



Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek
Pracownia Neurobiologii Molekularnej
Centrum Neurobiologii
Tel. +48 22 5892209
Email: b.kaminska@nencki.edu.pl

Warszawa, 06.02.2022

Ocena osiągnięcia naukowego, osiągnięć naukowo-badawczych i aktywności naukowej oraz dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego doktor Aleksandry Bocian

Wykorzystanie narzędzi proteomicznych do analizy białek wchodzących w skład jadu kobr z rodzaju *Naja* i funkcjonalna analiza ich właściwości

w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego

Ocena formalna

Jako osiągnięcie naukowe dr Aleksandra Bocian z Katedry Biotechnologii i Bioinformatyki, Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej zgłosiła cykl 7 spójnych tematycznie publikacji pod zbiorczym tytułem: **Wykorzystanie narzędzi proteomicznych do analizy białek wchodzących w skład jadu kobr z rodzaju *Naja* i funkcjonalna analiza ich właściwości** opublikowanych w latach 2018-2021. W pracach zgłoszonych jako osiągnięcie naukowe dr Bocian jest wiodącym autorem w 5 z nich, w 3 publikacjach jest autorem korespondencyjnym. Wzmiankowane prace opublikowała w latach 2018-2021 w czasopismach z listy JCR, w czasopismach specjalistycznych o niskim współczynniku oddziaływania [IF] (3x *Molecules*, *Biomolecules*, *Animals*, *J Cell Physiol*, *Toxins*). Sześć z tych prac opublikowano w czasopismach grupy MDPI z płatnym open access.

Otrzymane materiały w języku polskim i angielskim są wyczerpujące i starannie przygotowane, zawierają autoreferat; informację o przebiegu kariery, dorobku naukowym, dydaktycznym, wdrożeniowym i popularyzatorskim; wykaz opublikowanych przez dr A. Bocian prac. Dr Bocian precyzyjnie określa swój udział w powstaniu publikacji, a oświadczenia współautorów wieloautorskich publikacji zgłoszonych do habilitacji, dokładnie określają ich udział. Jak policzyć wykonane czynności różnych osób (zebranie materiału, testy aktywności na komórkach i bakteriach) to ich udział jest bardzo znaczący, ale ponieważ dr Bocian jest pierwszym/korespondującym autorem większości z publikacji, jej wiodąca rola w pozyskaniu finansowania i realizacji projektów jest dobrze udokumentowana. Przedstawione materiały pozwalają określić udział kandydatki w przygotowywaniu publikacji będących jej osiągnięciem naukowym jako wiodącej.

Ocena kariery naukowej i aktywności naukowej dr Aleksandry Bocian.

Kariera dr Bocian jest typowa, z pewną mobilnością w ramach Polski, ale bez zagranicznego stażu naukowego. Dr A. Bocian ukończyła studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (UAM), gdzie od 2003 r. realizowała badania w Pracowni Cytogenetyki Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu pod kierunkiem dr. Andrzeja Kalinowskiego nad zjawiskiem samoniezgodności u traw pastewnych oraz prowadziła analizy proteomiczne pyłku krwawnicy pospolitej. Od 2006 r. była na studiach doktoranckich w Instytucie Genetyki Roślin PAN na Wydziale Biologii UAM, zajmując się odpowiedzią gatunków traw kompleksu *Lolium-Festuca* na stres niskiej temperatury pod opieką prof. dr. hab. Zbigniewa Zwierzykowskiego. W trakcie studiów doktoranckich odbyła dwa staże naukowe: w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (1 mies.), gdzie badała mrozoodporność u traw pastewnych i w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (pod kierunkiem dr. Łukasza Marcza), gdzie nauczyła się podstaw spektrometrii mas i przeprowadzała analizy białek metabolitów na MALDI ToF i LC-MS (2x 3 mies.). Ma za sobą 6 mies. staż w Ośrodku Badawczo-Rozwojowym Olimp laboratories. W 2017 odbyła 1 mies. staż na Uniwersytecie Medycyny Weterynaryjnej i Farmacji w Koszycach. W 2012 r. uzyskała stopień doktora nauk



