

Dr hab. Jacek Jemielity, Prof. UW
Laboratorium Chemii Bioorganicznej
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
e-mail: j.jemielity@cent.uw.edu.pl
tel. 22 5543774

Warszawa 25.07.2018

Ocena dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej zatytułowanej "Fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe bazujące na czteroniciowych formach DNA" doktor Anny Dembskiej

Dr Anna Dembska (z domu Masternak) jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu gdzie uzyskała stopień magistra na podstawie pracy magisterskiej pt.: „Synteza 5'-trifosforanów niektórych fluoroforów nukleozydowych jako układów do fluorescencyjnego znakowania DNA metodą enzymatyczną” wykonanej pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Bohdana Skalskiego. W 2005 roku uzyskała stopień naukowy doktora nauk chemicznych w tej samej jednostce i pod opieką tego samego promotora na podstawie rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Synteza, fotochemia i właściwości fluorescencyjne pochodnych purynowych zawierających w cząsteczce ugrupowanie pirydyniowe. Dr Dembska od października 2005 jest zatrudniona na stanowisku adiunkta Wydziału Chemii UAM w Poznaniu, początkowo w Zakładzie Chemii Fizycznej, a następnie w Pracowni Chemii Bioanalitycznej kierowanej przez Prof. Bernarda Juskowiaka. W międzyczasie odbyła dwa poddoktorskie staże badawcze: 4 miesięczny staż w Nuclear Physics Institut, Lund University (Szwecja) oraz 18 miesięczny staż w Department of Chemistry, Mellon Institut, Carnegie Mellon University, Pittsburgh (USA).

Ocena cyklu publikacji

Do osiągnięcia naukowego zatytułowanego "Fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe bazujące na czteroniciowych formach DNA" dr Anna Dembska zakwalifikowała dziewięć prac opublikowanych po

uzyskaniu stopnia doktora w latach 2010 — 2017 w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, osiem z nich w czasopismach o wskaźnikach oddziaływania (impact factor, IF) z zakresu 1,667 – 4,95 oraz jedną w czasopiśmie bez IF. Całkowity wskaźnik oddziaływania prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego wynosi około 24, co przeliczeniu na jedną pracę daje $IF \sim 2,67$, więc jest to wynik przyzwoity. Wśród prac zakwalifikowanych do osiągnięcia naukowego znajduje się 7 prac oryginalnych oraz dwie prace przeglądowe. W zdecydowanej większości prac Habilitantka miała udział kluczowy: 1 praca jednoautorska, 7-krotnie jest wymieniona jako pierwsza współautorka na liście autorów, w 6 pracach pełni rolę autora korespondencyjnego, w jednej tylko pracy dr Dembska nie pełni roli wiodącej, choć udział jej w tej pracy jest istotny (druga autorka). Tematyka badawcza wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego Habilitantki dotyczy badań nad drugorzędowymi strukturami kwasów nukleinowych, głównie G-kwadrupleksami i i-motywami tworzącymi się dla określonych sekwencji oligonukleotydowych bogatych odpowiednio w guanozynę i cytydynę. G-kwadrupleksy są znacznie trwalsze termodynamicznie od i-motywów. Zastanawiano się od jakiegoś czasu, czy i-motywy nie są jedynie biofizycznymi artefaktami obserwowanymi in vitro, jednak ostatnio potwierdzono ich obecność w ludzkich jądrach komórkowych (*Nature Chemistry* **10**, 631–637 (2018)), co z pewnością jeszcze zwiększy atrakcyjność naukową tego zagadnienia. Wygląda więc na to, że i-motywy tak jak G-kwadrupleksy pełnią kluczową rolę w regulacji ekspresji informacji genetycznej, a mutacje tych obszarów mogą zaburzać regulację ekspresji ważnych genów i prowadzić do stanów patologicznych komórki. Projektowanie, synteza i charakteryzacja odpowiednich narzędzi molekularnych jest kluczem do poznania ich biologicznych funkcji aby następnie móc projektować cząsteczki o znaczeniu diagnostycznym, czy terapeutycznym. Badania opisane przez Habilitantkę doskonale wpisują się w ten jakże aktualny nurt badawczy. Należy też tu podkreślić, że badania z tego nurtu należą do jednego najlepiej publikowanych zagadnień związanych z kwasami nukleinowymi. Dr Dembska w swych pracach skupiła się głównie na wykorzystaniu metod fluorescencyjnych bazując na sekwencjach oligonukleotydowych zdolnych do tworzenia wspomnianych struktur znakowanych na końcach 3' i 5' resztami pirenu. Piren jest bardzo interesującym znacznikiem fluorescencyjnym zdolnym do tworzenia ekscymerów, choć też z pewnością do zastosowań in vivo nie jest najlepszym wyborem. W pracach H1 (opublikowana w *J. Fluoresc.*) i H2 (*J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*) Habilitantka badała właściwości dwóch różnych sekwencji TBA (aptamer wiążący trombinę) oraz Htelom (sekwencji ludzkiego telomerowego DNA) zdolnych do tworzenia G-kwadrupleksów, które różnią się między sobą właściwościami, więc są dobrymi obiektami modelowymi do badania różnorodnych efektów. Również ich znakowane fluorescencyjnie analogi różnią się właściwościami fluorescencyjnymi, co badaczka wykorzystała w swoich eksperymentach. TBA, który przyjmuje jedną konformację wykazywał głównie fluorescencje ekscymerową, podczas gdy Htelom, posiada różne konformery w równowadze dynamicznej i emituje promieniowanie charakterystyczne dla

