaczy zajmujących się proteomiką i spektrometrią mas.

Prace tworzące cykl były publikowane w rozpoznawalnych czasopiśmie naukowych o zasięgu międzynarodowym, a ich łączny IF wynosi ok. 29,5 (630 punktów MNiSW). Prace tworzące cykl habilitacyjny były cytowane 48 razy (za Web of Science, 03/04/2022), co (biorąc pod uwagę „niszowy” charakter tematu) świadczy o dobrym odbiorze prac tworzących cykl habilitacyjny.

Rola Habilitantki w powstaniu prac tworzących cykl habilitacyjny. Dr Bocian była autorem pierwszym i korespondencyjnym w dwóch pracach tworzących cykl, w dwóch autorem drugim a w trzech autorem ostatnim/korespondencyjnym. Wg. oświadczenia Habilitantki, Jej udział w powstaniu prac tworzących cykl polegał przede wszystkim na przygotowaniu koncepcji badawczej prac [1], [2], [3], [6] i [7], oraz zaprojektowaniu i zaimplementowaniu różnych narzędzi proteomicznych wykorzystanych do analizy składu molekularnego badanego materiału we wszystkich pracach tworzących cykl (m.in. przeprowadzenie analiz oraz opracowanie i interpretacja wyników). Ponadto, Habilitantka była współautorem koncepcji badawczej w pracach [4] i [5]. W części prac Habilitantka była autorem korespondencyjnym odpowiedzialnym za kształt manuskryptu. Trzy prace ([3], [6], [7]) zostały sfinansowane ze środków projektu NCN Miniatura, którego kierownikiem była Habilitantka. Oświadczenie Habilitantki jest spójne z załączonymi oświadczeniami współautorów. Należy więc uznać, że indywidualny wkład dr Aleksandry Bocian był decydujący dla powstania publikacji tworzących cykl habilitacyjny.

Aktywność naukowa Habilitantki.

Dorobek publikacyjny. Dr Aleksandra Bocian jest współautorką 19 publikacji w recenzowanych periodykach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Przed uzyskaniem doktoratu Habilitantka opublikowała 4 prace w czasopiśmie o łącznym IF ~9,5 (była pierwszym autorem w jednej pracy). Po uzyskaniu doktoratu Habilitantka opublikowała 15 prac w czasopiśmie o łącznym IF ~49 (7 z tych prac tworzy cykl będący osiągnięciem naukowym – przedmiotem habilitacji), w tym 13 prac pierwszo-autorskich. Ponadto, dr Bocian była współautorem 9 rozdziałów w monografiach naukowych oraz prac popularyzatorskich (5 po doktoracie). Dodatkowo, wyniki prac badawczych prowadzonych przez Habilitantkę były prezentowane w trakcie szeregu konferencji naukowych. Dr Bocian była współautorem 33 doniesień plakatowych i prezentowała 3 ustne doniesienia konferencyjne (w tym 2 referaty na konferencjach międzynarodowych), a także w formie kilku referatów na spotkaniach projektowych.

Obecnie (dostęp do strony *Web of Science* w dniu 03/04/2022) łączna liczba cytowań prac, których współautorem jest Habilitantka wynosi 247 (201 bez autocytowań), a Jej indeks Hirscha wynosi 9.

Prowadzenie prac badawczych w różnych instytucjach naukowych.

Po ukończeniu studiów magisterskich Habilitantka prowadziła prace naukowo-badawcze w dwóch instytucjach:

- Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu (2006-2011)
- Wydział Chemiczny Politechniki Rzeszowskiej (2011-obecnie)

oraz odbyła staże naukowe w:

- Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (2010 i 2011, 6 miesięcy)
- Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie (2008, 3 miesiące)
- Uniwersytecie Medycyny Weterynaryjnej i Farmacji w Koszycach (2017, 1 miesiąc)
- Ośrodka Badawczo-Rozwojowym Olimp Laboratories Sp. z o.o. (2013, 6 miesięcy)

Dr Aleksandra Bocian spełnia więc kryterium ustawowe dotyczące aktywności naukowej realizowaną w więcej niż jednej instytucji naukowej.

