

2013 11. 08



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY

Gdańsk, 5 listopada 2013 r.

Prof. dr hab. Józef Kur
Katedra Mikrobiologii
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska

Recenzja

osiągnięcia naukowego oraz aktywności naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej

dr Doroty Kuczyńskiej-Wiśnik

w związku z postępowaniem w sprawie nadania jej stopnia doktora

habilitowanego nauk biologicznych w zakresie biologii

Formalne podstawy wniosku

Dr Dorota Kuczyńska-Wiśnik otrzymała w 1992 r. tytuł magistra biologii na Wydziale Biologii Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego (dyplom z wyróżnieniem), a następnie w 2001 roku, również na tym samym Wydziale, stopień naukowy doktora nauk biologicznych (dyplom z wyróżnieniem) w zakresie biologii na podstawie rozprawy: „Regulacja transkrypcji operonu *ibpAibpB* i rola białek IbpA i IbpB”. Promotorem rozprawy była prof. Alina Taylor. Od roku 1993 do chwili obecnej dr D. Kuczyńska-Wiśnik pracuje na Wydziale Biologii Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego w Katedrze Biochemii.

Ocena obejmuje a) osiągnięcie naukowe (określone w art. 16 ust. 2 USTAWY z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki), b) istotną aktywność naukową oraz dorobek dydaktyczny i popularyzatorski, a także współpracę międzynarodową.

Ocena osiągnięcia naukowego

Dr Dorota Kuczyńska-Wiśnik przedstawiła do oceny osiągnięcie naukowe składające się z 6 oryginalnych publikacji spójnych tematycznie pod tytułem „Białka IbpA i IbpB, jako elementy mechanizmu chroniącego komórki *Escherichia coli* przed stresem oksydacyjnym”. Wszystkie artykuły opublikowano w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. W tych publikacjach dr Dorota Kuczyńska-Wiśnik jest pierwszym autorem w 4, trzecim w 1 publikacji, czwartym w 1 publikacji oraz nie jest w żadnej publikacji autorem korespondującym. Udział Habilitantki na

wszystkich etapach przygotowania tych prac wydaje się dominujący, jednakże % udział Habilitantki podany dla każdej publikacji jest moim zdaniem niepotrzebnie zawyżony (np. praca nr 6 - 80% udziału przy 7 autorach). Ponadto, oświadczenia współautorów są w niektórych przypadkach niespójne z opisem udziału Habilitantki (np. pozycje 2, 5 i 6 – Habilitantka podaje, że Jej wkład polegał na stworzeniu koncepcji pracy, a nie na współautorstwie koncepcji, co można znaleźć w oświadczeniu prof. Laskowskiej). Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) tych prac wynosi 13,4, a liczba punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego zamyka się liczbą 145. Innym wyznacznikiem wartości naukowej komentowanych prac jest ranga czasopism, w których zostały opublikowane i tu należy wyróżnić 3 prace opublikowane w *Microbiology UK* z 5-letnim IF wynoszącym 3,173, czasopiśmie z drugiej ćwiartki w kategorii Mikrobiologia (46 pozycja).

Tematyka prac dr Doroty Kuczyńskiej-Wiśnik związana jest z badaniem udziału małych białek szoku termicznego modelowej bakterii *Escherichia coli* - IbpA i IbpB w ochronie komórki przed skutkami stresu oksydacyjnego. Białka te współdziałają z innymi białkami Hsp w kontroli procesu fałdowania nowo syntetyzowanych białek, denaturacji denaturowanych polipeptydów w warunkach stresowych lub ich degradacji, gdy uszkodzenie jest nieodwracalne. Zainteresowanie Habilitantki rolą białek IbpA i IbpB stanowi kontynuację badań rozpoczętych w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej, która dotyczyła regulacji ekspresji genów *ibpAibpB*.

