

## Recenzja

**dorobku naukowego, w tym osiągnięcia naukowego będącego podstawą do wnioskowania o stopień naukowy doktora habilitowanego oraz działalności dydaktycznej i organizacyjnej dr nauk chemicznych Joanny Perły-Kaján.**

### 1. Dane biograficzne

Pani dr n. chem. Joanna Perła-Kaján uzyskała tytuł zawodowy magistra biologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w roku 2001. W latach 2001-2006 odbywała studia doktoranckie w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, co zaowocowało uzyskaniem stopnia doktora nauk chemicznych na podstawie pracy pt.: "Wpływ N-homocysteinylicacji na strukturę i funkcję białek człowieka", której kopromotorami byli prof. dr hab. Hieronim Jakubowski oraz prof. dr hab. Tomasz Twardowski. W latach 2006-2014 była zatrudniona w stanowisku starszego referenta technicznego w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, w okresie 2015-2017 na etacie specjalisty, a od 2017 do chwili obecnej na stanowisku adiunkta w tej samej Katedrze.

Pani dr Joanna Perła-Kaján odbyła w okresie 08.05.2003-24.10.2003 staż naukowy w Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey Medical School (obecnie New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Rutgers University), Newark, USA, gdzie prowadziła badania prowadzone pod kierunkiem prof. dr hab. Hieronima Jakubowskiego. Natomiast w okresie 01.12.2007-31.03.2009 była zatrudniona jako tzw. post-doc w tej samej jednostce w ramach projektu finansowanego przez National Institutes of Health, pracując nad opracowaniem metody niskobudżetowego sekwencjonowania genomu człowieka z wykorzystaniem tRNA pod kierunkiem prof. dr hab. Włodka Mandeck'a. Oba staże zaowocowały sumarycznie opublikowaniem 3 prac w renomowanych czasopismach naukowych, w których była pierwszym (dwukrotnie) lub drugim autorem.

Habilitantka pełniła funkcję recenzenta 40 artykułów naukowych w większości czasopismach o wysokim współczynniku wpływu, np. Amino Acids (Springer), Redox Reports (Taylor&Francis), Scientific Reports (Springer Nature) czy Metabolites, Cancers, Antioxidants, Pharmaceuticals (wszystkie: MDPI).

Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Z obowiązków recenzenta należy wspomnieć, że Pani dr Joanna Perła-Kaján w okresie 05.05.2009-21.09.2009 oraz 22.10.2010-31.08.2012 przebywała na urlopie macierzyńskim.

### 2. Ocena dorobku naukowego

Dorobek naukowy Pani dr n. chem. Joanny Perły-Kaján jest spójny w tym sensie, że koncentruje się wokół badań nad N-homocysteinylicacją, obejmując zarówno metody oznaczania przeciwciał przeciwko N-homocysteinyłowanym białkom jak i badania funkcji czy implikacji wynikających z N-homocysteinylicacji białek w różnych tkankach pochodzących z różnych organizmów. Tematyka ta podjęta w ramach rozprawy doktorskiej była przez Habilitantkę kontynuowana i zaowocowała m.in. cyklem oryginalnych publikacji naukowych przedstawionych w recenzowanej rozprawie habilitacyjnej.

Główne osiągnięcie naukowe dr n. chem. Joanny Perły-Kaján, które jest podstawą do wnioskowania o stopień naukowy doktora habilitowanego, składa się z cyklu siedmiu oryginalnych prac doświadczalnych i dwóch publikacji przeglądowych, opublikowanych w latach 2007-2021 o łącznym współczynniku oddziaływania **IF= 41.126** i punktacji **MNiSW/MEiN=431 pkt.**

Poza cyklem publikacji wybranych jako podstawę ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego znajduje się jeszcze 12 publikacji oryginalnych z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku wpływu **IF=57.145** i punktacji **MNiSW/MEiN=1101 pkt**. Natomiast przed uzyskaniem stopnia doktora Habilitantka opublikowała 4 prace o współczynniku wpływu **IF=11.209** i punktacji **MNiSW/MEiN=42 pkt**.

**Ocena parametryczna całego dorobku to IF=109.480 i punktacja MNiSW/MEiN=1474.**

Ponadto przed uzyskaniem stopnia doktora Pani dr n. chem. Joanna Perła-Kaján prezentowała 7 (3 wykłady=prezentacje ustne i 4 postery) prac na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Po uzyskaniu stopnia doktora Habilitantka wygłosiła 10 wykładów (tzw. prezentacje ustne) na konferencjach o zasięgu krajowym (3) i międzynarodowym (7) oraz przedstawiła 12 doniesień (posterów) na konferencjach zagranicznych oraz 6 na konferencjach krajowych.

Publikacje Pani dr n. chem. Joanny Perły-Kaján według zamieszczonej przez Habilitantkę analizy bibliometrycznej na dzień 17 grudnia 2022 roku były cytowane **810 razy** według Web of Science (865 wg Scopus), **indeks Hirscha** wynosił **11**.

Prace te wzbudzają zainteresowanie naukowców i są ciągle aktualne, bowiem całkowita liczba cytowań wzrosła ostatnio do **920** (wg Scopus - na dzień 19.10.2023).

Należy jednak podkreślić, że dane te pochodzą z informacji zamieszczonych w materiałach przedstawionych przez Habilitantkę i choć jak najbardziej znajdują odzwierciedlenie w różnych bazach danych, to jednak w przedstawionej dokumentacji brak zwyczajowo zamieszczonego spisu dorobku publikacyjnego uwiarygodnionego przez bibliotekę macierzystej Uczelni tj. Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

#### **a/działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora**

Pierwsze prace z autorstwem Habilitantki zostały opublikowane w zakresie tematyki związanej z pracą magisterską. Natomiast dalsza tematyka badawcza z tego okresu była powiązana z aktywnością w czasie odbywanych studiów doktoranckich, w ramach których prowadziła badania nad N-homocysteinylacją. Było to związane z badaniami rozwijanymi podczas stażu odbywanego w University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey Medical School (obecnie New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Rutgers University), Newark, USA, pod kierunkiem prof. dr. hab. Hieronima Jakubowskiego, gdzie zajmowała się izolacją i oczyszczeniem poliklonalnych przeciwciał specyficznych względem N-homocysteinylowanych białek. Znalazło to wyraz w przedstawionej rozprawie doktorskiej pt.: „Wpływ N-homocysteinylacji na strukturę i funkcję białek człowieka” (2006).

Wyniki tych badań zaowocowały opublikowaniem odpowiednich prac (np. Perła J, Undas A, Twardowski T, Jakubowski H. Purification of antibodies against N-homocysteinyllated proteins by affinity chromatography on Nomega-homocysteinyll-aminohexyl-Agarose. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;807(2):257-261 czy Undas A, Perła J, Lacinski M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinyllated proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke.* 2004;35(6):1299-1304) oraz uczestnictwem w krajowych i zagranicznych specjalistycznych konferencjach naukowych.

#### **b/ działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora**

Od 2006, tj. po otrzymaniu stopnia dr nauk chemicznych i rozpoczęciu pracy w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu Pani dr n. chem. Joanna Perła-Kaján prowadziła i uczestniczyła w szeregu badaniach z zakresu biochemii i biotechnologii. Do nich należą m.in. badania wykonywane w czasie stażu post-doc odbywanego w University of Medicine and Dentistry New Jersey Medical School (obecnie Rutgers University)

pod kierunkiem prof. dr Włodzimierza (Wlodek) Mandeckiego (2007-2009). W ramach projektu finansowanego przez National Institutes of Health, dotyczącego opracowania metody niskobudżetowego sekwencjonowania genomu człowieka z wykorzystaniem tRNA, zajmowała się wówczas optymalizowaniem metody FRET (ang. single-pair fluorescence resonance energy transfer), w której donorem był specyficzny aminoacylo-tRNA wyznakowany barwnikiem fluorescencyjnym, natomiast akceptorem czynnikiem elongacyjnym EF-Tu sprzężony z wygaszaczem. Zadaniem Habilitantki była nadprodukcja zmutowanych form EF-Tu w *E. coli*, ich izolacja, oczyszczenie i przetestowanie aktywności w celu wybrania najbardziej aktywnych i nadających się do wykorzystania w projekcie sekwencjonowania. Wyniki tych badań znacząco przyczyniły się do opracowania metody identyfikacji inhibitorów interakcji między EF-Tu i tRNA u bakterii, kluczowego etapu biosyntezy białka, co zaowocowało odpowiednią publikacją (Perla-Kaján J, Lin X, Cooperman BS, Goldman E, Jakubowski H, Knudsen CR, Mandecki W. Properties of Escherichia coli EF-Tu mutants designed for fluorescence resonance energy transfer from tRNA molecules. *Protein Eng Des Sel.* 2010; 23(3): 129-136).

Do badań, w których Habilitantka rozwijała tematykę prezentowaną w pracy doktorskiej należą np. badania nad reakcją N-homocysteinyłacji *in vivo* w modelu zwierzęcym. W badaniach tych zajmowała się m.in. określeniem preferencyjnej modyfikacji tiolaktonem Hcy reszt lizyny w pozycji 212 i 625 albumin myszy (m.in. z zastosowaniem zwierząt knockout), co zidentyfikowano jako zależne od płci zwierząt, zwłaszcza specyficzna dla płci była modyfikacja K212Hcy w albuminie, co może pełnić ważną funkcję biologiczną. W innych badaniach nad rolą homocysteiny Habilitantka uczestniczyła w określaniu roli niedoboru  $\beta$ -syntazy cystationiny (CBS), jako rzadkiej choroby genetycznej skutkującej m.in. silnie podwyższonym poziomem tiolaktonu homocysteiny. W badaniach tych założono, że u takich pacjentów może dochodzić do skrócenia długości życia, związanego ze skróceniem telomerów i liczby kopii mitochondrialnego DNA (mtDNA), jednak na podstawie szczegółowej analizy wykazano, że hipoteza ta znalazła odzwierciedlenia w rzeczywistym stanie pacjentów. Podobne badania, w których wzięła udział Habilitantka jako jeden z głównych wykonawców zostały przeprowadzone na myszach z deficytem CBS w których powiązано skrócenie życia zwierząt ze zmianą ekspresji wybranych markerów starzenia i poziomów mtDNA, ale nie skracaniem telomerów. Wyniki wspomnianych badań opublikowane w trzech publikacjach o łącznym IF=18.265, w których dr Joanna Perła-Kaján jest drugim autorem, co świadczy o jej istotnym wkładzie w powstawanie tych prac (Jakubowski H, Perla-Kaján J, et al. *FASEB J.* 2009; 23(6): 1721-1727; Utyro O, Perla-Kaján J, et al. *Free Radic Biol Med.* 2020; 160: 219-226; Utyro O, Perla-Kaján J, et al *Int J Mol Sci.* 2020; 21(7): 2520).

Do podobnych badań związanych z reakcją N-homocysteinyłacji, w których uczestniczyła Habilitantka, były prace nad określaniem roli modyfikacji białek przez tiolakton Hcy skutkującym powstawaniem specyficznych autoprzeciwciał. Hipotezą roboczą było założenie ich roli nie tylko w ryzyku wywołania udaru czy choroby niedokrwiennej serca, ale także powstawaniem łagodnych zaburzeń poznawczych (MCI), które jak wiadomo często towarzyszą chorobie Alzheimerera. W badaniach tych wykazano, że autoprzeciwciała przeciwko białku N-Hcy są nowym czynnikiem związanym z zaburzeniami funkcji poznawczych, które można złagodzić przy pomocy suplementacji witaminami z grupy B. Również w tych badaniach dr Joanna Perła-Kaján odegrała istotną rolę, co znalazło zamieszczenie jej jako drugiego autora w odpowiedniej publikacji o IF=4.33 (Włoczkowska O, Perla-Kaján J, et al. *Alzheimers Dement (N Y).* 2021;7(1): e12159).

Do istnych osiągnięć dr n. chem. Joanny Perły-Kaján należy grupa badań powiązanych z określeniem roli paraoksonazy 1 (enzymu hydrolizującego tiolakton homocysteiny) (PON1) jako czynnika predykcyjnego powstawania ryzyka udaru. Rola habilitantki jako głównego badacza w tych badaniach była związana z organizacją badań u pacjentów i ochotników oraz wykonywaniem

odpowiednich analiz biochemicznych. Wykazano na podstawie analizy proteomicznej, że istnieją różnice w poziomie białek osocza skorelowanych z aktywnością i genotypem PON1, a szczególnie, że polimorfizm PON1-Q192R u człowieka i indukowany genotyp Pon1-/- u myszy związane są z podobnymi zmianami w proteomie osocza, co w powiązaniu ze szlakami molekularnymi zaangażowanymi w metabolizm lipoprotein, reakcjami procesów zapalnych oraz związanych z krzepnięciem krwi może stanowić o wartości predykcyjnej PON1 jako ryzyka wystąpienia udaru. Wyniki badań zostały opublikowane w specjalistycznym czasopiśmie naukowym o IF=5.952 (Sikora M, Bretes E, Perla-Kaján J, et al. *Antioxidants* (Basel). 2020; 9(12): 1198).

Do ciekawych badań, w których brała udział Habilitantka jako główny badacz, była praca nad określaniem PON1 jako nowego czynnika związanego z zaburzeniami funkcji poznawczych u osób z MCI, zwłaszcza z demencją naczyniową. Stwierdzono, że aktywność arylesterazowa PON1 była istotnie związana z upośledzeniem funkcji poznawczych, pamięci epizodycznej i skupieniem uwagi. Ponadto wykazano, że suplementacja witaminami grupy B zniosła powiązanie PON1 z funkcjami poznawczymi u pacjentów, co świadczy, że PON1 może odgrywać rolę w ośrodkowym układzie nerwowym, co przedstawiono w pracy o IF=4.472, w której dr Joanna Perła-Kaján jest pierwszym autorem (Perla-Kaján J, et al. *J Alzheimers Dis*. 2021;81(3):1211-1229).

Inną grupą badań związanych z kondycją pacjentów z rozpoznaniem MCI, w których dr n. chem. Joanna Perła-Kaján miała istotny udział, była próba powiązania roli homocysteiny oraz stężeń takich pierwiastków jak żelazo, miedź, glin i krzem. Wykazano, że odmienny wpływ poziomu żelaza, miedzi, glinu, krzemu i homocysteiny w surowicy na funkcje poznawcze i atrofię mózgu u osób z MCI sugerują, iż upośledzenie funkcji poznawczych jest niezależne od atrofii mózgu u tych pacjentów. Również w tym przypadku wykazano pozytywne skutki suplementacji witaminami B (kwas foliowy, 0.8mg; witamina B12 - cyjanokobalamina, 0.5mg; witamina B6 – pirydoksyny HCl, 20mg) (Jakubowski H, Ziola-Frankowska A, Frankowski M, Perla-Kaján J. et al. *J Alzheimers Dis*. 2021;84(3):1039-1055).

Tak więc Habilitantka w okresie od otrzymaniu stopnia doktora uczestniczyła w licznych badaniach jako główny badacz, tym samym uczestnicząc **istotnie w licznych osiągnięciach naukowych** co znalazło wyraz w opublikowaniu, jak już wspomniałem wyżej, 12 prac oryginalnych z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku wpływu IF=57.145 i punktacji MNiSW/MEiN=1101 pkt. Prace te są ciągle cytowane, co świadczy ich wadze i oddźwięku jaki znajdują w międzynarodowej społeczności naukowej.

### **3. Ocena osiągnięcia naukowego będącego podstawą do wnioskowania o stopień naukowy doktora habilitowanego.**

Osiągnięcie naukowe będące podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego stanowi cykl publikacji pod wspólnym tytułem: **”Rola N-homocysteinylacji białek w patomechanizmie zaburzeń związanych z hiperhomocysteinemią i paraoksonazy 1 w ochronie przed N-homocysteinylacją”**. Cykl ten tworzy siedem oryginalnych prac doświadczalnych i dwie publikacje przeglądowe, opublikowane w latach 2007-2021 o łącznym współczynniku oddziaływania IF= 41.126 i punktacji MNiSW/MEiN=431 pkt.

Udział dr n. chem. Joanny Perły-Kaján w tych publikacjach był dominujący (we wszystkich pracach jest pierwszym autorem) i zgodnie z oświadczeniem obejmował zarówno koncepcję prac, projekty eksperymentów, wykonanie analiz, opracowanie wyników i ich interpretację, przygotowanie prac do druku i korespondencję z wydawnictwem w tym odpowiedź na recenzje (wg danych zamieszczonych w udostępnionych artykułach - w przypadku prac 1, 2, 5, 6, 9).

Wkład indywidualny Habilitantki w powstanie tych publikacji nie budzi zastrzeżeń i świadczy o Jej udziale jako lidera zespołu. Wyniki badań będące podstawą ubiegania się o stopień

doktora habilitowanego zostały opublikowane w takich czasopismach z Listy Filadelfijskiej jak: *Journal of Proteome Research*. 2021; *International Journal of Molecular Sciences* 2019; *FASEB Journal* 2018, 2016, 2010, *Amino Acids* 2012; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011; *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2008; *Biochemistry* 2007;

Homocysteina (Hcy) została po raz pierwszy opisana przez Butza i de Vigneauda w 1932 roku, a następnie zidentyfikowana w moczu dzieci z opóźnieniem umysłowym w 1962 roku. Kilka lat później rozpoznano defekt genetyczny metabolizmu Hcy prowadzący do homocystynurii. Późniejsze zainteresowania poszukiwania związków pomiędzy podwyższonym poziomem Hcy a chorobowością człowieka zaowocowały uznaniem Hcy jako czynnika ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych w populacji ogólnej, często powiązanych z miażdżycą naczyń. Obecnie postuluje się udział Hcy jako czynnika ryzyka w wielu innych schorzeniach dotyczących ośrodkowego układu nerwowego, chorób narządów wydalniczych, układu kostnego czy niektórych chorób nowotworowych. Wśród przyczyn hiperhomocysteinemii (HHcy) wymienia się genetycznie uwarunkowane zaburzenia metabolizmu homocysteiny, nadmiar białka zawierającego metioninę w diecie, niedobory witamin niezbędnych w procesach przemian tego aminokwasu, czynniki demograficzne oraz wpływ niektórych chorób i leków. Populacyjne badania genetyczne nie dały jednak jednoznacznych dowodów na to, że występowanie w obrębie genu dla MTHFR polimorfizmu 677C>T, który jest jedną z częstszych przyczyn HHcy, wiąże się także z rozwojem chorób sercowo-naczyniowych. Wiele zagadnień związanych z mechanizmem oddziaływania wysokich i podwyższonych Hcy np. na naczynia krwionośne nie jest jasna, a postulowana suplementacja witaminami z grupy B nie zawsze daje jednoznaczne korzystne wyniki.

Pani dr n. chem. Joanna Perła-Kaján wzięła pod uwagę w swoich badaniach jako przyczynę negatywnego oddziaływania HHcy powstawanie pod wpływem syntetazy Met-tRNA cyklicznego tioestru – tiolaktonu Hcy, który jak wykazał prof. dr hab. Hieronim Jakubowski, jeden z kopromotorów Jej pracy doktorskiej, wykazuje zdolność modyfikacji grup ε-aminowych reszt Lys białek w reakcji zwanej N-homocysteinylacją, w wyniku czego powstają N-homocysteinylowane białka (N-Hcy-białka).

Na tym tle podjęcie przez Habilitantkę badań nad przybliżeniem wiedzy związanej z mechanizmami włączonymi w reakcję N-homocysteinylacji jest interesujące i celowe. W recenzowanej pracy habilitacyjnej dr n. chem. Joanna Perła-Kaján skupiła się nad zbadaniem roli N-homocysteinylacji białek w patomechanizmie różnych zaburzeń chorobowych powiązanych z HHcy oraz pogłębienie wiedzy nad rolą jednego z enzymów należących do tiolaktonaz tj. paraoksonazy 1, mającą zdolność poprzez hydrolizę enzymatyczną do usuwania z organizmów tiolaktonu Hcy.

Cykl eksperymentów, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, dotyczył wykazania obecności N-Hcy-białek w zmienionym chorobowo materiale biologicznym, zbadania wpływu N-homocysteinylacji na strukturę oraz funkcję elastyny i kolagenu, zbadania wpływu N-homocysteinylacji na strukturę i funkcję cytochromu c, identyfikacji miejsc N-homocysteinylacji w proteomie i wpływu HHcy na proteostazę oraz określenie fizjologicznej roli paraoksonazy 1 w ochronie przed N-homocysteinylacją.

Zakres badań, które prowadziła Habilitantka w zespole był bardzo szeroki, generalnie spójny tematycznie i wymagał zastosowania odpowiednich modeli badawczych. Badania wymagały nowoczesnej aparatury i znajomości najnowszych metod analitycznych oraz umiejętności wykonania i/lub oceny wyników precyzyjnych analiz, w tym z zakresu biologii molekularnej. W badaniach tych zastosowano wiele technik i określano zmiany wielkości wskaźników adekwatnych do zbadania założonych hipotez. I tak dla wykonania odpowiednich

badan stosowano analizę przy pomocy techniki MALDI-TOF/TOF (publikacje 1, 9), analizę bioinformatyczną (publikacje 1, 4, 9), analizę spektrofotometryczną i spektrofluorescencyjną (publikacje 4, 7, 9), denzytometryczną (publikacje 8, 9), dichroizm kołowy (publikacja 9), ELISA i inne techniki enzymatyczne (publikacja 3, 4, 7, 8), metody immunohistochemiczne (publikacja 8), HPLC z różnymi detektorami (3, 4, 6), UPLC MS/MS (4), RT-PCR (4). Badania przeprowadzano z użyciem różnego materiału np. myszy transgeniczne (publikacja 4, 6, 8), próbki krwi, moczu i innych tkanek (od pacjentów) (publikacja 3, 7, 8), badania *in vitro* (1, 9).

Realizując założone cele Habilitantka zidentyfikowała występowanie N-Hcy-białka w skrawkach mięśnia sercowego i zastawki aorty pochodzących od pacjentów. Ponadto zidentyfikowała N-Hcy-białka w blaszce miażdżycowej myszy ApoE<sup>-/-</sup> będących na diecie wysokometioninowej, co uprawniło Habilitantkę do stwierdzenia faktu, że w tkankach zmienionych chorobowo (tj. objętych miażdżycą), że N-homocysteinyłacja białek może być jednym z mechanizmów toksyczności HHcy (Perła-Kaján et al. *Biomed Pharmacother.* 2008; 62:473-9 = publikacja 8).

W kolejnej części badań dr n. chem. Joanna Perła-Kaján badała wpływ N-homocysteinyłacji na strukturę oraz funkcję elastyny i kolagenu (Perła-Kaján et al. *Anal Bioanal Chem.* 2011;401:2473-9 = publikacja 6). W elastynie badała stężenie desmozyny i izodesmozyny, istotnych dla rozciągliwości włókien elastycznych w modelu *in vivo* w płucach myszy z niedoborem PCFT (jako model dziedzicznego zespołu złego wchłaniania kwasu foliowego, które mają 20-krotnie wyższy poziom tHcy osocza w porównaniu ze zwierzętami Pcft<sup>+/+</sup>) oraz w elastynie wyizolowanej z narządów myszy z niedoborem odporności CBySmn.CB17-Prkdcscid/J (SCID). I chociaż nie stwierdzono jednoznacznie obniżonego poziomu desmoczyn elastyny płucnej myszy Pcft<sup>-/-</sup>, to zauważono, że stężenia desmozyny i izodesmozyny były istotnie niższe w elastynie w izolowanej z płuc, serca, nerek i wątroby zmutowanych myszy SCID, co wskazywało wskazują, że obniżone usieciowanie elastyny jest nowym fenotypem przyczyniającym się do patologii myszy SCID z niedoborem odporności. Z kolei badania nad wpływem N-homocysteinyłacji na strukturę i funkcję kolagenu Habilitantka przeprowadziła z wykorzystaniem myszy Cbs<sup>-/-</sup>, które kilkadziesiąt razy mają wyższy poziom N-Hcy-białka w moczu i w osoczu. W badaniach tych stwierdziła, że u myszy Cbs<sup>-/-</sup> N-Hcy była znacznie wzrosła w całkowitym kolagenie kostnym zwierząt doświadczalnych a także w sercu tych myszy.

Dalszym etapem było poszukiwanie miejsca, w którym reszty Lys kolagenu są podatne na modyfikację tiolaktonem Hcy (Perła-Kaján et al. *FASEB J.* 2016;30:3810-3821 = publikacja 4). W badaniach tych Habilitantka zidentyfikowała jedną resztę N-Hcy-Lys zlokalizowaną w pozycji K160 w łańcuchu  $\alpha 1$  kolagenu typu I wyizolowanym z kości myszy Cbs<sup>-/-</sup> sugerując, że reszta K160 jest dominującym miejscem N-homocysteinyłacji *in vivo*. Reszta K160 w mysim kolagenie Col1A1 (odpowiada to reszcie K170 w kolagenie Col1A1 człowieka) jest zaangażowana w tworzenie wiązania poprzecznego pirydynoliny (Pyd), co mogło wskazywać, że ta reszta Lys ulegająca N-homocysteinyłacji *in vivo* może blokować udział tej reszty w tworzeniu wiązania poprzecznego. Zostało to dowiedzione przy pomocy opracowanej przez dr n. chem. Joannę Perła-Kaján metody do pomiaru wiązań poprzecznych (dla elastyny) z zastosowaniem fluorescencyjnej detekcji pirydynoliny i deoksypirydynoliny (Pyd/Dpd). Ostatecznie końcowym wnioskiem w tym obszarze badań było stwierdzenie redukcji poziomu wiązań poprzecznych Pyd/Dpd w kolagenie myszy Cbs<sup>-/-</sup>, któremu towarzyszył wzrost poziomu N-Hcy, co może być przyczynkiem do wyjaśnienia obserwowanych nieprawidłowości w tkance łącznej obserwowanych u pacjentów z HHcy.

W kolejnych badaniach dr n. chem. Joanna Perła-Kaján podjęła się wyjaśnienia, które miejsca w cytochromie c są podatne na przyłączenie Hcy i czy N-Hcy może wpływać na strukturę

i funkcję redoks cytochromu c (Perla-Kaján et al. *Biochemistry*. 2007; 46:6225-31 = publikacja 9). W pracy tej wykazano, że 4 reszty lizyny (Lys8 lub -13, Lys86 lub -87, Lys99 i Lys100) cytochromu c są podatne na N-homocysteinyłację oraz, że N-homocysteinyłacja 1 mola lizyny/mol białka wpływa na stan redoks ligandu hemowego cytochromu c, powodując jego redukcję. Modyfikacja ta powoduje subtelne zmiany strukturalne, objawiające się zwiększoną odpornością N-Hcy-cytochromu c na proteolizę przez trypsynę czy chymotrypsynę, natomiast nie zaobserwowano w tej pracy żadnych większych zaburzeń struktury drugorzędowej na podstawie wykonanych badań z wykorzystaniem dichroizmu kołowego. Stąd Habilitantka sugeruje, że N-Homocysteinyłacja może zwiększać odporność białek na proteolizę, tym samym zaburzając ich usuwanie przez systemy proteolityczne, co może skutkować efektami patofizjologicznymi.

Otrzymane wyniki braku zmian w strukturze drugorzędowej cytochromu c oraz inne znane dane związane N-homocysteinyłacją albuminy i fibrynogenu skłoniły dr n. chem. Joannę Perłę-Kaján do poszerzenia badań w tym aspekcie o proteom drożdży (Perla-Kaján et al. *Journal of Proteome Research*. 2021; 20: 2458-2476 = publikacja 1), wybierając ten model ze względu na możliwość porównania lokalizacji zidentyfikowanych miejsc N-homocysteinyłacji z innymi modyfikacjami posttranslacyjnymi (acetylacją, fosforylacją i ubikwitynacją). Badania te przeprowadzono porównując wzrost drożdży suplementowanych Hcy lub Hcy tiolaktonem w stosunku do hodowli w warunkach kontrolnych przy pomocy odpowiedniej analizy bioinformatycznej. Zidentyfikowano 68 miejsc N-homocysteinyłacji *in vivo* i 197 *in vitro* przy resztach lizyny białka (N-Hcy-Lys). N-homocysteinyłacja białek *in vivo*, indukowana przez suplementację kultur drożdży Hcy, towarzyszyła istotnym zmianom w poziomach 70 białek drożdży (38 o zwiększonej i 32 o obniżonej) zaangażowanych w strukturę rybosomów, biosyntezę aminokwasów oraz w podstawowe szlaki komórkowe. Habilitantka uważa, że N-homocysteinyłacja białka i rozregulowanie proteostazy komórkowej mogą przyczyniać się do toksyczności Hcy w drożdżach domniemując, iż białka homologiczne mogą brać udział w toksyczności HHcy w komórkach ludzkich i zwierzęcych.

Zmiany ekspresji genów obserwowanych u drożdży wywołane przez HHcy dały asumpt do napisania pracy przeglądowej znajdujących potwierdzenie tych wyników w innych badaniach prowadzonych na liniach komórkowych i organizmach wyższych (Perla-Kaján i Jakubowski *Int J Mol Sci*. 2019; 20: 3140 = publikacja 2), w której Habilitantka dokonała zestawienia szlaków biologicznych modulowanych przez HHcy wywołaną na liniach komórkowych oraz u zwierząt doświadczalnych. Interesujące było powiązanie między poziomem N-homocysteinyłowanego na reszcie Lys 79 histonu H3, a poziomem Hcy i ekspresją genów związanych w rozwoju wad cewy nerwowej w mózgach płodów ludzkich.

Ostatnia część badań wchodząca w skład przedstawionego cyklu przez dr n. chem. Joannę Perłę-Kaján jest związana z określeniem fizjologicznej roli paraoksonazy 1 w ochronie przed N-homocysteinyłacją. Była ona przedmiotem trzech publikacji, a mianowicie pracy przeglądowej (Perla-Kaján i Jakubowski *Amino Acids*. 2012; 43:1405-17 = publikacja 5), ochronnej roli aktywności paraoksonazy 1 przed reakcją przed N-homocysteinyłacją białek u ludzi (Perla-Kaján i Jakubowski *FASEB J*. 2010;24:931-6 = publikacja 7) oraz pracy związanej z określeniem fizjologicznej funkcji białka PON1 u człowieka oraz polimorfizmami w genie PON1 (Perla-Kaján et al. *FASEB J*. 2018;32:6019-1024 = publikacja 3).

W publikacji 5 Habilitantka przedstawiła stan wiedzy na rok 2012 na temat struktury białka PON1, mechanizmu katalizy enzymatycznej, polimorfizmów genu PON1, a także powiązań między genotypem, aktywnością a stanami chorobowymi, dyskutując zwłaszcza te elementy, które wówczas nie były jednoznaczne a czasem kontrowersyjne, zwracając zwłaszcza na udział PON1 w działaniach przeciwmiażdżycowych kojarzonych z rolą funkcji HDL u myszy, czy też w

ochronie działania neurotoksycznego wywołanego przez Hcy. Należy jednak podkreślić, informacje te zostały uaktualnione w pracy eksperymentalnej (publikacja 3). W publikacji 7 Habilitantka badała jak naturalna zmienność aktywności Hcy-tiolaktonazy PON1 wpływa na poziomy białka N-Hcy w osoczu u pacjentów z niedoborem beta-syntazy cystationiny. Stwierdzono, że białko N-Hcy w osoczu było ujemnie skorelowane z aktywnością Hcy-tiolaktonazy w surowicy, co potwierdzono w badaniach *in vitro*. Te wyniki pozwoliły skonkludować, że aktywność tiolaktonazowa PON1 jest wyznacznikiem poziomu N-Hcy-białka w osoczu oraz może zapobiegać N-homocysteinyłacji białek *in vivo*. W publikacji 3 stwierdzono, że genotyp PON1-192, który wpływa na aktywność enzymatyczną białka PON1, wpływa również na poziom Hcy-tiolaktonu w moczu. Badanie te przeprowadzono u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca zauważając, osoby z niską aktywnością paraoksonazy PON1 w surowicy miały znacząco wyższe poziomy Hcy-tiolaktonu/kreatyniny w porównaniu z pacjentami z wysoką aktywnością paraoksonazy. Natomiast na poziomy Hcy-tiolaktonu/kreatyniny nie miała wpływu aktywność aryloesterazy PON1 w surowicy ani poziomy białka PON1. Stwierdzono więc, że PON1 hydrolizuje Hcy-tiolakton u ludzi i że międzyosobnicze różnice w genotypie/aktywności PON1 mogą modulować patologię hiperhomocysteinemii.

### **Podsumowanie**

Przeprowadzone przez dr n. chem. Joannę Perłę-Kaján badania naukowe dotyczące obecności N-Hcy-białek w zmienionym chorobowo materiale biologicznym, badań wpływu N-homocysteinyłacji na strukturę oraz funkcję elastyny i kolagenu, badań wpływu N-homocysteinyłacji na strukturę i funkcję cytochromu c, identyfikacji miejsc N-homocysteinyłacji w proteomie drożdży oraz określenie fizjologicznej roli paraoksonazy 1 w ochronie przed N-homocysteinyłacją u pacjentów są ciekawe i wnoszą wiele nowych elementów do zrozumienia przyczyn oraz implikacji patofizjologicznych związanych z występowaniem hiperhomocysteinemii. Uzyskane wyniki wskazują na złożony mechanizm powstawania Hcy i jej oddziaływania, zwłaszcza w aspekcie powstającego Hcy-tiolaktonu i jego usuwania u ludzi. Trzeba podkreślić, że podjęcie takich badań było w wielu elementach nowatorskie i wymagało znajomości nowoczesnych technik badawczych i bardzo precyzyjnej aparatury do badań. Habilitantka poprzez zdobycie odpowiednich umiejętności i współpracy nie tylko z pracownikami macierzystej Katedry, ale również z innymi krajowymi jednostkami z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, Uniwersytetu Łódzkiego, Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie była dobrze przygotowana. Należy również pokreślić, że wśród współautorów prac są także naukowcy pochodzący z uznanych zagranicznych jednostek naukowych np. International Center for Public Health, Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, Rutgers-New Jersey Medical School, Newark, New Jersey, USA; Faculty of Health Sciences, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada; Department of Heart Disease, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway czy University Hospital for Cardiac Surgery, Salzburg, Austria. Podjęty przez Habilitantkę temat jest niezwykle ważny tak z punktu widzenia poznawczego, jak i ewentualnych zastosowań klinicznych.

### **Promotor pomocniczy w przewodach doktorskich**

Pani dr n. chem. Joanna Perła-Kaján pełni funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim mgr Adrianny Żukowskiej, chociaż w dostępnej dokumentacji Habilitantka nie podała bliższych danych tj., gdzie i kiedy otwarto ten przewód i kto jest głównym promotorem.



#### 4. Działalność dydaktyczna

Habilitantka ma doświadczenie w prowadzeniu zajęć dydaktycznych prowadząc ćwiczenia dla studentów Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z biochemii, chemii ogólnej, podstaw chemii i chemii organicznej dla studentów na kierunkach biotechnologia, ogrodnictwo, rolnictwo, inżynieria rolnicza, informatyka stosowana, ochrona środowiska.

Była opiekunem 8 prac magisterskich wykonywanej przez studentów biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (w tym 2 w języku angielskim) oraz 4 prac inżynierskich; 2 prace magisterskie były nagrodzone na specjalistycznych konferencjach naukowych.

W ramach działalności popularyzatorskiej w latach 2018-2019 Habilitantka zorganizowała warsztaty z elementami prezentacji podczas tzw. „Wagarów z Przyrodą”, skierowanych do uczniów szkół ponadpodstawowych, jako potencjalnych kandydatów na studia. Ponadto w ramach programu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Regionalna Inicjatywa Doskonałości”, zorganizowała dniach 02-05.12.2019 wykłady dr M. Pajares dla pracowników i studentów Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, w dniach 02-05.12.2019.

#### 5. Działalność organizacyjna

Pani dr n. chem. Joanna Perła-Kaján **była kierownikiem 2 projektów finansowanych przez MNiSzW oraz NCN**, a mianowicie:

- 1) N N401 230634 „Rola N-homocysteinylicacji tropoelastyny w procesie utraty elastyczności naczyń krwionośnych w miażdżycy tętnic” (projekt realizowany był w latach 2007-2011),
- 2) 2014/15/B/NZ2/01079 „Proteomika ilościowa w drożdżowym modelu hiperhomocysteinemii” (projekt realizowany był w latach 2015-2020).

Ponadto była wielokrotnie (5 razy) wykonawcą w projektach sfinansowanych przez NCN otrzymanych i realizowanych pod kierownictwem prof. dr hab. Hieronima Jakubowskiego. Obecnie uczestniczy jako wykonawca w 3 projektach finansowanych przez NCN realizowanych pod tym samym kierownictwem.

Brała także udział w Komitecie organizacyjnym hybrydowej konferencji międzynarodowej „13th International Conference on One-Carbon Metabolism, B Vitamins and Homocysteine; Poznań 12-16.09.2021”, będąc redaktorem wniosku DNK/SP/464778/2020 oraz osobą do bezpośredniego kontaktu w organizowaniu tej konferencji, na którą otrzymano wsparcie w ramach programu: „Doskonała nauka – Wsparcie konferencji naukowych”. Ponadto brała udział w Komitecie organizacyjnym i naukowym hybrydowej konferencji „Homocysteine Mini-Conference Poznań 2020” (25.09.2020) oraz konferencji międzynarodowej „Homocysteine Mini-Conference Poznań 2019” (26.09.2019).

Do działalności organizacyjnej należy także zaliczyć aktywność Habilitantki jako Sekretarza Komisji Rektorskiej ds. etyki badań naukowych prowadzonych z udziałem ludzi, udział w komisjach przetargowych (3 razy jako przewodnicząca komisji) na dostawę specjalistycznej aparatury naukowej, udział w komisjach rekrutacyjnych na stanowisko doktoranta i post-doca do realizacji projektów badawczych w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, a także udział w pracach komisji rekrutacyjnej Szkoły Doktorskiej Uczelni czy w komisji rekrutacyjnej na adiunkta w Katedrze Biochemii i Biotechnologii.

Działalnością organizacyjną trzeba też nazwać umiejętność nawiązania współpracy z jednostkami naukowymi nie tylko macierzystej Uczelni, ale także krajowymi renomowanymi

jednostkami naukowymi np. z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu (Wydział Chemii – Prof. UAM dr hab. Paweł Skowronek), z Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Zakład Histologii i Embriologii - Prof. dr hab. Ludwik Malendowicz), z Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Leczniczych w Poznaniu (dr chem. Sebastian Mielcarek), z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (Pracownia Spektrometrii Mas – dr Łukasz Marczak), z Uniwersytetu Łódzkiego (Katedra Chemii Środowiska – prof. dr hab. Rafał Głowacki), z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie (Środowiskowa Pracownia Spektrometrii Mas – dr Agata Malinowska, Laboratorium Proteomiki - dr Ewa Sitkiewicz). Wśród współautorów prac są także naukowcy pochodzący z uznanych zagranicznych jednostek naukowych np. International Center for Public Health, Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, Rutgers-New Jersey Medical School, Newark, New Jersey, USA (Prof. dr hab. Hieronim Jakubowski); Faculty of Health Sciences, McMaster University, Canada (Prof. Richard C. Austin); Department of Heart Disease, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway (Prof. Ottar Nygard), University Hospital for Cardiac Surgery, Salzburg, Austria (Prof. Olaf Stanger), co zaowocowało nie tylko publikacjami przedstawionymi przez Habilitantkę w ramach przedstawianych osiągnięć naukowych, ale też innymi opublikowanymi pracami stanowiącymi Jej dorobek naukowy.

## 6. Wniosek końcowy

Podsumowując pracę naukową, dydaktyczną i organizacyjną stwierdzam, że Habilitantka jest dojrzałym pracownikiem naukowym zdolnym do samodzielnego rozwiązywania problemów badawczych, kierowania zespołem naukowym, kształcenia młodej kadry naukowej i skutecznego publikowania w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Wysoko oceniam merytoryczną wartość rozprawy habilitacyjnej łączącej rzetelność i nowoczesność warsztatu badawczego, aspekty naukowe z bardzo ważnymi elementami aplikacyjnymi w różnych schorzeniach związanych z hiperhomocysteinemią i paraoksonazą 1 będących przedmiotem badań w przedstawionym osiągnięciu naukowym.

Przedstawione do recenzji **główne osiągnięcie naukowe jak inne osiągnięcia naukowe** oraz pozostała aktywność Kandydatki **odpowiada wymogom ustawowym** (art. 219 ust.1 pkt.2), co upoważnia mnie do przedłożenia wniosku Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o **przyjęcie całości rozprawy i dopuszczenie** Pani Joanny Perły-Kaján do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego i nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych.

Poznań, 21.10.2023

  
Prof. dr hab. Przemysław Mikołajczak