



2016 06. 20

prof. dr hab. Artur Jarmołowski
Zakład Ekspresji Genów
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu
ul. Umultowska 89
61-614 Poznań
tel. 61 829 5959
faks 61 829 5949
e-mail: artjarmo@amu.edu.pl

Poznań, 16.06.2016

Ocena osiągnięcia naukowego, pozostałego dorobku naukowego i działalności dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzacyjnej dr Agnieszki Żylicz-Stachuli, w związku z ubieganiem się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauki biologiczne w dyscyplinie biologia

Uwagi wstępne

Doktor Agnieszka Żylicz-Stachula ukończyła studia na kierunku biotechnologia na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w 2000 roku, uzyskując tytuł magistra biotechnologii. W 2007 roku uzyskała stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia na podstawie rozprawy doktorskiej „Termofilna endonukleaza restrykcyjna TspGW1 – nowa specyficzność na pograniczu trzech klas bakteryjnych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych”, a promotorem Jej pracy doktorskiej był prof. dr hab. Janusz Bujnicki. Przewód doktorski prowadził Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. W latach 1999-2006 Kandydatka pracowała w firmie biotechnologicznej EURx Sp. z o.o., w latach 2007-2008 w Zakładzie Teoretycznej Chemii Fizycznej na Wydziale Chemii UG na stanowisku asystenta, w latach 2008-2012 pracowała w tym samym zakładzie na etacie adiunkta, a od roku 2012 jest zatrudniona jako adiunkt w Pracowni Inżynierii Genetycznej, w ramach Katedry Biotechnologii Molekularnej na Wydziale Chemii UG. Po zapoznaniu się z dostarczoną dokumentacją stwierdzam, że zostały spełnione przez



Kandydatkę wszystkie warunki formalne, by ubiegać się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauki biologiczne w dyscyplinie biologia.

Ocena osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe dr Agnieszki Żylicz-Stachuli nosi tytuł: „Analiza porównawcza endonukleazo-metylotransferaz z rodziny enzymów, pochodzących z bakterii rodzaju *Thermus*” i stanowi je cykl siedmiu publikacji spójnych tematycznie, o tematyce dobrze odzwierciedlonej przez tytuł osiągnięcia.

Osiągnięcie naukowe Kandydatki obejmuje prace nad rodziną homologicznych enzymów restrykcyjnych (z typu IIC), zidentyfikowanych przez dr Agnieszka Żylicz-Stachulę wraz z pozostałymi członkami zespołu, a występujących w termostabilnych bakteriach rodzaju *Thermus*. Enzymy te charakteryzują się obecnością domen ENazy i metylotransferazy na jednym łańcuchu polipeptydowym. Należy zaznaczyć, że prace nad pierwszym enzymem z omawianej grupy (RM.TspGW1) dr Agnieszka Żylicz-Stachula rozpoczęła i ujęła w pracy doktorskiej, a także opublikowanym później artykule, który nie wchodzi w skład osiągnięcia naukowego. W ramach osiągnięcia naukowego wyizolowała z bakterii *Thermus sp.* DT kolejny enzym restrykcyjny (RM.TspDT1), zidentyfikowała jego gen i opracowała protokół wydajnej produkcji tego enzymu w *E. coli*. Po porównaniu budowy nowego enzymu z pierwszym uzyskanym jeszcze w ramach pracy doktorskiej okazało się, że pomimo znacznych różnic w sekwencji aminokwasowej obu białek wykazują one znaczne podobieństwo biochemiczne i rozpoznają bardzo podobne sekwencje DNA. Obserwacja ta pozwoliła na wyłonienie dwóch podrodzin badanych enzymów, do których następnie Autorka przyporządkowywała kolejne zidentyfikowane w bazach danych enzymy restrykcyjne, nie tylko pochodzące z bakterii rodzaju *Thermus*. Mało tego, enzymy te zostały zidentyfikowane w bakteriach mezofilnych, co Autorka tłumaczy horyzontalnym transferem genów z bakterii mezofilnych do bakterii termofilnych.