W pierwszej publikacji z wykazu, której dr D. Kuczyńska-Wiśnik jest pierwszym autorem (z siedmiu) uzyskano interesujące dane wskazujące po raz pierwszy, że białka IbpA i IbpB różnią się powinowactwem do substratów. Przy braku IbpA w komórce tylko niewielka część IbpB wiązała się z agregatami białek, natomiast większość IbpB znajdowała się we frakcji białek rozpuszczalnych. IbpB pojawiało się we frakcji agregatów, gdy nadprodukowane były oba białka Ibp. Natomiast IbpA, niezależnie od obecności lub braku IbpB, pozostawało zawsze związane z agregatami. Praca ta po raz pierwszy opisuje działanie białek IbpAB *in vivo*. W przypadku tej pracy, Habilitantka wniosła istotny wkład w planowanie i wykonanie większości doświadczeń oraz w pisaniu manuskryptu, podany wkład 75% uważam za zgodny z oświadczeniami licznych współautorów.

W kolejnej wieloautorskiej pracy (6 autorów, pozycja 2) Habilitantka jest pierwszym autorem i ocenia Jej wkład na 80%, co w świetle oświadczeń współautorów wydaje się oceną przeszacowaną. W pracy tej przedstawiono badania wpływu IbpAB na aktywność enzymów tworzących ciała inkluzyjne i stwierdzono, że IbpAB chroni enzymy przed utratą aktywności. W żadnym z badanych układów brak białek IbpAB nie wpływał ani na poziom nadprodukcji rekombinowanych białek ani też tworzonych ciał inkluzyjnych. Uzyskane wyniki wskazują, że IbpAB wiążąc się do swoich substratów nie tylko chronią je przed nieodwracalną agregacją, ale również pomagają zachować tym białkom natywną

konformację w agregatach.

W trzeciej publikacji opublikowanej w *Microbiology* udział Habilitantki został oceniony przez nią na 40% (3 współautor), co też wydaje się trochę za dużo (udział w wykonaniu tylko niektórych doświadczeń). Praca ta jest kluczowa w realizowanej tematyce i niewątpliwie miała znaczenie dla później realizowanych projektów. Podjęto się wyjaśnienia roli IbpAB w ochronie komórki bakteryjnej przed skutkami stresu oksydacyjnego. Zaobserwowano, że brak białek IbpAB powoduje wzrost wrażliwości bakterii na jony Cu^{2+} , podwyższony poziom utlenionych białek, wśród których najsilniej agregujące zidentyfikowano jako dehydrogenazę alkoholową. Zaproponowano potencjalny mechanizm ochronny, zgodnie z którym udział IbpAB w ochronie białek *E. coli* przed stresem oksydacyjnym polega zarówno na bezpośrednim oddziaływaniu z uszkodzonymi białkami, jak i na zapobieganiu powstawaniu reaktywnych form tlenu poprzez wiązanie jonów miedzi.

Czwarta publikacja przedstawiona przez Habilitantkę dotyczy badań nad rolą białek IbpAB w ochronie komórki przed skutkami stresu termicznego i oksydacyjnego stosując dehydrogenazę alkoholową jako modelowy substrat. Podany 40% udział w tej pracy Habilitantki uważam za przeszacowany (wykonanie części doświadczeń). W tej pracy wykazano, że w warunkach tlenowych IbpAB chronią dehydrogenazę alkoholową przed inaktywacją podczas szoku termicznego. Zaskakującym wynikiem było jednak to, że nasilona inaktywacja i oksydacja dehydrogenazy alkoholowej po szoku termicznym w komórkach mutanta *ΔibpAibpB* nie była powiązana z podwyższoną agregacją enzymu i opóźnionym usuwaniem powstałych po szoku agregatów enzymu. Wysunięto hipotezę, że IbpA i/lub IbpB nie uczestniczą w usuwaniu z agregatów nieodwracalnie utlenionych białek przeznaczonych do degradacji, a ich działanie sprowadza się do ochrony dehydrogenazy alkoholowej przed oksydacją i inaktywacją, a tym samym utrzymania enzymu w postaci rozpuszczalnej.

W publikacji nr 5 wykazu przedstawiono dowody na to, że IbpAB przyspieszają powstawanie biofilmu *E. coli* hamując pośrednio produkcję indolu - jednej z cząsteczek sygnałowych, która zapobiega adhezji komórek do podłoża. Brak IbpAB naraża komórki na endogenny stres oksydacyjny, co prowadzi do nadprodukcji tryptofanazy i wzrostu poziomu indolu. W pracy tej udział Habilitantki jest niewątpliwie dominujący (oceniony na 75%), dr Dorota Kuczyńska-Wiśnik współtworzyła koncepcję pracy, zaplanowała i wykonała praktycznie wszystkie eksperymenty i brała udział w napisaniu pracy.

