

Prof. dr hab. Paweł Bednarek
Zakład Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk
Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

Recenzja osiągnięcia naukowego „**Wykorzystanie narzędzi proteomicznych do analizy białek wchodzących w skład jadu kobr z rodzaju *Naja* oraz funkcjonalna analiza ich właściwości**”, aktywności naukowej, organizacyjnej oraz dydaktycznej **dr Aleksandry Bocian** w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne

1. Formalne podstawy wniosku

Recenzja została wykonana w odpowiedzi na pismo Dziekana Wydziału Biologii UAM w Poznaniu prof. UAM Beaty Messyasz (WB-117-2021/2022) z dnia 14 lutego 2022 r. Ocena osiągnięć naukowych, dydaktycznych i organizacyjnych została wykonana na podstawie następujących dostarczonych dokumentów:

- autoreferatu opisującego osiągnięcie naukowe będące podstawą postępowania habilitacyjnego
- kopii publikacji tworzących osiągnięcie naukowe
- wykazu opublikowanych prac naukowych
- informacji o aktywności dydaktycznej i organizacyjnej oraz popularyzacji nauki
- oświadczeń współautorów publikacji z określeniem ich indywidualnego wkładu

2. Podstawowe informacje o Kandydatce oraz przebieg Jej kariery naukowej

Pani Aleksandra Bocian jest absolwentką Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W roku 2005 wykonała i obroniła pracę magisterską „Elektroforeza dwukierunkowa białek i wybranych enzymów protoplastu i płaszczu pyłku trójstłupkowych kwiatów *Lythrum salicaria*” w Pracowni Cytogenetyki Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod kierunkiem dr Andrzeja Kalinowskiego. Swoją pracę doktorską wykonała w Pracowni Cytogenetyki i Biologii Molekularnej tego samego instytutu pod opieką prof. dr hab. Zbigniewa Zwierzykowskiego. W latach 2010-2011 Kandydatka odbyła sześciomiesięczny staż w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, gdzie pod opieką dr Łukasza Marcza zapoznała się z wykorzystaniem technik spektrometrii mas w biologii. W 2012 roku Rada Naukowa Instytutu Genetyki Roślin PAN na podstawie rozprawy „Analiza akumulacji wybranych białek i

metabolitów pierwotnych u życicy trwałej (*Lolium perenne* L.) podczas hartowania na mróz” nadała pani Aleksandrze Bocian stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie agronomii z wyróżnieniem.

Po obronie doktoratu Kandydatka rozpoczęła pracę w Zakładzie Biotechnologii i Bioinformatyki Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej, gdzie do końca 2019 roku była zatrudniona na etacie adiunkta. W chwili obecnej jest zatrudniona w tym samym Zakładzie na stanowisku profesora uczelni. W czasie zatrudnienia na Politechnice Rzeszowskiej dr Aleksandra Bocian odbyła dwa staże badawcze. Pierwszy z nich trwał 6 miesięcy i odbył się w 2016 roku w Ośrodku Badawczo-Rozwojowy Olimp Laboratories Sp. z o.o. w ramach projektu „Staż Sukcesem Naukowca”. W ramach tego stażu habilitantka zapoznała się z wykorzystaniem narzędzi proteomicznych w analizach żywności. Drugi staż trwał miesiąc i odbył się w 2017 roku na Uniwersytecie Medycyny Weterynaryjnej i Farmacji w Koszycach (Słowacja). Podczas stażu dr Aleksandra Bocian zapoznała się z hodowlą i anatomią węży. Staż ten zainicjował długotrwałą współpracę z prof. Jaroslavem Legáth i dał podstawę nowego kierunku badań Habilitantki, którego rezultatem jest omawiane osiągnięcie naukowe.

3. Osiągnięcie naukowe

Jako osiągnięcie naukowe pani dr Aleksandra Bocian przedstawił cykl spójnych tematycznie siedmiu oryginalnych prac badawczych opublikowanych w latach 2018-2021. Wszystkie publikacje składające się na osiągnięcie naukowe są wieloautorskie (6-10 autorów). W przypadku dwóch publikacji, dr Aleksandra Bocian jest pierwszym autorem i równocześnie autorem do korespondencji, a w przypadku trzech prac ostatnim autorem i autorem do korespondencji, co wskazuje na Jej wiodący udział w zaplanowaniu i przeprowadzeniu badań będących podstawą tych prac.