W innej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego Autorka opisuje zsyntetyzowanie sztucznego genu bifunkcjonalnego enzymu ENazy/MTazy RMTaqII, który ulegałby wydajnej ekspresji w *E. coli*. Wymieniono 65% kodonów na inne synonimiczne kodony, zmniejszając procentowy udział par GC i zmniejszając prawdopodobieństwo powstawania struktur drugorzędowych w mRNA. W konstrukcji syntetycznego genu zastosowano metodę zamiany kodonów, w której nie wybierano tych najbardziej optymalnych dla *E. coli*, ale suboptymalne, tak by nadekspresyjowany enzym nie był toksyczny dla komórki gospodarza. Gen ten, będąc pod indukowanym



promotorem, ulegał 10-krotnie podwyższonej ekspresji niż gen natywny. Ta ciekawa, oryginalna procedura pozwoliła na izolację dużych ilości badanego enzymu (w bakteriach *Thermus sp.* DT enzym ten ulega ekspresji na bardzo niskim poziomie), na oznaczenie aktywności i dokonanie charakterystyki biochemicznej enzymu. RM.TaqII charakteryzuje się bardzo wysoką homologią sekwencji aminokwasowej ze zidentyfikowanym przez Autorkę enzymem RM.TspGW1. Pomimo tego enzymy te rozpoznają inne sekwencje DNA. Wcześniejsze doniesienia na temat specyficzności enzymatycznej RM.TaqII izolowanego z oryginalnego gospodarza *Thermus aquaticus* podawały, że rozpoznaje on dwa warianty sekwencji DNA, natomiast uzyskany przez Kandydatkę enzym rekombinowany rozpoznawał tylko jeden jej wariant. Badanie specyficzności cięcia DNA pokazało, że miejsce cięcia było identyczne w przypadku obu enzymów (natywnego i rekombinowanego). Tego typu ciekawa obserwacja poczyniona przez Autorkę była pierwszym tego typu doniesieniem w literaturze przedmiotu. Dalsze badania nad tą obserwacją pokazały, że w genomie *T. aquaticus* występują jednak dwie ENazy/MTazy: RM.TaqII i, nazwana przez Autorkę, RM.TaqIII o bardzo podobnej sekwencji aminokwasowej, z których jedna rozpoznaje jeden wariant sekwencji, a druga drugi. Wyjaśniając poczynioną obserwację nad enzymem rekombinowanym Kandydatka dowiodła istnienia w *T. aquaticus* dodatkowego systemu RM, w którego skład wchodzi nowa prototypowa ENaza.

Kolejnym zagadnieniem opracowanym przez dr Agnieszkę Żylicz-Stachulę w ramach badania rodziny bifunkcyjnych ENaz/MTaz z rodzaju *Thermus* było zbadanie modulacji aktywności enzymatycznej tych enzymów pod wpływem S-adenozylometioniny (SAM). Warto zaznaczyć, że jest to jak dotąd jedyny przykład regulacji aktywności ENaz/MTaz przez SAM lub jego analogi: sinefunginę (SIN) lub S-adenozylhomocysteinę (SAH). Większość przebadanych przez Autorkę enzymów była stymulowana przez SAM lub SIN, a wyjątek stanowił RM.TspGWI, gdzie zaobserwowano silne hamowanie aktywności enzymatycznej. Badania nad specyfiką cięcia DNA przez enzymy RM.TspGW1 i RM.TaqII w obecności SAM i SIN pokazały, że oba związki relaksują specyficzność rozpoznania dopuszczając do rozpoznania sekwencji różniących się w dowolnym miejscu rozpoznawanej sekwencji jednym nukleotydem. Mało tego, w przypadku enzymu RM.TaqII kombinacja SIN/DMSO doprowadzała do relaksacji rozpoznawanej sekwencji nawet o dwa nukleotydy. Co ważne, Autorka udowodniła, że miejsce cięcia nie zmienia się w żadnym z przypadków. Zatem dr Agnieszka Żylicz-Stachula dokonała odkrycia warunków trawienia DNA przez badane enzymy restrykcyjne, w których enzym poszerza repertuar wiązanych sekwencji DNA, tnąc



zawsze w tej samej odległości od miejsca związania i przekształcając się w ultra-często tnące nożyce DNA.

