

2016 06. 20

Wrocław, 19 czerwca 2016 r.

Prof. dr hab. Mariusz Olczak
Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Wrocławskiego
Mariusz.Olczak@uwr.edu.pl
Tel. 71-3752-710

OCENA

osiągnięcia naukowego pt.: „ Analiza porównawcza endonukleazo-metylotrasferaz z rodziny enzymów, pochodzących z bakterii rodzaju *Thermus*” oraz dorobku naukowo-dydaktycznego i organizacyjnego **dr nauk biologicznych Agnieszki Żylicz-Stachuli**, adiunkta zatrudnionego w Pracowni Inżynierii Genetycznej, Katedry Biotechnologii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

Po zapoznaniu się z dokumentacją otrzymaną w postaci oryginalnego opracowania w wersji papierowej i elektronicznej (płyta CD), zawierającego:

- autoreferat dr **Agnieszki Żylicz-Stachuli** przedstawiający Jej osiągnięcia naukowe, dydaktyczne i organizacyjne,
- kopie prac naukowych dr **Agnieszki Żylicz-Stachuli**,
- wykaz publikacji i oświadczenia o wkładzie własnym współautorów,
- informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej, stażach naukowych oraz o popularyzacji nauki
- kopię dyplomu dr nauk biologicznych w zakresie biochemii

ustaliłem co następuje:

Pani dr Agnieszka Żylicz-Stachula ukończyła studia na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego przedstawiając pracę magisterską pt. „Izolacja nowych endonukleaz restrykcyjnych z termofilnych bakterii rodzaju *Bacillus*”, której promotorem był dr hab. Stanisław Żońnierowicz. Co ciekawe, eksperymentalna część pracy została wykonana w firmie Eurx, z którą dr Agnieszka Żylicz-Stachula była związana przez wiele lat. Tytuł doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii uzyskała w roku 2007, broniąc pracę zatytułowaną „Termofilna endonukleaza restrykcyjna TspGWI – nowa specyficzność na pograniczu trzech klas bakteryjnych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych” w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Promotorem rozprawy doktorskiej był prof. Janusz Bujnicki z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Podobnie jak w przypadku pracy magisterskiej, część eksperymentalną wykonano w firmie Eurx, gdzie Habilitantka pracowała do 2006

roku. W latach 2007-2012 Pani dr Żylicz-Stachula była zatrudniona w Zakładzie Teoretycznej Chemii Fizycznej Katedry Chemii Fizycznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, początkowo jako asystent, później w charakterze adiunkta. Od 2012 roku pracuje jako adiunkt na tym samym wydziale ale w Pracowni Inżynierii Genetycznej, Katedry Biotechnologii Molekularnej.

Ocena osiągnięcia naukowego

Pani dr **Agnieszka Żylicz-Stachula** przedstawiła do oceny zestaw 7 prac naukowych pod wspólnym tytułem „Analiza porównawcza endonukleazo-metylotransferaz z rodziny enzymów, pochodzących z bakterii rodzaju *Thermus*”:

1. **Żylicz-Stachula, A.**, Żebrowska J., Czajkowska, E., Wrese, W., Sulecka, E., Skowron, P.M. *Mol Biol Rep* (2016); DOI: 10.1007/s11033-016-3949-3
2. **Żylicz-Stachula, A.**, Żołnierkiewicz, O., Śliwińska, K., Jeżewska-Fraćkowiak, J., Skowron, P.M. *Microb Cell Fact* (2014), 13:7
3. **Żylicz-Stachula, A.**, Jeżewska-Fraćkowiak, J., Skowron, P.M. *Mol Biol Rep* (2014), 41(4):2313-2323
4. **Żylicz-Stachula, A.**, Żołnierkiewicz, O., Jasiński, J., Skowron, P.M. *BMC Genomics* (2013), 14: 370.
5. **Żylicz-Stachula, A.**, Żołnierkiewicz, O., Lubys, A., Ramanauskaite, D., Mitkaite, G., Bujnicki, J.M., Skowron, P.M. *BMC Mol Biol* (2012), 13:13.
6. **Żylicz-Stachula, A.**, Żołnierkiewicz, O., Śliwińska, K., Jeżewska-Fraćkowiak, J., Skowron, P.M. *BMC Biochemistry* (2011), 12:62.
7. **Żylicz-Stachula, A.**, Żołnierkiewicz, O., Jeżewska-Fraćkowiak, J., Skowron, P.M. *Biotechniques* (2011), 50(6), 397-406.