rolniczych, dyscyplina agronomia (z wyróżnieniem) za rozprawą doktorską pt. „Analiza akumulacji wybranych białek i metabolitów pierwotnych u życicy trwałej (*Lolium perenne* L.) podczas hartowania na mróz” przyznany przez Radę Naukową Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Od sierpnia 2011 do grudnia 2019 była zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Biotechnologii i Bioinformatyki Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowska, a od grudnia 2019 jest profesorem uczelni.

Ocena osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie składa się z cyklu 7 publikacji o spójnej tematyce prezentującej analizy składu białek jadu kobr z rodzaju *Naja* za pomocą elektroforezy dwukierunkowej lub frakcjonowania technikami filtracyjnymi i spektrometrii masowej MALDI ToF/ToF oraz LC-MS/MS. Badano także właściwości przeciwbakteryjne i cytotoksyczne frakcji z jadu oraz wpływ całego jadu (crude extract) na komórki ludzkie (fibroblasty). Prace są motywowane głównie tym, że składu tego konkretnego jadu i jego działania nie zbadano wcześniej.

W pracy Hus KK, Buczkowicz J, Petrilla V, Petrillová M, Łyskowski A, Legáth J, **Bocian A. First Look at the Venom of Naja ashei. *Molecules***. 2018 Mar 8;23(3):609 dotyczy określenia proteomu jadu *Naja ashei* (afrykańskiej kobry plującej) za pomocą elektroforezy 2-D oraz spektrometrii masowej MALDI ToF/ToF. Jest to właściwie komunikat zawierający 2 ryciny i tabelę z uzyskanych wyników (widok żelu 2-D i % dystrybucji białek w badanym protomie). Głównymi składnikami jadu były 3FTxs (toksyny trójpalcowe) i PLA (fosfolipazy A₂), bogate w cysteinę białka jadowych, 5'-nukleotydyazy i metaloproteiny. Wykazano w jadzie *N. ashei* obecność białka nieopisanego wcześniej w innych afrykańskich kobry: czynnika jadu kobry i czynnika wzrostu nerwów. Jak przyznaje autorka jedyną motywacją był fakt, że jad tych węży nie był wcześniej badany, choć jad blisko setki węży był już wcześniej opisany.

Praca **Hus i wsp. (2020) Different Research Approaches in Unraveling the Venom Proteome of Naja ashei. *Biomolecules*, 10(9), 1282**. Jest to praca metodyczna, w zasadzie powtórzenie tego co było zrobione w pierwszej pracy, tyle że bez elektroforezy, tylko od razu analiza LC-MS z analizatorem orbitrap. Dzięki bardziej złożonemu oprogramowaniu pokazano obecność większej liczby białek i lepiej przypisano je do rodzin, ale potwierdzono głównie obecność tych samych białek, co wykryte poprzednim badaniem, tylko stwierdzono różnice ilościowe. Porównano proporcje białek uzyskiwanych za pomocą różnych metod. Wykazanie, że shotgun LC-MS/MS proteomics z MaxQuant daje lepsze wyniki niż ilościowa elektroforeza 2 wymiarowa, jest trywialne.

