



prof. dr hab. Michał Dadlez
Zakład Biofizyki, IBB PAN
Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa

Warszawa 15.05.2023

Ocena osiągnięcia naukowego pt. "Opracowanie opartych o spektrometrię masową metod analiz proteomicznych materiału biologicznego" i dorobku naukowego oraz działalności organizacyjnej i dydaktycznej p. dr Ireny Dapić w związku z ubieganiem się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

1. Sylwetka kandydatki

Pani dr Irena Dapić ukończyła w roku 2008 studia magisterskie na kierunku chemia w Zakładzie Chemii Wydziału Nauk Ścisłych Uniwersytetu Zagrzebskiego w Zagrzebiu, Chorwacja. Jej praca magisterska, opracowana pod kierunkiem prof. Davora Kovacevica nosiła tytuł „Adsorption of bovine serum albumin on previously formed polyelectrolyte multilayer“ przyniosła jej stopień magistra, otrzymany 17/12/2008. Jak sugeruje tytuł jej prace na tym etapie dotyczyły adsorpcji białek na warstwach polielektrolitowych o regulowanych własnościach. W tym samym zakładzie obroniła 14/11/2014 pracę doktorską pt. „Opracowanie i walidacja wskaźników funkcji obronnej skóry“ wykonaną pod kierunkiem prof. dr Ivone Jakasa i dr Renaty Kobetic. Po obronie doktoratu kandydatka odbyła pierwszy staż podoktorski 2014-2017 w Laboratorium Chemii Analitycznej Wydziału Technologii Żywności i Biochemii w Uniwersytecie Zagrzebskim i następny w Grupie Analizy Systemowej Biocząsteczek w Instytucie Badań Molekularnych van 't Hoffa w Uniwersytecie w Amsterdamie, Holandia. Po tych dwu stażach nastąpił trzeci 2017-2018, z powrotem w Chorwacji, z powrotem w Laboratorium Chemii Analitycznej Wydziału Technologii Żywności i Biochemii w Uniwersytecie Zagrzebskim. W lipcu 2018 objęła ona kierownictwo grupy badawczej w Międzynarodowym Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi w Uniwersytecie Gdańskim, piastuje to stanowisko do dziś.

2. Ocena osiągnięcia naukowego.

W skład osiągnięcia naukowego zatytułowanego "Opracowanie opartych o spektrometrię masową metod analiz proteomicznych materiału biologicznego" włączono sześć prac z lat 2017-2022. Kandydatka jest w czterech z tych prac Autorką korespondującą, dwa razy występując jednocześnie na pozycji pierwszoautorskiej. W jednej z dwu pozostałych publikacji jest Autorką pierwszą, w drugiej równorzędną pierwszą. Prace publikowane były w wysoko notowanych czasopismach o $IF > 4$, z praca przeglądową w prestiżowym *Mass Spectrometry Reviews* ($IF=8.8$). We wszystkich 6 publikacjach powtarzają się nazwiska zespołu holenderskiego z drugiego stażu podoktorskiego, w 5 z nich w roli autorów lub współautorów korespondujących. Wynika z tego, że przedstawiony dorobek ściśle wiąże się ze współpracą z tym zespołem, również po ukończeniu stażu w roku 2017. Wspólnym mianownikiem tych prac są analizy proteomu w trudnych preparatach materiału pobranego od pacjentów nowotworowych lub linii komórkowych w poszukiwaniu specyficznych sygnatur molekularnych, która mogą wspomóc indywidualizowane terapie. Wąskim gardłem tego typu eksperymentów jest oscylowanie między ilością materiału do badań, a stopniem homogenności kolekcji badanych komórek, jak w przypadku analizy kolekcji komórek uzyskanych drogą mikrodysekcji laserowej. Dlatego prace skupiają się z jednej strony na doskonaleniu metod akwizycji danych (jak wspomniane przez Autorkę metody DDA i DIA) i konstrukcji samych spektrometrów mas, a z drugiej strony nad efektywnością ekstrakcji frakcji białkowej z różnego typu materiału biologicznego, nawet archiwalnego, jak preparaty utrwalone formaliną (FFPE) czy przechowywane w niskiej temperaturze (FF). Działalność kandydatki wpisuje się w ten nurt, Autorka skupia się nad opracowywaniem nowych metod preparatyki materiału biologicznego do analiz proteomicznych skutkujących indywidualizowanymi „cyfrowymi mapami” proteomu danego pacjenta, uzyskiwanymi z użyciem nowoczesnych sposobów akwizycji danych, lepiej od poprzednich gwarantującymi powtarzalność rezultatów. Cel swoich działań definiuje jako opracowanie i wdrożenie "precyzyjnych, wiarygodnych i stabilnych metod i strategii analitycznych do analizy proteomu w małej ilości materiału ludzkiego (tkanek i wysuszonych kropli krwi)". Z szerokiego spektrum dostępnych metod wybiera do oceny te, które rokują minimalizacją stopnia modyfikacji chemicznej białek i strat absorpcyjnych, czy optymalizujących etap trawienia białek enzymami proteolitycznymi. Praca kandydatki ma zatem znaczenie na wstępnym, choć niezwykle ważnym i kluczowym etapie projektowania i wykonywania eksperymentu proteomicznego, a jej rezultatem jest opracowanie zoptymalizowanych protokołów przygotowania materiału do właściwych analiz proteomicznych, możliwych do zastosowania w szerokiej gamie przyszłych projektów,