Wszystkie prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego zostały opublikowane w języku angielskim w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports (JCR). Są to: *Molecules* (3 prace), *Biomolecules*, *Animals*, *Journal of Cell Physiology* oraz *Toxins*. Są to specjalistyczne czasopisma o współczynniku oddziaływania impact factor (IF) w zakresie 3-5. Łączna wartość współczynnika IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego to 29,6 (zgodnie z rokiem opublikowania), natomiast suma punktów MNiSW/MEiN (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi 630. Wartości tych parametrów można uznać, za dobre. Ważniejszym od punktacji czasopism parametrem bibliometrycznym, który daje w miarę obiektywną informację na temat istotności publikowanych wyników oraz ich wpływu na prace prowadzone w innych zespołach naukowych jest liczba cytowań publikacji. Według informacji z bazy Web of Science prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego były do momentu przygotowania tej recenzji cytowane łącznie 35 razy (29 bez autocytowań). Tą liczbę można by uznać za przeciętny wynik. Z drugiej jednak strony należy zauważyć, że cztery z prac stanowiących osiągnięcie naukowe dr Aleksandry Bocian zostały opublikowane

stosunkowo niedawno, w latach 2020-2021, trudno więc oczekiwać, aby w ciągu krótkiego czasu jaki upłynął od ich publikacji prace te zebrały wysoką liczbę cytowań.

Tematyka publikacji wchodzących w skład zaprezentowanego w autoreferacie osiągnięcia naukowego, zgodnie z jego tytułem koncentruje się na zastosowaniu technik proteomicznych do frakcjonowania i identyfikacji składników jadu wybranych gatunków kobr oraz innych węży. Dodatkowo badane były aktywności jadów i ich frakcji oraz molekularne mechanizmy tych aktywności. Analizom proteomicznym całkowicie poświęcone są publikacje AB1 i AB2. Praca AB1 pozwoliła na wstępne poznanie składu białkowego jadu afrykańskiej kobry plującej gatunku *Naja ashei*, który nie był wcześniej opisany w literaturze. W pracy zidentyfikowano łącznie 19 różnych białek należących do siedmiu rodzin występujących w jadach węży. Na szczególną uwagę zasługują białka reprezentujące toksyny z motywem trzech palców (3FTx), które łącznie stanowiły około 70% zidentyfikowanych białek. W większych ilościach zidentyfikowano dodatkowo fosfolipazy A₂. Zwrócono również uwagę na obecność czynnika wzrostu nerwów (VNGF) oraz cobra venom factor (CVF), które do tej pory nie były zidentyfikowane u afrykańskich kobr plujących.

W pracy AB2 zastosowano i porównano bardziej zaawansowane metodyki analiz spektrometrii mas i bioinformatycznej obróbki danych w ilościowej i jakościowej analizie składu tego samego jadu. Analizy potwierdziły, że głównym składnikiem jadu *N. ashei* są białka 3FTx. Zastosowanie zaawansowanych metod proteomicznych w połączeniu z prostym frakcjonowaniem jadu pomogło zidentyfikować białka o mniejszym udziale procentowym w ilościowym składzie jadu, co zaowocowało identyfikacją 58 białek. W trakcie badań udało się też opracować metodykę uzyskiwania frakcji jadu wysoce wzbogaconych w białka 3FTx.

Frakcjonowaniu i analizom jakościowym jadu *N. ashei* poświęcone są też częściowo prace AB6, AB7. W tych publikacjach dodatkowo badana była też aktywność biologiczna wybranych frakcji jadu. W pracy AB6 badan była antybakteryjna aktywność otrzymanych frakcji jadu przeciw klinicznym metycilino-opornym szczepom *Staphylococcus epidermidis*. Uzyskane wyniki wskazują na nieopisaną wcześniej antybakteryjną aktywność oksydaz L-aminokwasowych obecnych w jednej z analizowanych frakcji jadu. Co ciekawe działanie tej frakcji było synergistyczne z testowanymi antybiotykami. Zdaniem Habilitantki wyniki te mogą zostać wykorzystane w przyszłości do projektowania nowych leków antybakteryjnych wspierających eliminowanie lekoopornych bakterii. W pracy AB7 ponownie dopracowano metodykę frakcjonowania jadu *N. ashei* i testowano mechanizm działania cytotoksyn, które obok neurotoksyn stanowią jeden z dwóch głównych składników frakcji 3FTx. W przeciwieństwie do neurotoksyn, mechanizm działania cytotoksyn nie był wcześniej szczegółowo badany. Wyniki uzyskane w pracy AB7 udowodniły toksyczny efekt frakcji zawierającej cytotoksyny na linii komórkowej, będące modelem dla komórek układu odpornościowego. Równocześnie wykazano, że cytotoksyczne właściwości badanych białek 3FTx wynikają z ich zdolności do interakcji z lipidami błonowymi, co z kolei prowadzi do uszkodzenia błon komórkowych.