Praca **Bocian i wsp. Comparison of Methods for Measuring Protein Concentration in Venom Samples. *Animals*** (Basel, MDPI) 2020 Mar; 10(3): 448 jest w istocie krótkim komunikatem zawierającym roboczą tabelę z pomiarem białek w jadzie z 2 gatunków 5 różnymi, ale standardowymi metodami, pokazującą dane w poszczególnych replikatach oraz wizualizację średnich z tych pomiarów na wykresie. Jak pisze autorka 4 z tych metod były używane rutynowo do pomiaru całkowitego białka w jadzie węży, tylko Qubit® Protein Assay Kit nie był wcześniej do tego celu używany. Mimo iż zawartość merytoryczna jest mizerna (w istocie jeden wynik porównujący znane metody), najbardziej obszerną częścią jest dyskusja zawierająca szczegółowe opisy poszczególnych metod, w tym znanej od dziesięcioleci metody Bradford. Autorka rozpisuje się, jakie mogą trudności w ocenie białek, jeśli trudno oznaczyć całkowite białko. Autorzy przypisują trudności w ocenie całkowitego białka niepowodzenie w uzyskaniu dobrze rozdzielonych i zoptymalizowanych żeli dla gatunków z rodzaju *Naja* i *Dendroaspis*, a że zmiłami nie mieli problemów. Głównie chodzi chyba o możliwość zacytowania własnych prac, bo zawartość merytoryczna i intelektualna jest bardzo mizerna. Biorąc pod uwagę, że w pracy jest 9 autorów, a zebrany jad węży mógł pochodzić z poprzednio zebranych próbek, trudno zrozumieć, jaki był udział poszczególnych osób. Tak naprawdę to te 3 prace mogłyby być jedną i może wtedy zwróciłyby czyjąś uwagę.

Ciekawe wyniki przedstawia praca 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. 2-D elektroforezę i MALDI ToF/ToF zastosowano



do identyfikacji białek i wykazano pewne odmienności składu białkowego U *N. melanoleuca* stwierdzono wyższą zawartość PLA2, LAAO i SVMP ale niższą zawartość białek 3FTx w porównaniu z *N. siamensis*. U *N. siamensis* charakterystyczna była wysoka zawartość białka thaicobrin, reprezentującego grupę białek ohanino/vespryno-podobnych. jad *A. contortrix* pozbawiony jest nieenzymatycznych białek 3FTx, natomiast bogaty jest w trzy grupy enzymów: fosfolipazy A2, proteazy serynowe oraz metaloproteiny. Uzyskano ciekawe wyniki pokazujące, że jad niektórych węży ma właściwości hamowania proliferacji i indukowania śmierci apoptotycznej w ludzkich fibroblastach. Zbadano różne mechanizmy uczestniczące w działaniu antyproliferacyjnym (stres komórkowy, ścieżki sygnałowe, migrację komórek). uszkodzenia DNA. Jest to przynosząca ciekawe wyniki praca, rozbudowana metodycznie (także o badania transkryptomyczne), pokazująca, że można zrobić bardzo porządne badania w tej dziedzinie. Zdecydowanie najciekawsza praca w dorobku kandydatki, szkoda że zrobiona głównie przez inne osoby, które opracowały koncepcję i wykonały większość badań. Praca byłaby ważniejsza gdyby zbadano wpływ poszczególnych białek lub frakcji, aby zaproponować, które białka są odpowiedzialne za efekt.