Doktor Agnieszka Żylicz-Stachula prowadziła również badania nad inżynierią bifunkcyjnych ENaz/MTaz w celu uzyskania wariantów enzymów o poprawionych właściwościach. W tym celu przeprowadzała ukierunkowaną mutagenezę rejonu kodującego motyw IV MTazy. Podstawiając w enzymach RM.TspGW1 i RM.TaqII asparaginę (odpowiednio N473 lub N472) alaniną lub innymi aminokwasami, uzyskano warianty enzymów o różnych kombinacjach cech (np. zwiększenie wierności wiązania DNA, zwiększoną wrażliwość enzymu na SIN i modulację aktywności endonukleolitycznej i metylującej).

We wszystkich pracach osiągnięcia naukowego dr Agnieszka Żylicz-Stachula jest pierwszą autorką, a dodatkowo w dwóch pracach (z 2014 i 2016) jest autorką korespondującą. Prace te ukazały się w bardzo dobrych międzynarodowych czasopismach takich jak: Mol. Biol. Rep. (2x), Microb. Cell Fact., BMC Genomics, BMC Mol. Biol., BMC Biochemistry i Biotechniques. Sumaryczny IF prac z osiągnięcia naukowego wynosi 19, 8, co w przeliczeniu na punkty MNiSW daje 200 punktów. Prace są wieloautorskie, do wszystkich prac załączono oświadczenia współautorów, jedynie w przypadku jednej pracy (BMC Mol. Biol., 2012) brakuje oświadczeń dwóch współautorów, pracujących przynajmniej w czasie powstawania publikacji w firmie litewskiej Thermo Scientific w Dziale Badań i Rozwoju. Natomiast Kandydatka zamieściła oświadczenie dyrektora tego działu i równocześnie współautora rzeczonyj publikacji informujące o wkładzie w publikacje całej trójki. Kandydatka zamieściła również wydruki maili do obu osób pracujących w Thermo Scientific z prośbą o nadesłanie odpowiednich oświadczeń. Jak oświadcza Kandydatka, maile te pozostały bez odpowiedzi. Jednak zgodnie z ostatnim rozporządzeniem MNiSW z października 2015 w pracach, gdzie jest więcej niż pięciu autorów (a to jest ten przypadek) wystarczy podać własne (habilitanta) oświadczenie i oświadczenia przynajmniej czterech współautorów. Ten wymóg został w tym przypadku spełniony. Udział procentowy Habilitantki deklarowany przez nią wynosi od 45% do 65%. Z Jej oświadczeń znajdujących się przy każdej z prac wynika, że była autorką metody, współkierowała projektem naukowym, bądź jest głównym odkrywcą obserwowanego zjawiska. W oświadczeniach mgr Olgi Żołnierkiewicz padają stwierdzenia o wykonaniu większości doświadczeń z równoczesną informacją, że będą one umieszczone w Jej pracy doktorskiej, a z kolei dr Agnieszka Żylicz-Stachula deklaruje w autoreferacie, że prace te były wykonywane pod Jej kierunkiem jako promotora



pomocniczego. W świetle tego co powyższe, oświadczenia Kandydatki jak i współautorów nie wzbudzają moich wątpliwości.

Podsumowując uważam, że osiągnięcie naukowe dr Agnieszki Żylicz-Stachuli jest bardzo wartościowym dziełem, gdy chodzi o rozwój inżynierii białek, w szczególności enzymów bifunkcyjnych ENaz/MTaz, a także gdy chodzi o naszą wiedzę na temat aktywności i specyfiki substratowej badanych restryktaz występujących w termofilnych gatunkach bakterii z rodzaju *Thermus*. Wyniki przedstawionych prac wniosły istotną i nową wartość naukową w dyscyplinę biologii.