A. Czy tematyka osiągnięcia naukowego jest spójna ?

Przystępując do oceny zaproponowanego zestawu publikacji po pierwsze należy zbadać, czy tematyka naukowa tych prac jest spójna. W tym przypadku nie ma co do tego wątpliwości. Wszystkie prace dotyczą charakterystyki bakteryjnych białek typu endonukleaz-metylotransferaz, unikalnych enzymów pochodzących z termofilnych bakterii rodzaju *Thermus*.

B. Główne osiągnięcie naukowe - ocena najważniejszych wyników

Badania enzymów restrykcyjnych, izolowanych głównie z mezofilnych szczepów bakteryjnych, zrewolucjonizowało biologię molekularną, dając narzędzia dla prawie każdej dziedziny związanej z manipulacjami DNA, takich jak chociażby klonowanie, mutagenesa, praktyczne zastosowanie wielu technik opatych na PCR, etc. Oczywiście ich wykrycie dało także szerokie możliwości dla podstawowych analiz biologicznych, dotyczących mechanizmów obronnych mikroorganizmów. Jest oczywiste, że, jak pisze w autoreferacie Autorka, "enzymy te stanowią doskonały model do badań strukturalno-funkcjonalnych oddziaływań białko – DNA oraz do badań mechanizmów warunkujących specyficzne rozpoznawanie sekwencji DNA".

Większość restryktaz izolowano z bakterii mezofilnych. Poznanie odpowiedników z bakterii termofilnych mogło by być jednak korzystne. Można analizować, które sekwencje (struktury) są odpowiedzialne za termostabilność białka, wykorzystując aktywne enzymy jako model badawczy. Termostabilne restryktazy mogą być użyteczne jako narzędzie w reakcjach *in vitro*, działając w wysokich temperaturach (np.: w PCR). Habilitantka od początku swojej kariery naukowej zajmuje się biochemią enzymów restrykcyjnych. Warto zauważyć, że należy do najbardziej aktywnych naukowo osób, które w zespole profesora Skowrona analizuje nową grupę enzymów o unikalnych właściwościach. Ich źródłem są termofilne bakterie należące do rodzaju *Thermus*. Enzymy te, odkryte i szczegółowo analizowane w grupie badawczej, do której należy dr Żylicz-Stachula, posiadają

domenę endonukleazową oraz metylotransferazową w jednym łańcuchu polipeptydowym. Zauważono, że białka te charakteryzują się stosunkowo dużym podobieństwem sekwencji aminokwasowej mimo rozpoznawania różnych sekwencji DNA. Jak twierdzi Habilitantka, z tego powodu stanowią one doskonały model do badań skomplikowanych zależności pomiędzy sekwencją rozpoznawaną, strukturą białka a jego termostabilnością oraz do badań ewolucyjnych. W odkryciu i charakterystyce wspomnianej grupy białek Pani dr Żylicz-Stachula pełniła ważną rolę. Wyizolowała unikalny enzym RM.TspDTI z komórek termofilnej bakterii *Thermus sp.* (tutaj należy zaznaczyć, że nie był to jedyny enzym, wyizolowany przez dr Żylicz-Stachulę). Jego ilość wystarczyła do zsekwencjonowania N-terminalnego końca polipeptydu oraz jego fragmentów peptydowych uzyskanych po trawieniu trypsyną. Na podstawie tych informacji, klasycznymi technikami biologii molekularnej (projektowanie starterów, specjalizowane reakcje PCR, klonowanie do *E.coli*) uzyskano rekombinowane białko a oczyszczony enzym RM.TspDTI scharakteryzowano pod względem biochemicznym. To duże osiągnięcie, ponieważ zastosowane procedury nie były całkiem typowe a niewątpliwie zostały dobrze zaplanowane i wykonane. Poza tym, moim zdaniem na wyróżnienie zasługują osoby, które w równym stopniu operują w laboratorium klasycznymi technikami biochemicznymi (stosowanymi np.: podczas oczyszczania białek) i równocześnie są biegłe w technikach genetycznych. Wbrew pozorom, nie ma w tej chwili wielu takich specjalistów.