monomerów pirenowych. Takie układy badawcze wykorzystano do badań wpływu różnych czynników na strukturę konformacyjną G-kwadrupleksów, w tym stężenia i rodzajów jonów metali, stosując do tego celu czasowo-rozdzielczą spektroskopię fluorescencyjną. W kolejnej pracy poświęconej analizie konformacyjnej sond opartych na sekwencji Htelom (H8, Intern. J. Biol. Macromol.), w których znaczniki fluorescencyjne zostały przyłączone miejscach sekwencji tworzących pętlę w G-kwadrupleksie. Warto tu podkreślić owocną współpracę Habilitantki z Prof. Ryszardem Kierzkim, który syntetyzował oligonukleotydy znakowane fluorescencyjnie wewnątrz sekwencji (pozycje 6 i/lub 18).

Kolejne prace Habilitantki poświęcone były badaniom sond oligonukleotydowych na bazie i-motywów (prace H3 - *J. Fluoresc.*, H4 - *Chemosensors*, H6 – artykuł przeglądowy w *Analytica Chimica Acta*). Jak wcześniej wspomniałem, tego typu struktury tworzące się w obszarach DNA bogatych w cytydyny, są obecnie intensywnie badane i stanowi to jeden z gorętszych, a więc i bardzo kompetytywnych obszarów badawczych dotyczących kwasów nukleinowych. I-motywy są stabilizowane przez oddziaływania pomiędzy niekanonicznymi parami dwóch cytydyn, z których jedna jest uprotonowana w pozycji N3. Stąd też i-motywy są stabilizowane w niższym pH, a wysokie pH destabilizuje te struktury. Stąd też podjęcie badań nad wpływem pH na właściwości sond fluorescencyjnych opartych na strukturze i-motywów uważam za pomysł interesujący. Choć należy też zauważyć, że pod względem metodologicznym badania te wykazują spore podobieństwa z G-kwadrupleksową częścią badań realizowanych przez Habilitantkę. W tym przypadku do badań użyto głównie oligonukleotydy o dwóch sekwencjach: fragment sekwencji proto-onkogenu RET oraz fragment sekwencji promotorowej innego proto-onkogenu c-Myc. Obydwa geny są niezwykle ważne z punktu widzenia onkogenezy i w obydwu przypadkach sekwencje zdolne do tworzenia i-motywów pełnią istotne funkcje regulatorowe. W ramach tej części projektu, dr Dembska zaprojektowała i zsyntetyzowała kilka sond nukleotydowych znakowanych na obydwu końcach pirenem, a następnie dokonała ich charakterystyki spektroskopowej (CD, UV, spektroskopia emisyjna, badania temperatury topnienia). W dalszych badaniach wykazano, że sekwencje znakowane pirenem ciągle są zdolne do tworzenia i-motywów, a nawet obecność reszt pirenowych stabilizuje te struktury. Wykazano również, że fluorescencja sond jest zależna od pH, choć obserwowano jedynie fluorescencje monomerową, i nawet dodanie na flankach sekwencji oligonukleotydu kolejnych nukleotydów nie umożliwiło tworzenia się ekscymerów.