Ocena pozostałego dorobku naukowego

Pozostały dorobek naukowy dr Agnieszki Żylicz-Stachuli składa się z 12 prac (dwie przed doktoratem, 10 po doktoracie), wszystkie z listy JCR, niektóre świetnie opublikowane (np. Nucl. Acids Res. 2x), niektóre bardzo dobrze (J. Phys. Chem., BMC Mol. Biol.). Prace są wieloautorskie, a Kandydatka jest w nich pierwsza, druga lub zajmuje dalsze miejsca wśród autorów. Ponadto jest współautorem dwóch zgłoszeń patentowych, jednego krajowego i jednego międzynarodowego. Prace dotyczą izolacji i charakterystyki biochemicznej i funkcjonalnej nowych enzymów restrykcyjno/metylujących z różnych gatunków bakterii oraz opracowania nowych technik znakowania DNA – głównie przy użyciu halogenowych pochodnych nukleozydów, czy detekcji pęknięć nici DNA. W jednej z prac opisano metodę uzyskiwania długich cząsteczek DNA wysyconych 5-BrdU, wrażliwych na światło UV, które prowadzi do powstawania licznych pęknięć nici DNA i aberracji chromosomowych. Technika ta mogłaby potencjalnie znaleźć zastosowanie w radioterapii niektórych typów nowotworów. Dodatkowo opracowano metodę znakowania halogenowymi pochodnymi nukleozydów długich cząsteczek DNA w ściśle określonych miejscach sekwencji nukleotydowej. Metoda wykorzystuje wiązanie i trawienie enzymami restrykcyjnymi klasy IIS, ligację fragmentów DNA, w których uzupełnia się kohezyjne miejsca znakowanymi nukleozydami. W innej z kolei pracy zidentyfikowano nieoczekiwany fotoprodukt fotolizy 5-BrdU w roztworze wodno-izopropanolowym, a jest nim addukt 2'-dU i 2-propanolu, reakcja jest przeprowadzana w obecności acetonu. Zaproponowano, że byłaby to dobra metoda do oceny radioczułości pochodnych halogenowych nukleozydów.

W innej pracy wyizolowano termostabilny o szerokim spektrum działania izoschizomer restryktazy Bbv1 (GeolCI). Enzym ten uzyskano z bakterii *Geobacillus sp.*



izolowanych z islandzkich gejzerów. Jego przydatność w inżynierii genetycznej jest nie do przecenienia.

Podsumowując uważam, że przedstawione rezultaty badań naukowych w pracach z pozostałego dorobku naukowego są ważne, bardzo solidnie wykonane, a przy uzyskiwaniu wyników stosowano różnorodne techniki biologii molekularnej, biochemii i bioinformatyki. Sumaryczny IF wszystkich prac Kandydatki wynosi 60,6, co przekłada się na 575 punktów MNiSW. Liczba cytowań jest dla mnie niezrozumiale mała i wynosi 87 (bez autocytowań 25), a indeks Hirscha - 6. Są to dobre parametry, jak na ten etap kariery naukowej, a niewielką liczbę cytowań tych prac można jedynie sobie wytłumaczyć wąskim gronem specjalistów zajmujących się omawianymi zagadnieniami. Biorąc wszystko powyższe pod uwagę, bardzo dobrze oceniam pozostały dorobek naukowy dr Agnieszki Żylicz-Stachuli.