Praca Bocian i wsp. **Antimicrobial Activity of Protein Fraction from *Naja ashei* Venom against *Staphylococcus epidermidis*. *Molecules* (MDPI) 2020 Jan; 25(2): 293.** Zbadano jad pod kątem właściwości przeciwbakteryjnych i odkryto, że specyficzna kompozycja białek może eliminować bakterie i hamować biofilm. Zastosowano chromatografię jonowymienną (IEX), aby uzyskać 10 frakcji białek z jadu *Naja ashei*, które następnie przetestowano na certyfikowanych, klinicznych szczepach *S. epidermidis*, zarówno bakterii, jak i całego biofilmu *Staphylococcus epidermidis*. Jedna z frakcji (F2) wykazała działanie przeciwdrobnoustrojowe samodzielnie i w połączeniu z antybiotykami. Skład białkowy otrzymanych frakcji oznaczono MS i stwierdzono we frakcji F2 obecność fosfolipaz A2, toksyn trójpalcowych i oksydaz L-aminokwasów, które mogły odpowiadać za właściwości tej frakcji. Zidentyfikowano nową grupę białek o zawierających domenę Ig-podobną, która nie była wcześniej opisana w jadzie węża. Pierwsze 3 ryciny pokazują chromatogram, % białek we każdej z 10 frakcji i obraz na żelu SDS-PAGE. Takie dane mogły się znaleźć w jednej rycinie, a tak naprawdę powielają informację z poprzednich prac, w których wykonano identyczne analizy jadu *Naja ashei*. Prezentacja danych ilościowych pokazujących wpływ F2 w połączeniu z antybiotykami nie zawiera statystycznej analizy wyników. Tylko kolejna rycina pokazująca wpływ F2 na biofilm *S. epidermidis* (ATCC 35984) i szczepy kliniczne (2346, 2452, 2702) jest przygotowana poprawnie ze statystyką i jest w pełni przekonująca. Niepokojące jest to, że nie ma w tych doświadczeniach prawidłowej kontroli (eluatu z frakcjonowania), wyniki są porównywane do bakterii nietraktowanych. Frakcja F2 w stężeniu 4,6 µg/ml hamowała tworzenie się biofilmu w 79,02%-96,91%, czyli nie był to do końca efekt zależny od stężenia i mógł wynikać w wysokim stężeniu soli/innych elementów zebranych z IEX. Podsumowując, tylko ta część pracy (Fig.5-8 mogły zostać połączone) zawiera potencjalnie ciekawy i oryginalny wynik, o ile jest on poprawny. Nie bardzo rozumiem, jak można było przyjąć pracę bez właściwej kontroli.

Praca Bocian i Hus (2020) **Antibacterial properties of snake venom components** *Chemical Papers* 74: 407–419 (2020) jest pracą przeglądową, która podsumowuje informacje o przeciwbakteryjnym działaniu składników jadu węży. Bakteriobójcze właściwości przypisuje się na białkom takim jak fosfolipazy A2 (PLA2) i oksydazy l-aminokwasów (LAAO) oraz fragmentom tych enzymów. Autorzy referują wyniki własnych badań wskazujące, że fragmenty toksyn trójpalcowych (3FTx) są bakteriobójcze oraz innych badań pokazujących, że niektóre węże wytwarzają peptydy przeciwbakteryjne homologiczne do ludzkich defensyn i katelicyn. Przeglądówka jest dobrze napisana i zawiera szereg interesujących informacji. Jednakże tabela 1 zawiera informacje o dziesiątkach badań pokazujących przeciwbakteryjne działanie jadu różnych węży wobec różnych szczepów bakterii, w tym węży z rodzaju *Naja sp.* Tak duża liczba prac pokazujących, że wiele węży wytwarza substancje/peptydy przeciwbakteryjne, pokazuje brak oryginalności wyników uzyskanych przez Dr Bocian. Zwraca też uwagę, że już kilkanaście lat temu wykonywano bardziej szczegółową identyfikację składników jadu o właściwościach bakteriobójczych i testowano poszczególne



aktywne składniki. W tym kontekście testowanie pojedynczej frakcji z IEX, bez wyodrębnienia elementu aktywnego, jest poniżej obecnych standardów w tej dziedzinie.

