



UNIwersytet Gdański

2016 06. 16



Dr hab. Iwona Mruk
Katedra Mikrobiologii
Uniwersytet Gdański
Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
iwona.mruk@biol.ug.gda.pl

Gdańsk, dnia 13 czerwca 2016 roku

**Opinia na temat osiągnięcia naukowego „Analiza porównawcza endonukleazo-
metylotransferaz z rodziny enzymów, pochodzących z bakterii rodzaju *Thermus*”
oraz aktywności naukowej, dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzatorskiej
dr Agnieszki Żylicz-Stachuli w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora
habilitowanego, w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biologia**

Pani dr Agnieszka Żylicz-Stachula jest absolwentką Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku, na którym w 2000 roku obroniła pracę magisterską w dziedzinie biotechnologii. Jej projekt pracy magisterskiej, a następnie doktorskiej, realizowany był w firmie biotechnologicznej EURx w Gdańsku, z którą związała swoją karierę zawodową po ukończeniu studiów na stanowisku pracownika naukowego. Oba projekty dotyczyły charakterystyki biochemicznej i analizy strukturalnej enzymów restrykcyjnych izolowanych z termofilnych bakterii. W roku 2007 Habilitantka uzyskała tytuł doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii, w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Termofilna endonukleaza restrykcyjna TspGWI – nowa specyficzność na pograniczu trzech klas bakteryjnych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych”, której promotorem był prof. dr hab. Janusz Bujnicki z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Warto podkreślić, że Pani Agnieszka Żylicz-Stachula realizowała swój projekt doktorski w jednostce pozanaukowej, której interesy są nastawione na aspekty czysto komercyjne. Musiała zatem równolegle prowadzić inne projekty, których celem była optymalizacja produkcji enzymów, czy klonowanie genów (głównie nukleaz, polimeraz), by poszerzyć wachlarz oferty firmy biotechnologicznej EURx. W 2007 roku Pani Agnieszka Żylicz-Stachula podjęła decyzję o powrocie do kariery akademickiej i rozpoczęła pracę w Zakładzie Teoretycznej Chemii Fizycznej na Wydziale Chemii UG na

stanowisku asystenta, następnie adiunkta, a od 2012 roku pozostaje adiunktem, w utworzonej Katedrze Biotechnologii Molekularnej Wydziału Chemii UG.

Przedstawiona mi do oceny dokumentacja obejmuje: autoreferat, odpis dyplomu doktorskiego, kopie prac wchodzących w cykl publikacji składających się na osiągnięcie naukowe, wykaz publikacji naukowych ze wskazaniem wkładu własnego autorki, oświadczenia współautorów prac, informacje o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki.

Ocena osiągnięcia naukowego, stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy

Na osiągnięcie naukowe Pani dr Agnieszki Żylicz-Stachuli pt.: „Analiza porównawcza endonukleazo-metylotransferaz z rodziny enzymów, pochodzących z bakterii rodzaju *Thermus*” składa się jednolity tematycznie cykl 7 oryginalnych artykułów naukowych. Dotyczy on „nietypowych” enzymów restrykcyjnych należących do systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych Typu II pochodzących z bakterii rodzaju *Thermus* zasiedlających ekstremalne środowiska. W odróżnieniu od tzw. typowych enzymów Typu II, czyli endonukleazy restrykcyjnej i metylotransferazy DNA, które kodowane są przez dwa geny i funkcjonują niezależnie, w modelu badawczym Habilitantki występuje jeden multidomenowy polipeptyd o złożonej strukturze i aktywnościach specyficznej endonukleazo-metylotransferazy rozpoznającej niepalindromowe sekwencje DNA. Uzyskane wyniki dotyczą zarówno badań podstawowych, jak i tych o potencjale aplikacyjnym. Prace zostały opublikowane w latach 2011-2015, w recenzowanych czasopismach (peer review), które przeszły proces recenzji z udziałem zwykle dwóch/trzech niezależnych recenzentów będących specjalistami w danej dziedzinie. Wszystkie czasopisma specjalizują się w dziedzinach biochemii i biologii molekularnej. Dwa z nich należą do bardzo dobrych, górnych 25% (tzw. Q1) czasopism w tej kategorii: *Microbial Cell Factories* ($IF_{2014}=4,22$) oraz *BMC Genomics* ($IF_{2014}=3,98$). Odpowiednio jedna praca pochodzi z czasopisma z grupy Q2 – *Biotechniques* ($IF_{2014}=2,94$); trzy prace z grupy Q3 – *BMC Molecular Biology* ($IF_{2014}=2,19$); *Molecular Biology Reports* ($IF=2,02$); jedna z grupy Q4 – *BMC Biochemistry* ($IF_{2014}=1,43$).