Ocena działalności organizacyjnej i dydaktycznej

Doktor Agnieszka Żylicz-Stachula jak dotąd nie kierowała projektami naukowymi z finansowaniem zewnętrznym. Niemniej jednak Jej udział jako wykonawcy w projektach aplikacyjnych i badawczych jest imponujący: jeszcze przed doktoratem brała udział w realizacji 12 projektów firmy Eurx Sp. z o.o. w ramach funduszu Molecular Biology Resources Inc. (USA), a po doktoracie była wykonawcą w trzech grantach KBN, MNiSW lub NCN, w trzech grantach rozwojowych lub inwestycyjnych NCBiR a także jednego projektu w ramach programu Innowacyjna Gospodarka. Jako kierownik projektu kandydatka wykazuje dwa granty z tzw. Badań Własnych Uniwersytetu Gdańskiego. Szkoda, że jak dotąd dr Agnieszka Żylicz-Stachula nie kierowała żadnym dużym projektem, niemniej jednak uznaję, że bycie głównym wykonawcą w ogromnych projektach NCBiR to też nie lada odpowiedzialność i wyzwanie. W autoreferacie Kandydatka wymienia cztery złożone wnioski grantowe do NCN, które nie zostały zakwalifikowane do finansowania.

Doktor Agnieszka Żylicz-Stachula jest laureatką dwóch nagród zespołowych Rektora Uniwersytetu Gdańskiego. Kilka razy wygłaszała referaty naukowe na konferencjach międzynarodowych i krajowych. Kandydatka jest bardzo aktywna, gdy chodzi o udział w prezentowaniu wyników w formie plakatu na konferencjach naukowych: przed doktoratem 13 razy prezentowała w ten sposób swoje wyniki na różnych konferencjach krajowych, a po doktoracie aż 28 razy na konferencjach międzynarodowych.



Gdy chodzi o osiągnięcia dydaktyczne to należy podkreślić, że dr Agnieszka Żylicz-Stachula pracuje na Uniwersytecie, w związku z czym jest bardzo aktywna dydaktycznie. I tak prowadziła/prowodzi siedem różnych wykładów fakultatywnych na kierunku Chemia, seminaria dyplomowe i specjalizacyjne na tym samym kierunku, ćwiczenia z chemii fizycznej i pracownię specjalistyczną i dyplomową. Jest współautorem skryptu dla studentów Wydziału Chemii. Była promotorem siedmiu prac magisterskich, opiekunem naukowym czterech magistrantów, promotorem sześciu prac licencjackich. Co niezwykle, jest promotorem pomocniczym aż w pięciu przewodach doktorskich, a w jednym projekcie doktorskim, w którym przewód jeszcze nie został otwarty, jest opiekunem naukowym. Tę sferę aktywności naukowo-dydaktycznej Kandydatki oceniam szczególnie wysoko.

Doktor Agnieszka Żylicz-Stachula przebywała na kilkumiesięcznych stażach krajowych w różnych firmach biotechnologicznych, ale niestety nie ma w swoim życiorysie naukowym długiego stażu podoktorskiego. Uważam to za spory mankament w życiorysie naukowca i bardzo nakłaniałbym Kandydatkę do podjęcia takiego wyzwania. Z działalności naukowej Kandydatki można jeszcze wymienić recenzowanie dwóch manuskryptów złożonych w redakcjach czasopism o zasięgu międzynarodowym.

Kończąc ten podrozdział stwierdzam, że oceniam bardzo pozytywnie działalność organizacyjną i dydaktyczną dr Agnieszki Żylicz-Stachuli.

Wnioski końcowe

W moim przekonaniu zarówno osiągnięcie naukowe, jak i pozostały dorobek naukowy dr Agnieszki Żylicz-Stachuli są bardzo dobre, moją szczególną uwagę zwrócił znakomity, profesjonalny warsztat badawczy, a także konsekwencja w rozwiązywaniu problemów badawczych. Te cechy są niezwykle ważne dla kariery i rozwoju badacza, stąd pozwalają mi one mieć nadzieję, że rozwój Kandydatki będzie nadal dynamiczny i zaowocuje powstaniem prężnej grupy badawczej uzyskującej bardzo dobre, interesujące wyniki naukowe. Działalność dydaktyczna dr Agnieszki Żylicz-Stachuli jest wręcz znakomita, a Jej działalność organizacyjna również nie budzi zastrzeżeń. Dlatego zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie dr Agnieszce Żylicz-Stachuli stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biologia.


prof. dr hab. Artur Jarmołowski