Ogólnie zestaw przedstawionych prac ma charakter opisowy, niewielką oryginalność (wynika ona głównie z faktu, że zbadano jeden z setek jądów węży) i zawartość merytoryczną, gdyż wykorzystuje standardowe metody i potwierdza fakty dobrze znane z innych badań jadu węży. Poszczególne wyniki są rozdrobnione i pojawiają się w kolejnych publikacjach, mimo iż nie wnoszą nic nowego (w kolejnych pracach powinny być zapewne w suplemencie). Do niektórych prac można mieć też zastrzeżenia metodologiczne (brak kontroli w doświadczeniach z frakcjami na koloniach bakteryjnych, brak analizy statystycznej niektórych ilościowych wyników). W pięciu pracach dr Bocian jest autorem korespondencyjnym. We wszystkich pracach swój udział definiuje jako zaangażowanie we frakcjonowanie białek i analizy wyników proteomicznych. Sądząc po oświadczeniach współautorów, większość badań na komórkach, pozyskiwanie jadu i analizy aktywności przeciwbakteryjnej było wykonane przez innych współautorów, ale trzeba jej zapisać na plus, że potrafiła zorganizować pracę innych badaczy i przekonać do udziału w swoim projekcie. Na tym tle wysoką jakością wybija się publikacja Lewinska i wsp. *Snake venoms promote stress induced senescence in human fibroblasts. Journal of Cell Physiology 234(5), 6147-6160.*

Całościowy dorobek.

Przed doktoratem Dr Bocian wykorzystywała techniki elektroforezy dwukierunkowej do badania składu białkowego różnych roślin poddanych działaniu stresu środowiskowego. Po doktoracie Dr Bocian wykorzystywała techniki elektroforezy dwukierunkowej lub frakcjonowania technikami filtracyjnymi i spektrometrii masowej w wielu pracach badając proteom lub peptydom, skład białkowy miodu, jadu innych węży lub różnych organizmów. Np. 2 prace opublikowane w *Molecules* dotyczą analizy białka z miodu i potem bardziej dokładnej analizy miodu. Większość prac, w których dr Bocian jest pierwszym autorem, jest podobna metodycznie i koncepcyjnie, ma charakter przyczynkowski i opisowy. Po doktoracie była też współautorką 5 przeglądówek.

Prace naukowe (niektóre mają charakter komunikatów) zarówno wcześniejsze jak i te prezentowane jako osiągnięcia opublikowano w średniej lub słabej jakości czasopismach, są bardzo słabo cytowane i praktycznie niezauważone przez środowisko naukowe. Rozumiem, że kwestia składu jadu węży jest trochę niszowa i stąd może niska cytowalność, ale niektóre prace dr Bocian są bardziej zawansowane i zwłaszcza te dotyczące działania przeciwbakteryjnego są potencjalnie ciekawe i dotyczą nośnej problematyki o potencjale klinicznym, więc gdyby były dobre, zyskałyby lepszy oddźwięk. Widać w jej dorobku pewien wzór tzn. publikowanie wyników wstępnych i potem rozwinięcie tematu w bardziej rozbudowanej formie. Niektóre prace są w rzeczywistości komunikatami, składającymi się z 2 figur i 1 tabeli, w których najbardziej rozbudowana jest zawsze dyskusja, w której parę uzyskanych wyników porównuje się z rozległą literaturą tematu. Nawet zakładając, że prace opublikowano stosunkowo niedawno, cytowalność jest słaba, świadczący o braku zainteresowania tymi wynikami.

Ocena działalności organizacyjnej i dydaktycznej

Dr Bocian ma pewne doświadczenie w realizacji projektów badawczych: jako doktorantka była zaangażowana w realizacji dwóch projektów badawczych MNiSW. Pierwszy, poświęcony był zmianom akumulacji białek w trakcie hartowania na mróz u *Festuca pratensis*, drugi – tym samym zagadnieniem u *Lolium perenne*. Była też kierownikiem własnego projektu Miniatura NCN i liderem w projekcie B+R w ramach „Podkarpackiego Centrum Innowacji”. Uczestniczyła jako wykonawca w kilku projektach naukowych finansowanych ze źródeł krajowych MNiSW, projekcie zamawianym MNiSW. Była członkiem komitetów organizacyjnych lokalnych konferencji. Należy do 3 specjalistycznych Towarzystw naukowych. Jako doktorantka uczestniczyła z posterami w licznych konferencjach, głównie krajowych, nie ma jednak w dorobku wystąpień konferencyjnych. Jest członkiem COST European Venom Network. Utrzymuje cenne współprace w ośrodkami, w których odbywała staże. Pod tym względem jej aktywność