Drugim, moim zdaniem bardzo ciekawym wynikiem, było sklasyfikowanie restryktaz rodzaju *Thermus* na podstawie ich budowy domenowej, sekwencji oraz specyficzności enzymatycznej. We współpracy z prof. Januszem Bujnickim przeprowadzono analizę bioinformatyczną, która wykazała, że białko RM.TspDTI jest białkiem fuzyjnym, charakteryzującym się podobieństwem sekwencji aa do enzymów RM.Tth111II, RM.TthHB27I i RM.Tsol. Określono rodzaj i budowę domen w tych białkach. a także zidentyfikowano prawdopodobną lokalizację elementów struktur odpowiedzialnych za oddziaływanie z DNA. Chociaż nie wszystkie badania się powiodły (np.: próba nadprodukcji mutantów, zmienionych w przewidywanych miejscach rozpoznawania DNA), to odkrycie i uporządkowanie naszej wiedzy dotyczącej tej grupy enzymów wydaje się dużym osiągnięciem. Analizując sekwencje badanych białek zespół badawczy, w którym dr. Żylicz-Stachula była jedną z wiodących osób, zaproponował bardzo prawdopodobną hipotezę o możliwości transferu horyzontalnego pomiędzy bakteriami mezofilnymi a termofilami rodzaju *Thermus*. Kolejnym ważnym dokonaniem było użycie zaawansowanych metod inżynierii genetycznej (związanych między innymi z zaprojektowaniem syntetycznego genu ze zmienionymi kodonami), które doprowadziło do nadprodukcji białka TaqII oraz jego biochemicznej charakterystyki. Być może jest to największe osiągnięcie opisane w zaproponowanym zestawie publikacji. Zostało bardzo dobrze zaplanowane i perfekcyjnie doprowadzone do końca.

Także inne prace zasługują na uwagę. Dr Żylicz-Stachula brała udział w charakteryzowaniu specyficzności substratowej restryktaz. Bardzo ciekawe doświadczenia dotyczą różnic w rozpoznawaniu sekwencji DNA w enzymach natywnych i rekombinowanych. Autorka pokusiła się o przedstawienie hipotez tego unikalnego zjawiska. W kolejnych pracach opisano zmiany w aktywności nukleaz TaqII i TspGWI pod wpływem niektórych drobnocząsteczkowych ligandów. Warto zauważyć, że prace w większości opisanych tematów są kontynuowane. Z najnowszych rezultatów warto wspomnieć o próbach krystalizacji kompleksu restryktaza-DNA czy też o izolacji nowej restryktazy TaqIII z *T.aquaticus*.

C. Udział w zaproponowanym zestawie prac oraz jakość tych prac

Należy podkreślić, że w publikacjach Habilitantka jest zawsze pierwszym autorem a Jej udział jest znaczący we wszystkich pracach (45%-60%). W dwóch z nich Pani dr Żylicz-Stachula jest autorem korespondencyjnym. Renoma czasopism, w których publikowano załączone prace, jest wysoka ('impact factor' w granicach 2-4), chociaż brak jest publikacji w czasopismach z „najwyższej półki”. Sumaryczny IF wynosi ok. 20, co jest bardzo dobrym wynikiem. Wspomniane prace były tylko sporadycznie cytowane, chociaż z drugiej strony trudno wymagać, aby cytowań było bardzo dużo,

jeśli prace opublikowano w ostatnich kilku latach (2011- 2015). Pewne (relatywnie drobne) nieścisłości wkradły się w oświadczenia współautorów, dotyczących wkładu pracy w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego. Mimo starań, autorce nie udało się otrzymać oświadczeń od dwóch zagranicznych współautorek pracy nr 5 (D. Ramanauskaite i G. Mitkaite). Poza tym, nie ma oświadczenia Pani Weroniki Wrese (praca nr 1). Trudno też ocenić wkład pracy poszczególnych współautorów, jeśli nie wyszczególnia się wkładu procentowego wszystkich osób. Być może nie jest to wymagane (szczegółowo opisano wkład poszczególnych osób) ale byłoby bardzo pomocne. Wydaje się jednak, że wszystkie powyższe uwagi nie podważają w zasadniczy sposób znaczącej roli dr Żylicz-Stachuli we wszystkich siedmiu zaproponowanych do oceny publikacjach.

D. Podsumowanie

Nie ma wątpliwości, że Habilitantka jest niewątpliwie jedną z czołowych badaczy restryktaz, izolowanych z bakterii termofilnych. Wielokrotnie po raz pierwszy opisywała unikalne własności tej grupy enzymów. Osiągnięcie naukowe prezentowane tutaj jako podstawa do uzyskania tytułu doktora habilitowanego, należy ocenić bardzo wysoko. **Prezentowane prace w pełni spełniają warunki dla uznania osiągnięcia naukowego dr Agnieszki Żylicz-Stachuli jako spełniającego wymogi zawarte w odpowiednich ustawach i rozporządzeniach.**