Kontynuacją tego projektu były badania poświęcone tzw. latarniom molekularnym (ang. molecular beacons) które dodatkowo zawierały sekwencje i-motif (H5 - *Spectrochimica Acta, Part A*, H7 - *Analytica Chimica Acta*, H9 – praca przeglądowa w *Anal. Methods*) i wykazywały zmiany właściwości fluorescencyjnych pod wpływem zmian pH, co odzwierciedlał stosunek fluorescencji monomerowej do fluorescencji ekscymerowej. Następnie zbadano również wpływ ilości par GC w dwuniciowym rdzeniu

sondy na stabilność i-motywu, jak również zauważono efekt destabilizujący traktu guanozynowego w sekwencji. W tej części dzieła naukowego warto podkreślić postęp w metodologii prac Habilitantki, sięgnięcie do innych niż dotychczas stosowane technik badawczych takich jak mikroskopia konfokalna pozwalająca śledzić zmiany pH w żywych komórkach przy użyciu opracowanych sond (współpraca z dr hab. E. Kierzek z IChB PAN). Pozwolę sobie tutaj na uwagę, że to jest właśnie droga do zwiększania jakości naukowej prac, nadawania opracowywanym sondom molekularnym kontekstu biologicznego, co na zasadzie sprzężenia zwrotnego będzie skutkowało powstawaniem narzędzi molekularnych o jeszcze ciekawszych właściwościach i istotnych zastosowaniach. Z technicznego zaś punktu widzenia będzie prowadziło to do łatwiejszego publikowania prac w bardziej prestiżowych czasopismach i poprawi ich odbiór w środowisku naukowym danej dziedziny.

Reasumując tą część mej recenzji, chciałem podkreślić, że Habilitantka prowadziła swoje badania w bardzo atrakcyjnej i aktualnej tematyce badawczej. W sposób rzetelny opisała wyniki swoich badań dotyczących oligonukleotydowych sond molekularnych opartych na fluorescencji, które często prowadzą do bardzo interesujących wniosków i implikują szerokie możliwości aplikacyjne. Miałem czasem wrażenie, że niektóre z przedstawionych w niniejszym autoreferacie badań zostały opublikowane w czasopismach o reputacji słabszej niż jakość wyników w pracach tych zaprezentowanych. Zachęcam Habilitantkę do odważniejszych prób jeśli chodzi o miejsce publikacji osiągniętych wyników. Uważam też, że na tym etapie kariery upowszechnianie wyników badań w czasopismach bez IF jest szkodliwe.