Aktywność biologiczna jadów węży stanowi też główny temat prac AB4 i AB5. Publikacja AB4 skupia się na analizie składników jadów węży jako potencjalnych czynników antynowotworowych. W tym kontekście

przebadano jad dwóch kobr (*Naja siamensis* i *Naja melanoleuca*), mamby (*Dendroaspis viridis*) oraz mokasy na miedziogłowca (*Agkistrodon contortrix*). W pierwszej części pracy dokonano charakterystyki proteomicznej badanych jadów a następnie badano wpływ nietoksycznych stężeń jadów na prawidłowe komórki ludzkich fibroblastów wykazując po raz pierwszy, że subtoksyczne dawki jadów mają właściwości antyproliferacyjne. W publikacji AB5 przeanalizowano skład jadów dwóch gatunków kobr (*Naja pallida* i *N. mossambica*) i zbadano ich wpływ na wzrost trzech gatunków grzybów z rodzaju *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*. Uzyskane wyniki wskazały, że wpływ jadu był silnie uzależniony od gatunku grzyba. Pomimo tych różnic ogólnie badane jady działały cytotoksycznie i hamowały formowanie biofilmu. Stwierdzono też, że cytotoksyczny efekt jaki wywołują analizowane jady na komórki grzybów nie jest wywołany przez stres oksydacyjny.

Ostania z prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (AB3) jest krótką pracą (komunikat) metodyczną porównującą zastosowanie różnych metody pomiaru całkowitego stężenia białka w jadach dwóch gatunków węży, kobry *N. ashei* i mokasy na *A. contortrix*. O ile w przypadku mokasy na większość metod pomiaru dało podobne wyniki, w przypadku jadu kobry, wyniki różniły się istotnie poszczególnymi metodami. Jako przyczynę tej różnicy autorzy proponują duży udział ilościowy w składzie jadu kobry białek 3FTx, które nie są obecne w jadzie mokasy na. Zdaniem Kandydatki białka te charakteryzują się nietypową zawartością aminokwasów, które mierzone są przez poszczególne testy, stąd też różne wyniki pomiarów. Niestety hipoteza ta nie została w żaden sposób zweryfikowana w omawianej publikacji. Autorzy nie podają składu aminokwasowego białek 3FTx. Nie dokonano pomiaru stężenia białek w frakcjach jadu kobry, w tym we wzbogaconej frakcji 3FTx. Z omówionych powyżej prac wchodzących w skład osiągnięcia wynika, że Kandydatka ma opracowane metodykę odpowiedniego frakcjonowania jadu. W pracy nie ma też wskazania na metodę pomiaru białka, która byłaby najbardziej wiarygodna w pracy z jadem kobry. Biorąc to pod uwagę praca ta nie wnosi niczego istotnego do osiągnięcia naukowego i w odczuciu recenzenta nie powinna się w nim znaleźć.

Ogólnie można stwierdzić, że poza wspomnianą powyżej pracą AB3, pozostałe publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe istotnie przyczyniły się do poznania składu jadów badanych węży, w szczególności kobry *N. ashei*. Dodatkowo, pokazały interesujące właściwości biologiczne badanych jadów i wskazały na potencjalne molekularne podstawy tych aktywności. Opisane w osiągnięciu naukowym wyniki z jednej strony stanowią solidną podstawę do dalszych badań nad składem i właściwościami jadów węży, z drugiej mogą mieć zastosowanie w wykorzystaniu składników badanych jadów jako środków antybiotycznych, fungicydów czy też leków przeciwnowotworowych. Należy docenić również fakt, że tematyka badawcza osiągnięcia naukowego jest własną tematyką Habilitantki, niepowiązaną bezpośrednio z Jej pracą doktorską. Podsumowując, uznaję, że przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe dr Aleksandry Bocian wnosi istotny wkład do rozwoju uprawianej przez Habilitantkę dyscypliny nauk biologicznych.

4. Pozostały dorobek naukowy

Pozostały dorobek naukowy dr Aleksandry Bocian obejmuje łącznie 12 publikacji, które ukazały się w czasopiśmie z bazy JCR, z czego cztery prace ukazały się przed uzyskaniem przez Kandydatkę stopnia doktora. Do dorobku dr Aleksandry Bocian zalicza się też dziewięć monografii i publikacji, które ukazały się w czasopiśmie spoza bazy JCR. Wszystkie z publikacji z bazy JCR to prace wieloautorskie. W siedmiu z tych prac dr Aleksandra Bocian jest pierwszym autorem, w tym w trzech równocześnie autorem do korespondencji, co świadczy o Jej wiodącym udziale w powstawaniu tych publikacji. Prace spoza osiągnięcia naukowego opublikowano w czasopiśmie specjalistycznych, wśród których według ich współczynnika oddziaływania IF (0.6-4.5) znalazły się czasopiisma zarówno o stosunkowo słabej, przeciętnej, jak i dobrej renomie.