W ostatniej pracy cyklu (pozycja nr 6) Habilitantka wykazała, że niektóre antybiotyki w stężeniach subletalnych hamują tworzenie biofilmu przez *E. coli* na powierzchni PCV. Potwierdzono, że w tych warunkach bakterie narażone są na endogenny stres oksydacyjny, co prowadziło do indukcji *tnaA*, a w efekcie podwyższonego wydzielania indolu. Ponadto, brak tryptofanazy (szczep *ΔtnaA*) lub obecność przeciwutleniaczy takich jak DMSO częściowo przywracało tworzenie biofilmu w obecności badanych antybiotyków. Stąd

udowodniono, że hamowanie formowania biofilmu przez antybiotyki, które powodują wzrost poziomu reaktywnych form tlenu w komórce bakteryjnej, jest procesem częściowo zależnym od indolu. W tej pracy bez wątpienia udział Habilitantki jest dominujący.

Reasumując, stwierdzam, że otrzymane przez Habilitantkę wyniki są wartościowe i interesujące, a część z tych badań jest pionierska w Polsce. Wkład Habilitantki w poszczególne prace składające się na osiągnięcie naukowe nie był we wszystkich przypadkach wiodący, to jednak poziom naukowy tych prac i ranga czasopism, w których zostały opublikowane jednoznacznie determinują moją pozytywną ocenę.

Osiągnięcie naukowe złożone z cyklu jednotematycznych publikacji dr Doroty Kuczyńskiej-Wiśnik uzyskane po otrzymaniu stopnia doktora stanowi znaczny wkład autorki w rozwój biologii molekularnej drobnoustrojów i spełnia zatem wymagania art.16 ust. 2 USTAWY.

Ocena istotnej aktywności naukowej

Na całkowity dorobek naukowy, łącznie z pracami wskazanymi przez Habilitantkę jako osiągnięcie naukowe, składa się łącznie 19 prac (w tym 4 przeglądowne) o łącznej liczbie cytowań 298 i indeksie Hirscha 10 oraz sumarycznym IF: 46,375.

Wszystkie publikacje oryginalne Habilitantki ukazały się w międzynarodowych czasopismach z listy filadelfijskiej o wysokiej randze.

Dwie z tych prac to prace eksperymentalne, które zostały opublikowane przed doktoratem i dotyczyły badań nad powstawaniem i usuwaniem z komórki agregatów zdenaturowanych termicznie białek - tzw. frakcji S oraz badań nad regulacją ekspresji genów *ibpA* i *ibpB*. Najważniejsze wyniki z tych prac to: stwierdzenie, że zagregowane białka frakcji S są substratami HtrA - proteazy szoku termicznego oraz wykazanie obecności czynnego dodatkowego promotora operonu *ibpA/ibpB* rozpoznawanego przez podjednostkę polimerazy RNA – σ^{54} oraz charakterystycznych dla tego typu promotorów miejsc regulatorowych (wzmacniacza - *enhancera* i miejsca wiązania czynnika IHF). To ostatnie odkrycie było szczególnie cenne ze względu na to, że gen *ibpB* stanowił drugi, po opisanym w 1991 roku operonie *psp* (*phage shock proteins*), element regulonu szoku termicznego kontrolowanego przez σ^{54} . Wyniki tej pracy, w której dr D. Kuczyńska-Wiśnik jest pierwszym autorem, są ściśle związane z tematyką Jej pracy doktorskiej.

Trzydzieści oryginalnych prac, o łącznym IF 33,613 zostało opublikowanych po obronie rozprawy doktorskiej: 5 prac w *Microbiology*, 2 prace w *Acta Biochimica Polonica*, 2 w *Research in Microbiology* i po 1 w *Current Microbiology*, *Journal of Biological Chemistry*, *FEBS Letters*, *PLoS ONE* oraz *Polish Polar Research*. Prace te reprezentują bardzo spójną tematykę związaną z odpowiedzią komórki bakteryjnej na stres. W siedmiu pracach oryginalnych (1 z prac wykazanych przez Habilitantkę w autoreferacie jest pracą