uwzględniających globalne analizy proteomiczne. Dr Dapić w swojej aktywności wyróżnia trzy obszary: 1) badania małej ilości proteomu ze skrawków ludzkich tkanek FF i FFPE, 2) użycie immobilizowanych nośników enzymów trawiących poprawiających proces trawienia i 3) stosowanie metod „single POT” do analizy próbek klinicznych o małej ilości materiału, ograniczonej do setek komórek.

W obszarze pracy z preparatami utrwalonymi formaliną (FFPE) (publikacja 1) Autorka porównała efekty różnych metod preparatyki w kolekcji próbek małych wycinków tkanki nerki, o dwu grubościach tkanki w konfrontacji ze sparowanymi próbkami utrwalonymi przez mrożenie. Porównała trzy rodzaje buforu używane do ekstrakcji proteomu, ograniczając się do tych, które nie skutkują supresją jonów i są kompatybilne ze spektrometrią mas. Miarą efektu była liczba zidentyfikowanych białek, większa lub mniejsza w zależności od wariantu eksperymentu, nie wskazano jednak, który z testowanych buforów powinien być preferowany, bo wskazanie nie było jednoznaczne. Zamiast tego zalecono każdorazowe dobranie buforu optymalnego dla danego układu, praca ma zatem znaczenie jedynie w jakimś stopniu wspomagające, bo testy wykonane w pracy muszą być każdorazowo powtarzane. W pracy 5 oceniono efektywność różnych protokołów preparatyki dla tkanek mrożonych, optymalizując też parametry spektrometru z analizatorem TOF, które w dobie analizatorów Orbitrap mają znaczenie głównie historyczne. Identyczny schemat eksperymentalny zaproponowano w publikacji 2 do porównania efektu różnych strategii preparatyki próbek, tym razem stosując je do dwu zestawów próbek biologicznych: wyizolowanej podgrupy komórek odpornościowych i próbek tkanek FFPE glejaka wielopostaciowego, wzbogacając schemat o porównanie międzylaboratoryjne (dwa laboratoria). Rezultatem było przedyskutowanie wad i zalet stosowanych podejść. Zdobyte doświadczenie w analizie proteomicznej próbek tkanki Autorka wykorzystwała do pracy przeglądowej (praca 4, opublikowana w wysokonotowanym czasopiśmie) na ten temat oraz rozdziału w książce „Trends in Sample Preparation for Proteome Analysis In Mass Spectrometry” (redaktor: G. Mitulovic, IntechOpen, 2021). Ścisłe tej tematyki, optymalizacji ekstrakcji proteomu z próbek FFPA dotyczy także opublikowana w roku 2022 praca Autorki, nie zaliczona do osiągnięcia, choć pełni ona w tej pracy rolę Autora korespondującego. (Weke, K.; Kote, S.; Faktor, J.; Al Shboul, S.; Uwugiaren, N.; Brennan, P. M.; Goodlett, D. R.; Hupp, T. R.; Dapic, I. DIA-MS Proteome Analysis of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Glioblastoma Tissues. *Anal. Chim. Acta* 2022, 1204, 339695.)