Jeśli chodzi o prace, które ukazały się przed uzyskaniem stopnia doktora to tematyka dwóch z nich powiązana jest pracą magisterską dr Aleksandry Bocian i dotyczy badań pyłku kwiatowego. Dwie pozostałe powiązane są z pracą doktorską Kandydatki i skupiają się na analizach proteomicznych traw podczas ich hartowania na mróz. Z zagadnieniem odporności traw na niskie temperatury powiązana jest też jedna z publikacji, która ukazała się już po uzyskaniu stopnia doktora. Praca ta dotyczy analiz metabolitów w liniach zycicy trwałe o różnym stopniu odporności na mróz.

Trzy spośród publikacji, które ukazały się po uzyskaniu stopnia doktora są ściśle powiązane z tematyką ocenianego osiągnięcia naukowego. Dwie z nich to prace eksperymentalne dotyczące analiz proteomicznych jądów węży, trzecia to publikacja przeglądowa opisująca właściwości antybakteryjne składników jądów. Są to prace, w których dr Aleksandra Bocian jest zarówno pierwszym autorem jak i autorem do korespondencji. Potwierdza to jednoznacznie, że ta tematyka badań stanowi główny nurt badań naukowych Habilitantki. Dwie z pozostałych publikacji, które nie weszły w skład osiągnięcia naukowego dotyczą izolacji oraz analiz białek obecnych w miodach. Kolejna opisuje zmiany w akumulacji białek w bakterii *Enterococcus faecalis* wywołane ekspozycją na akrylamid. Analizy te prowadzone były ze względu na zdolność badanego szczepu *E. faecalis* do degradowania tej szkodliwej substancji chemicznej. W ostatniej z publikacji opisano zmiany w akumulacji białek zachodzące u kozieradki lekarskiej podczas odpowiedzi na ester metylowy kwasu jasmonowego (hormon roślinny) i na cholesterol.

Jeśli chodzi o parametry bibliometryczne to łączna liczba cytowań wszystkich publikacji dr Aleksandry Bocian według bazy Web of Science wynosiła w czasie przygotowania autoreferatu 232 (bez autocytowań 193) natomiast Jej indeks Hirsha to 7. Biorąc pod uwagę całkowitą ilość publikacji oraz łączne parametry bibliometryczne cały dorobek publikacyjny dr Bocian, podobnie jak publikacje wchodzące w skład Jej osiągnięcia naukowego, można ocenić jako w miarę bogaty i dostrzeżony przez innych naukowców.

Podsumowując, dorobek naukowy, który nie wszedł w skład osiągnięcia naukowego potwierdza, że głównym nurtem badawczym Kandydatki jest analiza jakościowo i funkcjonalna jądów węży. Na podstawie

całego dorobku widać też wyraźnie, że ekspertyza Habilitantki w technikach laboratoryjnych dotyczy głównie analizy białek i metabolitów, w szczególności przy użyciu metod spektrometrii mas.

5. Udział w projektach badawczych i współpraca naukowa.

Według dostarczonych dokumentów podczas swojej kariery naukowej dr Aleksandra Bocian kierowała jednym projektem badawczym, którym była MINIATURA finansowana przez Narodowe Centrum Nauki (lata 2018-2019). Należy jednak zauważyć, że w klasyfikacji NCN MINIATURA nie ma rangi samodzielnego projektu badawczego, a jedynie zadania badawczego. Z drugiej strony należy docenić, że wyniki uzyskane podczas realizacji tego zadania badawczego przyczyniły się do powstania trzech publikacji (AB3, AB6, AB7), podczas gdy NCN nie wymaga publikowania wyników MINIATURY do jej rozliczenia. W roku 2021, dr Aleksandra Bocian była liderem krótkiego (okres realizacji dziewięć miesięcy), finansowanego przez Regionalny Program Operacyjny projektu badawczo-rozwojowego dotyczącego poszukiwania alternatywnego źródła fosfolipaz dla przemysłu spożywczego. Habilitantka brała też udział jako wykonawca w dwóch projektach finansowanych przez MNiSW (lata 2006-2009 i 2007-2011), które dotyczyły aklimatyzacji traw do niskich temperatur. W latach 2014-2015 była wykonawcą w finansowanym w ramach Regionalnego Systemu Innowacji projekcie skupiającym się na wykorzystaniu narzędzi molekularnych i proteomicznych w poszukiwaniu enzymów o potencjale biotechnologicznym. Dr Aleksandra Bocian brała też udział w realizacji dwóch projektów finansowanych przez Słowacką Agencję Badań i Rozwoju, których tematyką była proteomiczne i funkcjonalne analizy jadów węży.