przeładową), które nie włączono do „osiągnięcia naukowego” Habilitantki, dr D. Kuczyńska-Wiśnik nie pełni dominującej roli (nie jest pierwszym autorem). Jedynie dość znaczący wkład Habilitantki widoczny jest w pracy w PLoS ONE (2012), w której jest jednym z pomysłodawców pracy i wykonawcą części doświadczeń (30% udział). Największym osiągnięciem Habilitantki w tej pracy jest wykazanie, że wzrost liczby komórek *persisters* (czyli subpopulacji obejmującej bakterie o zwolnionym metabolizmie i podwyższonej tolerancji na antybiotyki) jest skorelowany z poziomem agregatów białkowych pojawiających się w starzejących się hodowlach bakteryjnych. Wyniki wskazują, że kluczowym etapem w procesie powstawania *persisters* jest pojawianie się nieprawidłowo sfałdowanych białek i ich agregacja.

Stosunkowo nieliczne doniesienia (12) na kongresach i zjazdach międzynarodowych i krajowych, świadczą o stosunkowo niskiej aktywności Habilitantki w tym obszarze. Warto tutaj wspomnieć jedynie o międzynarodowych konferencjach na których Habilitantka prezentowała wyniki swoich prac: *26th Meeting of the Federation of Biochemical Societies*, Nicea, Francja; *18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology: Beyond the Genome*, Birmingham, Wlk. Brytania oraz *2nd World Conference of Stress*, Budapeszt, Węgry.

Podsumowując, dorobek naukowy (łącznie publikacjami z „osiągnięcia naukowego”) dr Doroty Kuczyńskiej-Wiśnik stanowi istotny wkład w rozwój biologii molekularnej bakterii, szczególnie w badaniach mechanizmów fałdowania białek, regulacji tego procesu i mechanizmami odpowiedzi komórki na stres. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie w tym celu różnorodnych i nowoczesnych narzędzi biologii molekularnej.

Ocena dorobku dydaktycznego, organizacyjnego, popularyzacji nauki oraz współpracy międzynarodowej

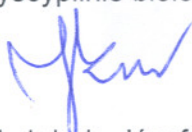
Dr Dorota Kuczyńska-Wiśnik wypełniała obowiązki dydaktyczne w latach 1994- do chwili obecnej i prowadziła ćwiczenia z Biochemii dla kierunku studiów Biologia (od 1994, udział w opracowaniu programu ćwiczeń), ćwiczenia z Fizyki z elementami biofizyki dla kierunku Biologia (od 2011, udział w opracowaniu programu ćwiczeń), Pracownia dyplomowa dla studentów III roku Biologii (od 1999), wykład „Metody znakowania cząsteczek biologicznych” (przygotowanie i prowadzenie wykładu), wykład monograficzny „Współczesne metody biologii molekularnej” (przygotowanie i prowadzenie wykładu). Habilitantka była promotorem 5 prac magisterskich oraz sprawowała opiekę merytoryczną nad 2 pracami licencjackimi. Była koordynatorem w ramach Katedry Biochemii UG Bałtyckiego Festiwalu Nauki, „Nocy Biologów”, Dni otwartych na Wydziale Biologii UG. Przygotowała realizowała wykłady promujące wiedzę biologiczną pt. „Współczesne metody biologii molekularnej czyli jak znaleźć przestępcę” w ramach projektu „Zaproś naukowca do szkoły” – od 2010 roku. Przedstawiła 6 wykładów dla uczniów szkół średnich - Przygotowanie i realizacja warsztatów

edukacyjnych dla uczniów szkół licealnych pt. „Co się dzieje z białkami w przewodzie pokarmowym” w ramach projektu „Poznaj pracę biologa” – od 2011 r.

Dr D. Kuczyńska-Wiśnik nie współpracuje z żadnym partnerem zagranicznym, a także trudno znaleźć informacje o współpracy z krajowymi ośrodkami naukowymi.

Biorąc pod uwagę ocenę osiągnięcia naukowego, aktywności naukowej oraz ocenę dorobku dydaktycznego, popularyzatorskiego, organizacyjnego stwierdzam, że osiągnięcia dr Doroty Kuczyńskiej-Wiśnik spełniają wymogi stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biologia określone w art. 16 USTAWY z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr.65, poz.595, z póź. zm.)

Wnoszę wniosek do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie dr Dorocie Kuczyńskiej-Wiśnik stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk biologicznych w dyscyplinie biologia.



prof. dr hab. Józef Kur