We wszystkich artykułach naukowych, które składają się na tzw. osiągnięcie naukowe, Pani Agnieszka Żylicz-Stachula jest pierwszym autorem, a w dwu jednocześnie autorem korespondencyjnym, w tym w jednej pracy występuje dwóch takich autorów, co nie budzi wątpliwości o decydującym udziale Habilitantki w ich przygotowaniu. Publikacje są wieloautorskie, dlatego zamieszczono stosowne oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie prac, które potwierdzają Jej pierwszoplanową rolę. Habilitantka również sama precyzyjnie określiła swój udział, który zawiera się w przedziale 45-60%, co sugeruje, iż odegrała ona wiodącą rolę w planowaniu, realizacji, a także analizie większości opisywanych eksperymentów. Brała ona również aktywny udział w przygotowaniu manuskryptów prac, od wersji wstępnych po ostateczne.

W kilku pracach podkreśliła również swoją zasadniczą rolę w powstawaniu hipotezy badawczej, koncepcji badań, a także w kierowaniu lub współkierowaniu projektem badawczym.

Autoreferat jest napisany ciekawie, fragmentami tekst jest wręcz bardzo osobisty. Osiągnięcie naukowe omówione zostało w sposób bardzo wnikliwy, włączając szczegółowy opis wszystkich uzyskanych wyników badań oraz trudności przy ich powstawaniu. Pani dr Agnieszka Żylicz-Stachula zajęła się grupą enzymów o aktywnościach endonukleazo-metylotransferaz izolowanych z bakterii termofilnych rodzaju *Thermus* i wykazała też, że grupa tych enzymów ma swoje homologi w bakteriach mezofilnych, których liczba może wzrastać wraz z pojawianiem się sekwencji nowych genomów w bazach banku genów. Na podstawie analizy bioinformatycznej zaproponowała podział na podrodziny uwzględniający zróżnicowaną organizację domenową tych białek (Żylicz-Stachula, Żolnierkiewicz, Lubys, Ramanauskaite, Mitkaite, Bujnicki, Skowron, 2012; BMC Mol Biol; 13:13). Domeny zlokalizowane na jednym polipeptydzie związane są z: rozpoznawaniem specyficznej sekwencji DNA przez dwie subdomeny, hydrolizą obu nici DNA w precyzyjnej odległości od sekwencji specyficznej, metylacją DNA w obrębie sekwencji rozpoznawanej oraz z aktywnością helikalną o nieznannej jeszcze funkcji. Prawdopodobnie z powodu tak skomplikowanej struktury i wielkości nie udało się dotąd otrzymać kryształu dla żadnego z tych termostabilnych białek. Jednakże Habilitantka nie ustaje w próbach pokonania tych problemów podejmując współpracę z prof. dr hab. Mathiasem Bochtlerem. Niewątpliwie praca z tymi endonukleazo-metylotransferazami jest trudna. Używanie systemów do nadekspresji opartych na komórkach *E. coli* (nienaturalnego gospodarza) często prowadzi do ujawnienia się „toksycznego” efektu tych genów z powodu aktywności enzymu restrykcyjnego. Do tej pory wiedza na temat regulacji tych dwóch aktywności enzymatycznych na poziomie ich genów lub białek jest właściwie w ogóle nieznaną i podejmowaną niezmiernie rzadko. Mimo to Habilitantka doskonale opanowała warsztat pracy z tymi enzymami, włączając klonowanie ich genów, nadprodukcję białek w różnych systemach i optymalizację ich aktywności. Habilitantka uzyskała wiele interesujących i cennych wyników podczas analizy biochemicznej i strukturalno-funkcjonalnej badanych termostabilnych białek, z których wyróżnić należy:

- i) opracowanie strategii zwiększenia poziomu ekspresji genów kodujących termostabilne rekombinowane endonukleazo-metylotransferazy w komórkach *E. coli* i ich wydajnego oczyszczania do homogenności elektroforetycznej (Żylicz-Stachula, Żolnierkiewicz, Śliwiska, Jezewska-Frackowiak, Skowron, 2014; Microb Cell Fact, 13:7).
- ii) weryfikację sekwencji kanonicznej rozpoznawanej przez endonukleazo-metylotransferazę TaqII, której przez wiele lat przypisywano rozpoznawanie dwóch sekwencji DNA. Na przykładzie rekombinowanego wariantu Habilitantka udowodniła, że obecna jest aktywność wobec tylko jednej sekwencji rozpoznawanej (Żylicz-Stachula, Żolnierkiewicz, Śliwiska, Jezewska-Frackowiak, Skowron, 2011; BMC Biochemistry, 12:62).