Dr. Aleksandra Bocian była i jest nadal zaangażowana we współpracę naukowe krajowe i zagraniczne. Najważniejszą z nich jest trwająca od 2017 roku współpraca z prof. Jaroslavem Legáth z Uniwersytetu Medycyny Weterynaryjnej i Farmacji w Koszycach (Słowacja). Współpraca ta jest podstawą własnego programu badawczego Kandydatki nad składem i właściwościami jadów węży a jej wynikiem jest łącznie dziewięć publikacji eksperymentalnych, w tym siedem, które stanowią omawiane osiągnięcie naukowe. W tematyce funkcjonalnej analizy jadu węży dr Aleksandra Bocian współpracuje również z dr hab. Maciejem Wnukiem z Katedry Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego. Ta współpraca udokumentowana jest dwiema opublikowanymi pracami. Badania dr Aleksandry Bocian nad jadami węży wsparte są również współpracą z dr hab. Moniką Pietrowską z Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach, która przyczyniła się do powstanie jednej z publikacji wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego. Istotna dla pracy badawczej Habilitantki była też współpraca z dr Łukaszem Marczakiem z Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, który jest ekspertem w dziedzinie analiz proteomicznych i metabolomicznych z wykorzystaniem spektrometrii mas. Współpraca ta zaowocowała jak do tej pory dwiema wspólnymi publikacjami. Dr Aleksandra Bocian współpracuje też z dr hab. Małgorzatą Dżugan i z dr inż. Michałem Miłkiem z Katedry Chemii i Toksykologii Żywności Uniwersytetu Rzeszowskiego. Współpraca ta dotyczy proteomicznych analiz żywności, w szczególności miodów, i jest udokumentowana dwiema

publikacjami zamieszczonymi w wykazie osiągnięć naukowych. Dodatkowo, Habilitantka jest zaangażowana z prof. Andrzejem Polańskim z Politechniki Śląskiej we wspólne badania dotyczącą sekwencjonowania genomów węży, które jak do tej pory nie zaowocowały wspólną publikacją. Podsumowując, Kandydatka prowadzi dość rozległe współprace naukowe. Należy również zaznaczyć, że w przypadku większości z nich Jej pozycja na listach autorów odpowiednich publikacji wskazuje na Jej istotną lub nawet wiodącą rolę w prowadzonych badaniach.

6. Osiągnięcia dydaktyczne popularyzatorskie i organizacyjne.

Ze względu na zatrudnienie na Politechnice Rzeszowskiej dr Aleksandry Bocian posiada bogaty dorobek dydaktyczny. Od 2011 prowadziła wykłady oraz zajęcia laboratoryjne lub ćwiczenia z ośmiu przedmiotów: Genetyki, Inżynierii białek, Enzymologii, Biochemii, Technik immunologicznych w biotechnologii, Metod analizy w biologii molekularnej, Proteomicznych techniki diagnostycznych oraz Terapeutycznych białek i peptydów. Do tej pory Habilitantka była opiekunem i promotorem 26 prac dyplomowych inżynierskich i 18 prac magisterskich. Jest też promotorem pomocniczym jednej rozprawy doktorskiej.

Z osiągnięć organizacyjnych wymienić należy współdziałanie w organizacji trzech konferencji naukowych jak również reprezentowanie Polski w Komitecie Zarządzającym akcji COST „European Venom Network”. Na uwagę zasługuje też fakt, że dr Aleksandra Bocian należy do paneli recenzentów w czasopiśmie *Toxins i Animals* oraz bierze udział w recenzowaniu manuskryptów nadsyłanych do redakcji innych czasopism z listy JRC. Jak do tej pory łącznie zrecenzowała 26 manuskryptów. Ogólnie pozytywnie należy ocenić zaangażowanie Habilitantki we współpracę z komitetami redakcyjnymi czasopism naukowych.

7. Konkluzja

Stwierdzam, że przedstawione mi do oceny osiągnięcia naukowe oraz pozostała aktywność naukowa dr Aleksandry Bocian przyczyniły się istotnie do rozwoju dyscypliny nauk biologicznych spełniając wymogi stawiane w ustawie z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018. 1668). W związku z tym pozytywnie opiniuję wniosek o nadanie dr Aleksandrze Bocian stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Poznań 24.04.2022