Jeszcze inną strategię zastosowano w pracy 3, zgodnie z wdrożoną metodą „singlePOT”, w której porównywano proteom kolekcji komórek z hodowli stosując preparatykę proteomu w jednej studziencie, w niewielkiej objętości mieszaniny reakcyjnej, rzędu pojedynczych

mikrolitrów. Tym razem sformułowano bardziej ambitny cel: zmapowanie różnic w proteomie spowodowanych narażeniem hodowli na różnego rodzaju stresory (stresor chemiczny oraz napromieniowania). Wybrano trzy linie komórkowe modelujące komórki nabłonka w przedrakowym stanie zwanym „przełykiem Barretta”, spowodowanym refluksem kwasów żołądkowych do przełyku. Stan ten powiązany jest z mutacjami „strażniczych” genów białek P53 i Smad4, co uzasadnia wybór linii komórkowych. Poszukiwanie takich markerów stanowi dalekozasięgowy cel analiz proteomicznych, bo ważne jest umieć diagnozować zmiany wskazujące na progresję do gruczolaka. Uzyskano dużą liczbę identyfikacji białek, dużą efektywność trawienia i bardzo wysoki procent powtarzalności międzygrupowej, co dobrze świadczy o jakości preparatyki. Praca jest poświęcona głównie ocenie jakości metody. Omówienie uzyskanych zestawów białek różnicowych sprowadzono w publikacji do minimum, wymieniając tylko liczby białek różnicowych w porównaniach par stanów i niektóre nazwy białek, opatrując tylko jedno z nich, AGR2 adnotacją o jego znanej nadekspresji w wielu typach raka. Nie przedyskutowano na przykład jakie różnice obserwuje się w reakcji komórek niezmutowanych i zmutowanych w odpowiedzi na stres, co wydawałoby się najciekawszym potencjalnym rezultatem tej pracy. Kandydatka wzięła również udział i innym projekcie, gdzie zastosowano technologię analiz małowielkościowej kolekcji komórek w testowej linii komórkowej HeLa, publikacja ta nie została włączona do zestawu prac osiągnięcia, została wspomniana w autoreferacie jako działalność dodatkowa (publ. 49).

W pracy 6 kandydatka uczestniczyła w opracowaniu mikroprzepływowego reaktora z immobilizowanym enzymem proteolitycznym, który pozwolił na znaczne skrócenie czasu trawienia, jednak nie wspomina o jego użyciu w dalszych pracach.

W swojej pracy Autorka konsekwentnie skupia się na testowaniu najróżniejszych metod ekstrakcji proteomu z próbek pochodzenia ludzkiego oraz optymalizacji parametrów pomiaru MS. To stanowi jej główny obszar zainteresowań i nabyła w tej dziedzinie niekwestionowanego doświadczenia. Zgodnie z tym wybrała część swoich publikacji, by treść osiągnięcia zachowała dużą spójność. Naturalną konsekwencją optymalizacji metody badawczej jest jednak jej wykorzystanie, bądź przez samą Autorkę lub innych badaczy, do prowadzenia analiz proteomicznych skutkujących nową wiedzą o mikrośrodowisku guza. W spisie literatury spoza zestawu zaliczonego do osiągnięcia naukowego można znaleźć prace Autorki z ostatnich lat, które potwierdzają realizację tego scenariusza, a dalsza ewolucja w tym kierunku jest tylko kwestią czasu: (Weke, K.; Kote, S.; Faktor, J.; Al Shboul, S.; Uwugiaren, N.; Brennan, P. M.; Goodlett, D. R.; Hupp, T. R.; Dapic, I. DIA-MS Proteome Analysis of Formalin-Fixed Paraffin-