Ocena dorobku naukowego

Według bazy Web of Science Core Collection na całkowity dorobek publikacyjny dr Anny Dembskiej składa się z 16 publikacji z listy JCR. Indeks Hirsha Habilitantki wynosi 8, a jej prace były cytowane 208 razy (192 cytowań niezależnych). Biorąc pod uwagę dorobek naukowy Habilitantki inny niż prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, to składa się na niego 8 publikacji z listy JCR, czyli pod względem ilościowym jest on dość ubogi, jednak warto podkreślić że znajdują się tam prace umieszczone w renomowanych czasopismach takich jak *Biol. Chem.*, *J. Org. Chem.*, czy *J. Phys. Chem. C*. Również parametry bibliometryczne takie jak H-indeks oraz liczba cytowań są dość przeciętne jak na ten etap kariery. Stosunkowo niską ilość publikacji naukowych można w pewnym sensie uzasadnić stylem pracy badawczej Dr Dembskiej. W wielu pracach, jest ona, oprócz kierownika Pracowni, w której prowadzi badania jedynym współautorem, co często prowadzi do wydłużonego okresu realizacji poszczególnych projektów i przygotowania manuskryptów. Warto rozważyć zmianę tego stylu zwłaszcza, że od samodzielnego pracownika naukowego oczekuje się między innymi kształcenia młodszej kadry naukowej. W ostatnich pracach Habilitantki dostrzegam coraz bogatszy repertuar technik badawczych, również dzięki słusznie podjętej współpracy naukowej z innymi badaczami co

podnosi wartość badań oraz poprawia ich odbiór w środowisku naukowym w danej dziedzinie, a to z reguły przekłada się na poprawę ich cytowalności.

Habilitantka posiada pewne, choć nie bardzo bogate umiejętności w zdobywaniu funduszy na działalność naukową, które są niezbędne do realizacji własnych pomysłów naukowych i prowadzenia samodzielnych badań na światowym poziomie. Kierowała ona jednym projektem badawczym pt.: „Fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe znakowane pirenem czułe na zmiany pH” o numerze NN 204220040. Numer wskazuje, że był to projekt finansowany jeszcze przez MNiSW, a nie NCN jak podano w materiałach. Dodatkowo, dr Dembska uczestniczyła jako wykonawca w 5 innych projektach naukowych kierowanych przez swoich współpracowników. Habilitantka wygłosiła 1 wykład konferencyjny na zaproszenie oraz 8 referatów konferencyjnych. Ekspertyzę dr Dembskiej w jej obszarze badawczym doceniono w redakcjach prestiżowych czasopism naukowych m. in. *Chemical Science*, *Sensors and Actuators B: Chemical*, *Biochimie*, czy *Molecules*, przez które zaproszona została do wykonania recenzji manuskryptów prac naukowych (7 recenzji), jak również w agencjach finansujących badania naukowe w Polsce dla których recenzowała ona projekty badawcze (9 recenzji).

Ocena działalności dydaktycznej i popularyzatorskiej

Dr Anna Dembska od początku swojej pracy jako nauczyciela akademickiego prowadzi aktywną działalność dydaktyczną. Były to różnorodne zajęcia laboratoryjne ale również cykle wykładowe lub ich części. Zajęcia były prowadzone w wymiarze 195-225 godzin rocznie, co oczywiście pochłaniało dużą ilość cennego czasu, często zapewne kosztem badań naukowych. Dr Anna Dembska posiada również doświadczenie w kierowaniu pracą młodszych uczestników badań naukowych, jest promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr Patrycji Bieleckiej, opiekowała się 8 pracami magisterskimi, 4 licencjackimi z czego w trzech przypadkach pełniła rolę promotora. Opiekowała się również studentami wykonującymi w laboratorium staże badawcze, zarówno w swojej rodzimej jednostce jak i podczas stażu podoktorskiego w USA. Co godne podkreślenia i docenienia, Habilitantka angażuje się w inicjatywy mające na celu popularyzację nauki. Całą tą część działalności Dr Dembskiej, która jest również istotna na dalszych etapach bardziej samodzielnej kariery naukowej, doceniam i oceniam pozytywnie.

Wniosek końcowy

Na podstawie przedstawionych mi do oceny materiałów stwierdzam, że dorobek naukowy, mimo pewnych krytycznych uwag, oraz osiągnięcie naukowe, zaprezentowane jako rozprawa habilitacyjna dr Anny Dembskiej spełniają wymagania ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zmianami Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365; Dz. U. z 2010 r. Nr 96, poz. 620; Dz. U. z 2010 r. Nr 182, poz. 1228 oraz Dz.

U. z 2011r. Nr 84, poz. 455) i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie dr. Anny Dembskiej do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Jacek Janicki