Projekty grantowe. Dr Aleksandra Bocian był kierownikiem lub kluczowym wykonawcą 2 projektów grantowych:

- projekt badawczy NCN, MINIATURA „Analiza właściwości antybakteryjnych składników jadu kobry plującej *Naja ashei*” (nr 2018/02/X/NZ6/00840), okres realizacji: 11.2018-11.2019, kierownik grantu,

- projekt B+R „Alternatywne źródło fosfolipaz wykorzystywanych w przemyśle spożywczym” w ramach projektu „Podkarpackie Centrum Innowacji” realizowanego w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podkarpackiego na lata 2014-2020, Oś Priorytetowa I: Konkurencyjna i innowacyjna gospodarka, okres realizacji 04.2021-12.2021, lider projektu,
- ponadto, Habilitantka była wykonawcą szeregu grantów finansowanych ze środków MNiSW i NCN.

Dr Aleksandra Bocian posiada więc umiejętność pozyskiwania i realizacji projektów badawczych finansowanych na drodze konkursowej oraz kierowania zespołami badawczymi.

Opieka nad rozwojem młodych badaczy i działalność dydaktyczna.

Dr Aleksandra Bocian jest pracownikiem dydaktycznym Politechniki Rzeszowskiej, prowadzącym zajęcia (wykłady i ćwiczenia) dla studentów kierunku Biotechnologia (m.in. prowadzi zajęcia i opracowała materiały do przedmiotów Genetyka, Enzymologia, Inżynieria białek, Biochemia), oraz uczestniczącym w pracach programowych nad studiami na tym kierunku. Habilitantka uczestniczyła w trzech projektach dydaktycznych realizowanych przez Politechnikę Rzeszowską (POKL.04.01.02-00-018/12-00; POWR.03.05.00-00-Z209/17, POWR.03.01.00-U01/16). Dr Bocian była opiekunem 26 prac dyplomowych inżynierskich oraz 18 prac dyplomowych magisterskich. Jest również promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr inż. Konrada Husa.

Współpraca z sektorem gospodarczym.

- umowa z firmą Olimp Laboratories (od 2012 - bezterminowo) dotycząca jakościowej i ilościowej analizy białek w produktach wysokobiałkowych,
- umowa z kancelarią prawną Euro-Legista (od 2014 - bezterminowo) dotycząca jakościowej i ilościowej analizy białek w produktach wysokobiałkowych.

Działalność w towarzystwach i inicjatywach naukowych.

- udział w panelu recenzentów czasopism *Toxins* oraz *Animals*,
- członek założyciel Polskiego Towarzystwa Proteomicznego (od 2012);
- reprezentant Polski w *management committee* akcji COST (CA19144) „*European Venom Network*”
- udział w organizacji trzech konferencji naukowych: IV Podkarpacka Konferencja Młodych Naukowców (Rzeszów, 2018), 8 Kongres Technologii Chemicznej (Rzeszów, 2015), 1st EUCARPIA Festulolium Working Group Workshop (Poznań, 2010).

- udział w działaniach popularyzujących naukę, m.in. „Nocnych Spotkaniach z Nauką”, „Dniach Otwartych Politechniki Rzeszowskiej”, czy cyklicznych seminariach „Wybrane Problemy Chemii”.

Nagrody i wyróżnienia za aktywność naukową

- Nagroda indywidualna III stopnia Rektora Politechniki Rzeszowskiej (2017)
- Nagrody Rektora Politechniki Rzeszowskiej za publikacje naukowe (2018, 2019)

Podsumowanie.

Dr Aleksandra Bocian jest ekspertem z dziedziny proteomiki, specjalizującym się m.in. w oryginalnym obszarze badań z zakresu toksykologii molekularnej i analizy składu białkowego jadów węży, czego potwierdzeniem jest Jej udział w europejskiej inicjatywie COST Action pn. „*European Venom Network*”. Prace tworzące cykl habilitacyjny stanowiące oryginalny i znaczący wkład w rozwój nauk biologicznych. Łączny poziom aktywności zawodowej, zarówno naukowej jak i dydaktycznej czy organizacyjnej Kandydatki, jest satysfakcjonujący i wskazuje na Jej dojrzałość i samodzielność naukową.

W mojej opinii dr Aleksandra Bocian wykazała się osiągnięciami i aktywnością naukową spełniającymi warunki określone w art. 219 ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018. W szczególności Habilitantka posiada w swoim dorobku cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny naukowej, realizowała oryginalne osiągnięcia projektowe oraz wykazała się istotną aktywnością naukową realizowaną w wielu instytucjach naukowych.

W związku z powyższym pozytywnie oceniam wnioski Habilitantki i wnoszę o nadanie Jej stopnia doktora habilitowanego nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



Prof. dr hab. Piotr Widłak
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gliwice, 5.04.2022