Embedded Glioblastoma Tissues. *Anal. Chim. Acta* **2022**, *1204*, 339695. Kote, S.; Pirog, A.; Bedran, G.; Alfaro, J.; **Dapic, I.** Mass Spectrometry-Based Identification of MHC-Associated Peptides. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12* (3), 535. Padariya, M.; Kote, S.; Mayordomo, M.; **Dapic, I.**; Alfaro, J.; Hupp, T.; Fahraeus, R.; Kalathiya, U. Structural Determinants of Peptide-Dependent TAP1-TAP2 Transit Passage Targeted by Viral Proteins and Altered by Cancer-Associated Mutations. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2021**.)

Kandydatka szczegółowo opisuje swój udział w powstaniu każdej publikacji, wskazując, że jest on kluczowy, co potwierdza pierwszoplanowa pozycja jej nazwiska w tych publikacjach. Przedstawione oświadczenie współpracowników, precyzyjnie opisują ich wkład i potwierdzają wiodącą rolę kandydatki w ich powstaniu. Wszystkie prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego powstały z dużym udziałem współpracowników z instytucji spoza Polski, w tym: University of Amsterdam, University of Victoria, Proteomics Centre, University of Edinburgh, Pacific Northwest National Laboratory.

3. Inne osiągnięcia naukowe kandydatki.

Kandydatka ukończyła studia wyższe w Zakładzie Chemii, jej wczesne prace dotyczą badań z zakresu chemii nieorganicznej, własności adsorpcyjnych warstw polielektrolitowych, czy charakterystyce żywic. Zmiana zakładu w toku doktoratu na Wydział Technologii Żywności i Biochemii, skierowała Autorkę w stronę nauk o życiu, gdzie mogła w nowym obszarze wykorzystać swój profil wykształcenia i doświadczenia zawodowego. W toku doktoratu zajmowała się analizą czynników molekularnych decydujących o prawidłowym nawilżaniu i homeostazie skóry, publikując serię prac. Badała ilościowo obecność naturalnych czynników nawilżających, później skupiła się na analizach składu lipidowego warstwy rogowej naskórka, skupiając uwagę na wolnych kwasach tłuszczowych. Wtedy też zaczęła stosować techniki LC-MS, opracowując metodę oznaczania panelu ośmiu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych FFA (C12-C28), co przyniosło jej wyróżnienie Międzynarodowego Towarzystwa Badań Stratum Corneum. Nawiązała też współpracę z zespołem zajmującym się ceramidami komórek skóry i prowadziła badania ich struktury, również korzystając z metod LC-MS, lecz tym razem zastosowaną do śledzenia kinetyki wymiany proton-deuter w tych związkach, również publikując uzyskane rezultaty i broniąc też swojego doktoratu pt. „Opracowanie i walidacja wskaźników funkcji obronnej skóry“.

Nabyte doświadczenie w technikach związanych ze spektrometrią mas otworzyło jej drzwi do aplikowania na pozycje związane np. z badaniami proteomicznymi. W rezultacie kandydatka podjęła zatrudnienie w grupie zainteresowanej profilowaniem proteomu tkanek dla

zrozumienia szlaków przekazywania sygnałów w mikrośrodowisku guza. Zaproponowała wdrażanie nowoczesnych technologii akwizycji danych, takich jak Data Independent Acquisition, z powodzeniem realizując ten plan w przypadku analiz panelu potencjalnych biomarkerów w utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie wycinków tkanek glejaka ludzkiego. Brała też udział w próbach stosowania metod proteomicznych do wykrywania neoantygenów, co zaowocowało artykułem przeglądowym „Mass Spectrometry-Based Identification of MHC-Associated Peptides”.

Autorka legitymuje się łącznie 21 publikacjami w recenzowanych czasopismach. Dokumenty wymieniają 14 prac z okresu po uzyskaniu doktoratu, 5 prac opublikowane w toku doktoratu oraz 2 publikacje powstałe w toku pracy magisterskiej. W 9 publikacjach Autorka jest autorem pierwszym, w 7 korespondencyjnym. W znacznej większości publikacji własnych Autorka ma rolę wiodącą, albo jako pierwszy wykonawca, albo jako inicjator i główny koordynator projektu. Tematyka prac odzwierciedla przesunięcie zainteresowań Kandydatki od chemii do analityki biologicznej, szczególnie w aspekcie zastosowań proteomiki w badaniach chorób człowieka. Prace te były łącznie cytowane: 265 razy (Web of Science), 376 razy (Google Scholar), co prowadzi do indeksu Hirscha 11. Dane bibliometryczne mieszczą się w limitach przyjętych zwyczajowo dla tego etapu kariery Kandydatki. Publikacjom tym towarzyszy umiarkowana liczba doniesień konferencyjnych 23 (w tym 11 po doktoracie), z czego jednak 8 to wystąpienia ustne, niemal połowa doniesień konferencyjnych to wystąpienie ustne, co jest ponadstandardowe. Dokumenty nie przynoszą informacji o kierownictwie (zarządzaniu) ani też o udziale w projektach badawczych. Wzmiankowane w pkt. I zał. nr 5 dwie pozycje nie mieszczą się w tych kategoriach, ani grant sprzętowy udzielony przez FNP Uniwersytetowi Gdańskiemu w ramach projektu MAB, ani „badanie walidacyjne”. Kandydatka albo nie dostaje grantów albo o nie nie aplikuje, co nie jest pozytywnym aspektem aplikacji, Kandydatka nie precyzuje jaki jest powód braku grantów, ani też nawet braku udziału w grantach.

Kandydatka brała udział w organizacji czterech konferencji naukowych. Recenzuje prace w czasopismach specjalistycznych: Proteomics (2); Communications Biology (1); Clinical proteomics (1); Journal of rapid communication in mass spectrometry (1); Journal of Chromatography A.

4. Aktywność dydaktyczna i popularyzatorska.

Działalność dydaktyczna Kandydatki jest znacząca, na każdym z dotychczasowych etapów kariery włączała się ona w dydaktykę. Od roku 2009 do 2015 oraz w roku 2018 prowadziła

cykl ćwiczeń laboratoryjnych i seminaryjnych „Wprowadzenie do chemii i analizy chemicznej” dla studentów wydziału chemii Uniwersytetu w Zagrzebiu. W czasie stażu podoktorskiego w Holandii brała udział w kursach dydaktycznych, była też promotorką lub ko-promotorką prac licencjackich (5) i magisterskich (2). W swoim ostatnim miejscu pracy podjęła się opieki promotorskiej lub współpromotorskiej nad trzema doktorantami, prace te niestety zostały przerwane. Prowadziła też opiekę nad naukowcami ze stopniem doktora, choć natury tej opieki nie sprecyzowano, podając jedynie tytuły ich projektów, niekiedy kuriozalne, jak: “opracowanie rurociągu spektrometrii masowej do wykrywania neoantygenów”, jak się zdaje mści się zaufanie do tłumaczenia maszynowego z ang. „pipeline”, co nie powinno się zdarzyć w dokumentacji habilitacyjnej. Prowadziła warsztaty popularyzujące naukę (3 razy).

Aktywność dr Dapić spełnia wymogi w zakresie działalności edukacyjnej, popularyzatorskiej i organizacyjnej.

5. Wniosek końcowy

W podsumowaniu, zdaniem recenzenta dorobek przedstawiony jako osiągnięcie naukowe p. dr Ireny Dapić wypełnia wymagania stawiane w postępowaniach w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Recenzent wnioskuje zatem o nadanie p. dr Irenie Dapić stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



prof. dr hab. Michał Dadlez