Ogólna ocena dorobku naukowego oraz rozwoju naukowego

A. Ocena dorobku naukowego

Ogólny dorobek naukowy Habilitantki jest bardzo dobry. Dr Agnieszka Żylicz-Stachula jest współautorką 19 prac (z tego 7 wchodzi w skład osiągnięcia habilitacyjnego), w dobrych lub bardzo dobrych czasopismach naukowych. Obok tych 7 publikacji, do najlepszych należą dwie współautorskie prace w prestiżowym Nucleic Acid Research, zawierające między innymi wyniki uzyskane podczas doktoratu. Wracając do pracy na Uniwersytecie Gdańskim, Pani dr Żylicz-Stachula na kilka lat zmieniła nieco swój profil badawczy, podejmując pracę w zespole profesora Raka. Wyniki, głównie o charakterze biofizycznym i strukturalnym (z możliwościami aplikacyjnymi) opisano w 5 publikacjach o zasięgu międzynarodowym. Sumaryczny IF wszystkich prac Habilitantki (19 prac, z tego 10 jako pierwszy autor), wynosi ok. 60, co jest wynikiem wyróżniającym, zdecydowanie ponadprzeciętnym. Niejasne jest więc, dlaczego cytowano je tylko 87 razy (a bez autocytowań - zaledwie 25 razy), Indeks Hirscha też jest niewysoki (6). To dosyć przeciętny wynik, ale być może tematyka badawcza Habilitantki jest nieco niszowa i unikalna, co nie pozwala na częste cytowania. Warto zauważyć, że Pani Dr Żylicz-Stachula miała całkiem spory udział (zwykle 10-20%) w niektórych osiągnięciach naukowych spoza prac, wskazanych jako habilitacyjne osiągnięcie naukowe. Podsumowując, należy stwierdzić, że ogólny dorobek publikacyjny należy uznać za bardzo dobry, mimo skromnej liczby cytowań.

Pani dr Żylicz-Stachula brała udział w bardzo wielu konferencjach naukowych, zarówno krajowych jak i zagranicznych. Nie jest jasne, ile razy wygłaszała referat a ile razy były to prezentacje plakatowe.

B. Udział w projektach naukowych, staże naukowe oraz otrzymane wyróżnienia naukowe

Pani dr Żylicz-Stachula była kierownikiem dwóch wewnętrznych (uczelnianych) projektów, które tematyką były związane z habilitacyjnym osiągnięciem naukowym. Była (lub jest) wykonawcą w 7 innych projektach badawczych (w tym w 4 w ramach projektów o charakterze badawczo-rozwojowym). Nieco gorzej przedstawia się sytuacja dotycząca skuteczności w zdobywaniu środków na badania naukowe, szczególnie w ostatnich kilku latach. Praktycznie wszystkie aplikacje grantowe, składane jako potencjalny kierownik projektów, zostały odrzucone na różnych etapach ich ewaluacji. Prawdę mówiąc, nie bardzo rozumiem, dlaczego tak się stało. Zarówno dotychczasowy dorobek Habilitantki, jak i przesłany do oceny autoreferat, świadczy, moim zdaniem, o dużej dojrzałości naukowej dr Żylicz-Stachuli i potrzebie finansowania tego typu badań.

Trochę niepokojący jest także fakt, że w trakcie swojej dotychczasowej kariery naukowej Pani dr Żylicz-Stachula nie odbyła żadnego długoterminowego stażu w innej jednostce naukowo-dydaktycznej. Jedyne dwukrotnie przebywała na krótkich, 1-2 miesięcznych stypendiach naukowych. Pragnę zauważyć, że wprawdzie nie ma takiego formalnego wymogu przy przygotowaniu dokumentów habilitacyjnych, jednak w wielu wiodących polskich instytutach badawczych długoterminowy staż naukowy (typu „posdoc”) jest mniej lub bardziej formalnym, niezbędnym wymogiem dla osoby starającej się o pozycję samodzielnego pracownika naukowego. Nie jest bowiem dobrą praktyką tzw. „chów wsobny” naukowców, związanych raz na zawsze tylko z jedną instytucją naukową. Jednakże w tym konkretnym przypadku nie należy tego mocno krytykować, biorąc pod uwagę doświadczenie autorki uzyskane podczas długoletniej pracy w firmie biotechnologicznej Eurx (wraz ze współpracą z ośrodkami zagranicznymi). Dość skromnie wygląda dorobek dr Żylicz-Stachuli jako recenzentki projektów badawczych i prac w czasopiśmie naukowych. Autoreferat wykazuje tylko 2 recenzje wykonane dla periodyków naukowych. Habilitantka nie brała udziału w ocenie jakichkolwiek wniosków grantowych.