oceniam pozytywnie, a zdolność do inicjowania współpracy wysoko. Wykonywała ekspertyzy na zlecenie firmy Olimp w zakresie proteomiki i analizy próbek. Na Politechnice Rzeszowskiej była członkiem różnych komisji do oceny dorobku, Rady dyscypliny, Rady Wydziału, co świadczy o sporym zaangażowaniu w działania organizacyjne na Uczelni. Angażowała się w działania promocji nauki. Uczestniczyła intensywnie w działalności dydaktycznej prowadząc zajęcia dla studentów i brała udział w specjalistycznych programach dydaktycznych POWR, POKL. Była opiekunem i promotorem licznych prac inżynierskich i magisterskich. Jest promotorem pomocniczym w jednym przewodzie doktorskim.

Podsumowując, była samodzielnym kierownikiem grantu Miniatura, więc ma doświadczenie w kierowaniu projektem, jest członkiem międzynarodowego konsorcjum COST i chociaż nie idą za tym znaczące wystąpienia na konferencjach naukowych, Kandydatka wykazuje pożądaną aktywność. Dr Bocian znacząco angażuje się w dydaktykę, promocję nauki, ma też sporo obowiązków dydaktycznych i organizacyjnych na uczelni macierzystej.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Na podstawie oceny dokumentacji szczególnego osiągnięcia naukowego (w znaczeniu artykułu 219 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm) i pozostałej aktywności naukowej, stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego, a także dorobku dydaktycznego oraz współpracy międzynarodowej, oceniam całokształt dorobku naukowego dr Aleksandry Bocian pozytywnie, choć niezbyt wysoko, jeśli chodzi o oryginalność podjętego tematu, standardy metodyczne i ważność uzyskanych wyników. Cykl publikacji zgłoszony jako rozprawa stanowi oryginalny, ale mało nowatorski i niezbyt ważny wkład do naszej wiedzy i do rozwoju nauki, choć są to najlepsze prace w dorobku kandydatki. Dr Bocian jest współautorką kilkunastu prac badawczych i przeglądowych z listy JCR, są to w większości prace opublikowane w średnich lub słabych czasopismach naukowych. Liczba cytowań prac (194, IH=7) jest niska i wskazuje na niewielkie zainteresowanie pracami.

Prace dr Bocian poszerzają, ale w ograniczonym zakresie pogłębiają naszą wiedzę. Większość prac w jej dorobku ma charakter przyczynkarski, nie wzbudza zainteresowania środowiska, nie była zapraszana do wygłoszenia referatów na ważnych konferencjach krajowych i zagranicznych, nie uzyskała żadnych znaczących grantów (poza Miniaturą) i stypendiów. Wyniki badań dr Bocian nie mają znaczenia praktycznego, gdyż nie ma danych, aby frakcje jadu przeszły do fazy testów na zwierzętach, a tym bardziej do badań klinicznych lub stały się podstawą patentu i wzbudziły zainteresowanie firm, mimo iż potencjalnie mogłyby mieć ze względu na działania przeciwbakteryjne. Jednakże wiodący udział w pracach, zdobycie na nie funduszy i umiejętność organizacja badań we współpracy, wskazują na niezależność i zdolność zdefiniowania problemu biologicznego, który chce rozwiązać.

Całościowy dorobek dr Aleksandry Bocian stanowi pewien wkład do rozwoju nauki i odpowiada kryteriom stawianym przy ubieganiu się o stopień doktora habilitowanego określonym w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm). Z wyżej wymienionych powodów rekomenduję Radzie Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wsparcie wniosku o nadanie dr Aleksandry Bocian stopnia doktora habilitowanego.

Z poważaniem


Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek