INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
Polskiej Akademii Nauk

ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 61 852 85 03, sekretariat 61 852 89 19
faks: 61 852 05 32, e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327 NIP 777-00-02-062
http://www.ibch.poznan.pl

Poznań, 23 października 2019 roku

Prof. dr hab. Ryszard Kierzek
Zakład Chemii i Biologii Strukturalnej
Kwasów Nukleinowych

Recenzja
osiągnięcia naukowego dr Agaty Głuszyńskiej pt. „Oddziaływania związków o szkielecie karbazolu, antracenu i papaweryny z G-kwadrupleksami DNA" oraz dorobku naukowego stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

Recenzja sporządzona w odpowiedzi na pismo Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z dnia 26 września 2019 r. w związku ze wszczęciem postępowania habilitacyjnego dr Agaty Głuszyńskiej i powołaniem mnie na recenzenta przez Centralną Komisję ds. Stopni i Tytułów.

I. Podstawowe informacje na temat wykształcenia i aktywności zawodowej Kandydatki

Dr Agata Głuszyńska związana jest z Uniwersytetem im. Adama Mickiewicza w Poznaniu od roku 1999, kiedy to została zatrudniona, jako starszy technik na Wydziale Chemii, jakkolwiek od roku 1994 rozpoczęła badania, które stanowiły temat jej rozprawy doktorskiej. Pracę doktorską pt. *„Enancjoselektywna synteza alkaloidów izocholinowych metodą Pomeraza-Fritscha w modyfikacji Babbitta"* wykonała pod kierunkiem prof. dr hab. Marii D. Rozwadowskiej i w roku 2001 uzyskała stopień doktora nauk chemicznych. Potem zatrudniona była na Wydziale Chemii UAM na różnych stanowiskach i finalnie od roku 2005 jest adiunktem w Zakładzie Chemii Analitycznej kierowanym przez prof. dr hab. Bernarda Juskowiaka (grupa ta w roku 2007 została przekształcona w Pracownię Chemii Bioanalitycznej).

Kandydatka odbyła 2-letni staż podoktorski na macierzystym wydziale, w Zakładzie Spektrochemii Organicznej. Jednak brak długoterminowego stażu zagranicznego jest sporym uszczerbkiem dla dalszego rozwoju naukowego Habilitantki. Dr Głuszyńska była kierowniczką grantu Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (Pomost, 2011-2015) oraz wykonawczynią w 8 grantach krajowych oraz jednym międzynarodowym. Kierowanie jak dotychczas tylko jednym grantem nie jest osiągnieciem imponującym. Można mieć tylko nadzieje, że sytuacja ta zmieni się po uzyskaniu samodzielności badawczej.

Dr Agata Głuszyńska jest współautorką 40 publikacji, z których 20 ukazało się w czasopismach z listy filadelfijskiej a pozostałe w czasopismach spoza tej listy. Jak pisze Habilitantka legitymuje się 67 wystąpieniami (28 międzynarodowymi i 39 krajowymi) na konferencjach, ale informacja, że 3 z nich to komunikaty ustne pozwala sądzić, że pozostałe 64 to postery konferencyjne. Habilitantka na początku swego autoreferatu podaje wiele informacji bibliometrycznych, ale najważniejsze to te, że według Web of Science jej prace cytowane były

łącznie 303 razy (275 razy bez autocytowań). Indeks Hirscha Habilitantki wynosi 9. Zakładając prawie 20 letni okres pracy naukowej (doktorant obroniła w roku 2001) Kandydatki należy stwierdzić, że zarówno liczba cytowań, jak i indeks Hirscha jest znaczący, ale nie jest szczególnie wyróżniający. Można jednak stwierdzić, że Kandydatka jest aktywnym i rozpoznawalnym w swej dziedzinie naukowcem.

W ocenianej rozprawie habilitacyjnej osiągnięcie stanowią badania opisane w cyklu 8 publikacji. Z tej grupy 7 to czasopisma międzynarodowe i w nich Kandydatka jest autorem do korespondencji. Z wyjątkiem publikacji w czasopiśmie polskim, udział Habilitantki w ich powstaniu oceniany jest na 70-100%. Dominująca rola dr Głuszyńskiej świadczy o jej dojrzałości badawczej i rysującej się samodzielności naukowej w rozwiazywaniu problemów badawczych.

Częścią wniosku jest autoreferat liczący 36 stron i stanowiący bardzo dobry przewodnik po cyklu wybranych publikacji. Równocześnie wprowadza on w poruszane zagadnienia naukowe i prezentuje jasno cel prowadzonych badań. Analiza dorobku naukowego wskazuje, że od wielu lat zainteresowania Habilitantki koncentrują się wokół badań struktury i oddziaływań kwadrupleksów DNA z wybranymi ligandami.

Po zapoznaniu się z opisem udziału dr Agaty Głuszyńskiej w publikacjach naukowych stanowiących przedmiot rozprawy habilitacyjnej pragnę stwierdzić, że udział intelektualny i wykonawczy Kandydatki jest wiodący i spełnia wymogi formalne i prawne przeprowadzenia przewodu habilitacyjnego.

II. Ocena osiągnięcia naukowgo stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego.

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe dr Agaty Głuszyńskiej zatytułowane „Oddziaływania związków o szkielecie karbazolu, antracenu i papaweryny z G-kwadrupleksami DNA" oparte jest na 8 wieloautorskich publikacjach, w których Kandydatka siedmiokrotnie była autorką do korespondencji. Oprócz jednej, pozostałe zostały opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej o znaczącym „*impact factor*" (współczynnik wpływu) wynoszącym od 4.5 do 1.2, a większość oscyluje około 3-3.5. Wszystkie publikacje dr Głuszyńskiej cytowane były ponad 300 razy, niestety Habilitantka nie podaje ilości cytowań 8 pracy stanowiących przedmiot rozprawy habilitacyjnej.

Kandydatka jest unikalną uczoną, gdyż łączy w sobie dobre umiejętności chemicznej syntezy złożonych ligandów niskocząsteczkowych, znajomość z obszaru chemii bioorganicznej DNA, dużą wiedzę dotycząca badań fizykochemicznych odziaływań ligandów i DNA kwadrupleksów. Ponadto, współpracując z innymi grupami badawczymi uczestniczyła w badaniach modelowania molekularnego dotyczącego wiązania się wybranych ligandów do kwadrupleksów DNA. Również zaangażowana była w badania cytotoksyczności ligandów na kilku modelowych liniach komórkowych.

Ta cześć autoreferatu, która poświęcona jest omówieniu osiągniecia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego ułożona jest w interesujący sposób. Habilitantka nie rozdziela omówienia w autoreferacie na typu ligandów, które badała, ale omawia w sposób łączny chemiczną syntezę wszystkich badanych ligandów, następnie ich rozległe badania fizykochemiczne, w których określa ich przydatność, jako ligandów wiążących kwadrupleksy DNA a kończy autoreferat omówieniem modelowania molekularnego oraz badań cytotoksyczności wybranych ligandów. Należy przypomnieć, że praca doktorska Kandydatki dotyczyła chemicznej syntezy złożonych związków chemicznych. Stąd zapewne biorą się duże

umiejętności dr Głuszyńskiej dotyczące syntezy wielu ligandów. Habilitantka otrzymała wiele związków opartych o szkielety karbazolu, antracenu i papaweryny.

Pracując, jako główny wykonawca grantu poświęconego wykorzystaniu pochodnych oksazolinowych dr Głuszyńska zaplanowała syntezę ich pochodnych zawierających wiązanie podwójne, co dawało możliwości przeprowadzenia fotoizomeryzacji *cis-trans* i w ten sposób regulowania wiązania się tego typu pochodnych do DNA. Problemy związane z rozpuszczalnością modelowych ligandów spowodowały, że dr Głuszyńska zastąpiła je innymi, które dawały większe szanse wiązania się do kwadrupleksów DNA. Przygotowała szereg pochodnych antracenu, jednak problemy zdrowotne zdecydowały, że ten nurt badań zarzucono. Niedługo później pozyska własny grant z Fundacji na rzecz Nauki Polskiej poświęcony wykorzystaniu pochodnym karbazolu, jako ligandów wiążących się do kwadrupleksów DNA. Takich pochodnych karbazolu przygotowała kilkanaście i większość z nich posiadała wiązanie podwójne, co stwarzało możliwości wykorzystania fotoizomeryzacji *cis-trans* wiązania etenowego. Ponadto, otrzymane pochodne zawierały szereg ugrupowań, które poprzez swoją strukturę powinny ułatwiać i wzmacniać ich oddziaływanie z DNA. Kandydatka otrzymała także pochodne karbazolu zawierające grupę aldehydową i tego typu związki posłużyły do syntezy kolejnych trzech ligandów. Okazały się one najbardziej obiecującymi ligandami do prowadzenia wspomaganej fototerapii nakierowanej na DNA. Zostały one bardzo staranie scharakteryzowane metodami fizykochemicznymi, które potwierdziły ich przydatność do dalszych badań.

Część autoreferatu opisująca syntezy ligandów jest moim zadnie przestawiona przez Kandydatkę zbyt skomplikowanie, w wielu miejscach informacje są zbyt szczegółowe (np. temperatury czy czasy reakcji). Można się łatwo zagubić w tej części opisu, który dotyczy syntezy pochodnych antracenu i papaweryny. Wydaje się, że z różnych względów obie pochodne zostały zarzucone na wczesnym etapie badań i być może ograniczenie się w rozprawie habilitacyjnej jedynie do pochodnych karbazolowych byłoby lepszym rozwiązaniem.

Reasumując, z trzech rodzin ligandów, pochodne karbazolu zostały wybrane do badań docelowych dotyczących odziaływań ligandów z kwadrupleksami DNA. Jako cel badań Habilitantka wybrała szereg kwadrupleksów DNA, w tym jeden powstający w obrębie ludzkiego telomerowego DNA oraz osiem tworzących się w obrębie różnych protoonkogenów. Wszystkie one tworzą kwadrupleksy DNA poprzez składanie jednej nici. Wybrane modelowe DNA są szczególnie ważne z medycznego punktu widzenia, gdyż obrazują udział DNA kwadrupleksów w procesie nowotworzenia.

Jak wspomniano wcześniej, trzy pochodne karbazolowe były strukturami wiodącymi, które ze względy na ich funkcjonalność strukturalną zdawały się być najbardziej korzystne z terapeutycznego punktu widzenia. Zostały one wszechstronnie zbadane fizykochemiczne przez Habilitantkę, co ułatwiło ocenę ich zmian spektralnych wynikających z ich oddziaływań z modelowymi kwadrupleksami DNA. Do badań oddziaływań dr Głuszyńska wykorzystała zmiany w widmach UV-Vis, fluorescencyjnych oraz dichroizmu kołowego modelowych DNA podczas ich miareczkowania wybranymi ligandami. Bardzo ciekawa metoda polegała na wypieraniu z kompleksu DNA-interkalator właśnie interkalatora za pomocą pochodnych karbazolowych (metoda *Fluorescence Intercalator Displacement, FID*). Z kolei chcąc określić selektywności i powinowactwo ligandów karbazolowych do modelowych kwadrupleksów DNA, Habilitantka wykorzystała metodę dializy równowagowej. W ten sposób określiła, że badane ligandy mają większe powinowactwo do struktur kwadrupleksowych DNA niż analogicznych dupleksów. Ponadto, wiązanie się ligandów jest zależne od sekwencji i struktury modelowych

kwadrupleksów. Habilitantka potrafiła ułożyć modelowe DNA w szereg powinowactwa wiązania się z trzema modelowymi ligandami karbazolowymi. Rozważając pewne różnice w wiązaniu się badanych ligandów z kilkoma modelowymi kwadrupleksami DNA dr Głuszyńska próbuje tłumaczyć mechanizm wiązania się ligandów i DNA, jakkolwiek jej interpretacja nie jest przekonywującą, gdyż opiera się ma pojedynczej metodzie analizy. Ponieważ, trzy modelowe ligandy karbazolowe mają odmienne podstawniki Habilitantka starała się interpretować uzyskane różnice w ich oddziaływaniach z DNA właśnie odmiennością struktur podstawników. Najogólniej, dr Głuszyńska stwierdza, że mechanizm oddziaływania ligand-DNA jest złożony, wieloetapowy, o czym świadczy, na przykład, brak punktu izozbestycznego podczas miareczkowania fluorescencyjnego. Dr Głuszyńska określiła także dwoma metodami stałe wiązania trzech ligandów karbazolowych i sześciu modelowych kwadrupleksów DNA. Uzyskane wyniki wskazują, że nie zależnie od rodzaju ligandu i modelowego DNA stałe wiązania są podobne. Szkoda, że Habilitantka nie użyła dupleksu DNA, jako cząsteczki referencyjnej, bo dałoby to możliwość określenia jak bardzo badane ligandy są specyficzne do kwadrupleksów DNA. Dr Głuszyńska wykorzystała także metodę dichroizmu kołowego (CD) do określenia zmiany trwałości termicznej kilku modelowych DNA wywołanych dodaniem ligandów karbazolowych. Zmiany trwałości termicznej były rzędu kilku stopni i bardziej zależały od modelowego DNA niż rodzaju użytego ligandu.

Reasumując, cześć dotyczącą oddziaływań ligandów karbazolowych z modelowymi kwadrupleksami DNA, można zauważyć, że Habilitantka starała się badania przeprowadzić bardzo rzetelnie i z dużą dokładnością. Jakkolwiek osobiście cześć badań przeprowadziłbym odmiennie. Zamiast dializy równowagowej użyłbym metodę *microscale thermophoresis (MST)*, natomiast do określenia wpływu ligandów na trwałość termiczną kwadrupleksów zastosowałbym metodę *UV-melting* monitorując proces topnienia przy 295 nm.

We współpracy z dr Martyną Kuta-Siejkowską, z grupy badawczej dr Shozeba Haidera z University Collage London, przeprowadzono modelowanie molekularne wiązania się trzech modelowych kwadrupleksów DNA z trzema ligandami karbazolowymi. Badania te były tematem pracy doktorskiej Martyny Kuta-Siejkowskiej a dr Głuszyńska była promotorem pomocniczym tej rozprawy. Badania przeprowadzone metodą dynamiki molekularnej pozwoliły określić odziaływania ligandu z DNA, ułożenie ligandu względem tetrad guanozynowych, strukturę i oddziaływania reszt guanozynowych w tetradzie. Dodatkowo, modelowanie molekularne wskazało także na możliwości zwiększenia oddziaływań ligand-kwadrupleks poprzez wprowadzenie do ligandu określonych grup funkcyjnych.

Interesujące są także badania przeprowadzone we współpracy z grupą dr hab. Błażeja Rubisia z Katedry Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badania dotyczyły określenia cytotoksyczności trzech ligandów karbazolowych w trzech liniach komórkowych. Wykazały one, że wysoce modyfikowane ligandy cechują się niższą cytotoksycznością, co w połączeniu z ich lepszymi cechami fizykochemicznymi jest dobrą wiadomością dla dr Głuszyńskiej.

Nie mam istotnych uwag do tej części autoreferatu dr Głuszyńskiej, chociaż w wielu miejscach zamiast przeprowadzić analizę swoich osiągnieć badawczych Habilitantka podaje szczegóły eksperymentalne. Opisuje swoje badania w sposób bardziej chronologiczny zamiast skupić się na wnikliwej ocenie i analizie swoich badań naukowych.

Uważam, że wyniki uzyskane przez Habilitantkę w istotny sposób poszerzają wiedzę na temat oddziaływań dużych DNA z innymi biomolekułami. Ponadto, stanowią przykład

wykorzystania wysoce zaawansowanych metod spektroskopowych do jakościowej i ilościowej oceny tych oddziaływań. Na pewno przydadzą się one także innym badaczom przy rozwiązywaniu podobnych problemów naukowych. Dr Głuszyńska wykazała się głęboką znajomością literatury przedmiotu, umiejętnością racjonalnego planowania i realizowania wartościowych badań oraz zdolnością formułowania wniosków końcowych. Takie umiejętności są bardzo istotne przy samodzielnym kierowaniu badań, a taki jest cel działań autorki przedstawionej rozprawy habilitacyjnej.

Osiągnięcie naukowe dr Agaty Głuszyńskiej oceniam pozytywnie pod względem wartości naukowej. Wkład merytoryczny i wykonawczy w badania zawarte w wybranych przez Kandydatkę 8 publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe nie budzi wątpliwości. Wskazują na to także oświadczenia wszystkich współautorów wybranych publikacji. Duża cześć prowadzonych badań ma charakter nowatorski i metodyczny. Należy wierzyć, że po uzyskaniu samodzielności naukowej dr Głuszyńska rozwinie swoje badania bardziej w kierunku biologicznym i strukturalnym, a obiektem badań będą ważne i funkcjonale DNA i RNA.

III. Ocena działalności naukowej Kandydatki poza cyklem „publikacji habilitacyjnych"

Całkowity dorobek publikacyjne dr Agaty Głuszyńskiej to 40 prac, z czego 20 w czasopismach z listy filadelfijskiej i cześć z nich weszła w skład rozprawy habilitacyjnej. Pozostałe 20 prac to głównie streszczenia posterów prezentowanych na konferencjach i trudno nazwać to publikacją. Do roku 2004 dr Głuszyńska była związana z grupą badawczą promotorki swojej pracy doktorskiej, czyli z zespołem prof. dr hab. Marii Rozwadowskiej. Z tego okresu powstało 6 publikacji. Bardzo szkoda, że w roku 2004 musiała ze względów rodzinnych (urodziny bliźniaków) zrezygnować z propozycji 2-letniego stażu w dobrym ośrodku w Stanach. W roku 2005 wygrała konkurs na stanowisko adiunkta w Zakładzie Chemii Analitycznej kierowanej przez prof. dr hab. Bernarda Juskowiaka (grupa ta w roku 2007 została przekształcona w Pracownię Chemii Bioanalitycznej) i do chwili obecnej tam prowadzi swoje badania. Pracując w grupie prof. Juskowiaka dr Głuszyńska rozpoczęła także współpracę z grupą prof. Marka Sikorskiego z macierzystego wydziału a współpraca dotyczyła badań spektralnych i fotochemicznych związków z grupy flawin. Wspólne badania dotyczyły między innymi wpływu pochodnych witaminy B2 na stabilność dupleksów i kwadrupleksów DNA. Kilka lat temu dr Głuszyńska rozpoczęła także współpracę z prof. Maciejem Kubickim z tego samego wydziału. Wspomniana współpraca dotyczyła odziaływań pochodnych (-)cytyzyny z wieloma modelowymi jedno-, dwu-, trój- i czteroniciowymi DNA. Mimo zastosowania wielu metod badawczych nie wykazano silnego oddziaływania modelowych DNA z pochodnymi (-)cytyzyny.

W roku 2013 grupa badawcza prof. Juskowiaka rozpoczęła badania oddziaływań makrocyklicznych eterów metalokoronowych z modelowymi DNA. W ramach tego tematu Ewa Rajczak wykonała pracę doktorską w części finansowaną przez grant badawczy NCN (Preludium) i dr Głuszyńska była promotorem pomocniczym tej rozprawy. W roku 2016, w ramach dużego grantu europejskiego, grupa prof. Juskowiaka rozpoczęła badania dotyczące oddziaływań eterów metalokoronowych z różnymi DNA. W ramach tego grantu dr Głuszyńska wyjechała na 2 miesięczny staż naukowy do prof. Vincenta Pecoraro z University Michigan w Ann Arbor (USA). Tematyka stażu dotyczyła chemicznej syntezy prekursorów eterów metalokoronowych z ugrupowaniem karbazolowym. Habilitantka zakłada, że tego typu pochodne karbazolu będą tematem jej samodzielnego projektu badawczego, który zamierza złożyć w

najbliższym czasie. Należy także wspomnieć o 6 tygodniowym stażu w Kyushu Institute of Technology (Japonia), który odbyła w roku 2012.

Reasumując, dorobek publikacyjny (w czasopismach międzynarodowych) dr Głuszyńskiej przed obroną pracy doktorskiej obejmuje 2 prace. Natomiast po obronie rozprawy doktorskiej powstało 18 prac, z czego 8 weszło w skład rozprawy habilitacyjnej. Tematyka badawcza tych publikacji była podobna do przedstawionych w habilitacji i najogólniej dotyczyła chemicznej syntezy wielu nowych ligandów niskocząsteczkowych i badań ich oddziaływań z różnymi formami strukturalnymi DNA.

IV. Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej Habilitantki

Dr Agata Głuszyńska od roku 2001 do teraz jest pracownikiem naukowym na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W ramach swoich zajęć dydaktycznych od samego początku zatrudnienia prowadziła ćwiczenia laboratoryjne z różnych dziedzin dla studentów Wydziału Chemii UAM. W przeszłości prowadziła także zajęcia dla studentów biologii. Czterokrotnie, przez okres wielu miesięcy, opiekowała się studentami zagranicznymi, odbywającymi staże na jej macierzystym wydziale. Dwukrotnie pełniła funkcje promotora pomocniczego w rozprawach doktorskim. Ma swój udział w wypromowaniu 8 magistrantów i licencjantów. W latach 2010-2015 była opiekunem roku dla specjalności chemia podstawowa.

Swoje wyniki badań, w formie posteru, prezentowała na blisko 30 konferencjach międzynarodowych i prawie 40 konferencjach krajowych. W trzech przypadkach były to wystąpienia ustne.

Dr Głuszyńska była zaangażowana w organizację dwóch konferencji krajowych. Od roku 2012 jest członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Od wielu lat bierze czynny udział w popularyzacji nauki dla dzieci i młodzieży w ramach Nocy Naukowców i Poznańskiego Festiwalu Nauki i Sztuki.

V. Ocena końcowa rozprawy habilitacyjnej dr Agaty Głuszyńskiej

Dr Agata Głuszyńska przedstawiła wniosek habilitacyjny oparty o 8 powiązanych tematycznie wieloautorskich publikacjach z pogranicza chemii bioorganicznej, spektroskopii i biofizyki DNA. W siedmiu z tych prac dr Głuszyńska jest autorem korespondencyjnym. W większości z tych publikacji wkład merytoryczny i wykonawczy Kandydatki przekraczał 70%. Przedstawione w ramach rozprawy habilitacyjnej prace badawcze stanowią dobrą podstawę do prowadzenia badań strukturalnych i oddziaływań DNA (a zapewne także RNA) z różnego typu ligandami niskocząsteczkowymi. Badania dr Głuszyńskiej dotyczyły poznania oddziaływań wybranych ligandów z kwadrupleksami DNA, ale Habilitantka pokazała w ocenianych publikacjach metodologię prowadzenia podobnych badań możliwą do zastosowania z innymi kwasami nukleinowymi i odmiennymi molekułami.

Uważam, że zaprezentowane przez dr Agatę Głuszyńską osiągnięcie naukowe jest wartościowe i razem z pozostałym dorobkiem naukowym spełniają wszystkie wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r., stanowiąc niezbędną podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego. Dojrzałość naukowa dr Głuszyńskiej i jej merytoryczny udział w opublikowanych badaniach wyraźnie świadczy o jej zdolności do prowadzenia samodzielnych badań naukowych. Pewnym mankamentem w ocenie działalności Kandydatki jest niewielka aktywność w zdobywaniu środków na finasowanie własnych projektów badawczych. Należy

wierzyć, że uzyskanie formalnej samodzielności naukowej przez dr Agatę Głuszyńską zmotywuje ją do uzyskania także „samodzielności finansowej" w prowadzeniu badań.

Wnoszę do komisji habilitacyjnej powołanej decyzją Centralnej Komisji do spraw Stopni i Tytułów o nadanie dr Agacie Głuszyńskiej stopnia doktora habilitowanego.

Ryszard Kiench