Ocena dorobku dydaktycznego, organizacyjnego i popularyzatorskiego

Nie ma żadnych wątpliwości, że dr Żylicz-Stachula jest osobą mocno zaangażowaną w kształcenie studentów. Jej aktywność dydaktyczna obejmuje prowadzenie kilku wykładów fakultatywnych o zadziwiająco różnorodnej tematyce (poczynając od diagnostyki medycznej, poprzez biologię molekularną, kończąc na biotechnologii środowiska i fizykochemii molekuł). Na Wydziale Chemii UG prowadzi także wykłady mniej specjalistyczne dla szerszego grona studentów chemii (Podstawy biologii komórki eukariotycznej), co świadczy o szerokich horyzontach Habilitantki, niekoniecznie skupiającej się w swojej pracy dydaktycznej na tematyce termofilnych bakterii. Pani dr Agnieszka Żylicz-Stachula prowadzi także seminarium licencjackie i magisterskie dla studentów kierunku Chemia. Niewątpliwie w zespole badawczym, w którym jest zatrudniona, pełni ważne role jako dydaktyk. W ramach opieki naukowej nad studentami, wypromowała 7 magistrów (w latach 2012-16) a aktualnie jest opiekunem kolejnych 4 magistrantów. Była także promotorem 6 prac licencjackich. Biorąc pod uwagę, że pracuje na kierunku eksperymentalnym, gdzie opieka nad studentami jest bardzo czasochłonna i pracochłonna, dorobek ten jest całkiem niezły. Habilitantka brała także udział w popularyzacji nauki, chociaż nie jest to zapewne Jej główny cel pracy na uczelni. Kilukrotnie uczestniczyła w organizacji Dni Otwartych Wydziału Chemii UG oraz brała udział w cyklu pokazów dla uczniów szkół podstawowych. Wydaje się, że jest także dobrym organizatorem, stopniowo tworząc swoją własną grupę badawczą, zajmującą się termostabilnymi systemami

restrykcyjno-modyfikacyjnymi. Jestem przekonany, że Pani dr Agnieszka Żylicz-Stachula jest osobą niezbędną w swojej macierzystej grupie badawczej zarówno jako dobry dydaktyk jak i organizator.

Podsumowanie

Do wyróżniających się aspektów wniosku habilitacyjnego Pani dr Agnieszki Żylicz-Stachuli należy niewątpliwie bardzo dobra jakość i renoma prac naukowych, wskazanych jako osiągnięcie habilitacyjne. Lista siedmiu publikacji ma spójną tematykę, we wszystkich pracach Habilitantka jest pierwszym autorem, a jej deklarowany wkład pracy nie budzi większych zastrzeżeń. Należy stwierdzić, że oceniane osiągnięcie habilitacyjne znacząco przewyższa średnią dla wniosków habilitacyjnych z zakresu nauk biologicznych i jest naprawdę godne wyróżnienia. Na podkreślenie zasługuje także zaangażowanie w działalność dydaktyczną, szczególnie w pracy z licencjuszami i magistrantami (biorąc pod uwagę fakt, że Pani dr Żylicz-Stachula stosunkowo krótko pracowała jako asystent naukowy i adiunkt). Nieco gorzej (co oczywiście nie oznacza, że negatywnie) należy ocenić pozostały dorobek naukowy (mimo dużej renomy prac, w których Habilitantka miała swój udział), szczególnie relatywnie małą liczbę cytowań, z czego większość to autocytaowania. Szkoda też, że Habilitantka nie odbyła żadnego długoterminowego stażu zagranicznego w instytucji naukowej ale jest to zrozumiałe, biorąc pod uwagę jej długoletnią pracę w firmach biotechnologicznych.

Jednakże, mimo moich nielicznych uwag, jestem przekonany, że przedstawione do oceny osiągnięcie habilitacyjne Pani dr Agnieszki Żylicz-Stachuli pt.: „Analiza porównawcza endonukleazometylotransferaz z rodziny enzymów, pochodzących z bakterii rodzaju *Thermus*” oraz ocena Jej dorobku naukowego, dydaktycznego oraz organizacyjnego spełniają warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2014 r., poz. 1852 ze zm.) oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2001 r. w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego (Dz.U. Nr 196, poz. 1165), a także w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2015, poz. 1842).

Prof. dr hab. Mariusz Olczak
Uniwersytet Wrocławski