Postawiła hipotezę o możliwej obecności w komórkach *Thermus* innego genu kodującego enzym o innej aktywności, co ostatnio zostało potwierdzone. Habilitantka w materiałach konferencyjnych (poza ocenianym materiałem składającym się na tzw. „osiągnięcie naukowe”) podaje, iż wykazała, że *Thermus aquaticus* YT-1 posiada trzeci enzym RM.TaqIII, o niemal identycznej masie, który współczyszczzał się z RM.TaqII, powodując otrzymanie mieszanej aktywności. Myślę, że Habilitantka może ostatecznie potwierdzić swoją hipotezę za pomocą technologii SMRT (single molecule real time SMRT sequencing), obecnie często wykorzystywanej w badaniach epigenetycznych, gdzie w trakcie sekwencjonowania genomowego DNA są wykrywane zmetylowane cytozyny i adeniny. Z reguły wzory metylacji w genomie (metylom) można łatwo powiązać z obecnością genów metylotransferaz o charakterystycznych motywach.

- iii) opracowanie metod inżynierowania endonukleazo-metylotransferaz opartych o ich analizę strukturalną, w kierunku uniwersalnego otrzymywania ich wariantów o zmienionych właściwościach poprzez mutagenezę ukierunkowaną w obrębie motywu NPPY zaangażowanego w aktywność metylującą. Otrzymano warianty o ciekawych właściwościach innych niż natywny enzym, np. uzyskano eliminację aktywności nukleazy, bądź metylazy, które mogą być reaktywowane pod wpływem sinefunginy (Żylicz-Stachula, Jeżewska-Fraćkowiak, Skowron, 2014; Mol Biol Rep; 41(4):2313-23 oraz Żylicz-Stachula, Żebrowska, Czajkowska, Wrese, Sulecka, Skowron, 2016; Mol Biol Rep. Apr;43(4):269-82).
- iv) opracowanie warunków, w których pewne czynniki chemiczne, takie jak: S-adenozyl-L-metionina, sinefungina, czy dimetylosulfotlenek wpływają na modulację aktywności enzymów, poprzez tzw. rozluźnienie sekwencji specyficznej, które polega na rozszerzonym rozpoznawaniu sekwencji DNA, tzn. różniące się o jeden, bądź więcej nukleotyd od sekwencji tzw. kanonicznej. W efekcie wariant takiego enzymu częściej degraduje genomowy DNA niż typ dziki. Można tym sposobem znacznie zwiększyć repertuar rozpoznawanej sekwencji DNA, zwłaszcza kiedy użyje się wariantu takiego enzymu z substytucją aminokwasu w kierunku wydajniejszej aktywności restrykcyjnej w kombinacji z warunkami temperaturowymi oraz czynnikami chemicznymi (Żylicz-Stachula, Żolnierkiewicz, Jasiński, Skowron, BMC Genomics, 2013; Jun 1;14:370 oraz Żylicz-Stachula, Żolnierkiewicz O, Jeżewska-Fraćkowiak J, Skowron, 2011; Biotechniques. Jun;50(6):397-406). Enzymy fragmentujące DNA wykorzystywane mogą być do tworzenia wszelkich bibliotek genomowych, czy metagenomowych.

Podsumowując, recenzowane osiągnięcie naukowe (sumaryczny IF=19,763; 200 pkt. MNiSW) pozwala ocenić dr Agnieszkę Żylicz-Stachulę jako dojrzałą, samodzielną badaczkę, której prace stanowią znaczący i spójny wkład w pogłębienie wiedzy na temat właściwości nietypowych

systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych funkcjonujących w bakteriach termofilnych. Co więcej, ma ona bardzo konkretne plany na kontynuację swoich badań, które zamierza poszerzyć w aspekcie badania biologii tych systemów, regulacji aktywności ich enzymów oraz użycia rekombinowanych enzymów jako nowych narzędzi molekularnych.

Ocena pozostałych osiągnięć naukowych i aktywności naukowej Habilitantki

Poza tzw. osiągnięciem naukowym opisanym wyżej, Pani dr Agnieszka Żylicz-Stachula jest współautorką 12 artykułów naukowych z listy Journal Citation Reports, z których 10 ukazało się po obronie pracy doktorskiej. Pięć z tych prac dotyczy tematyki badań prowadzonych w zespole prof. dr hab. Janusza Raka nad rolą radio- i fotosensybilizatorów DNA w procesie uwrażliwiania komórek pod wpływem różnego rodzaju promieniowania. Pozostałe prace związane są z głównym nurtem zainteresowań Habilitantki. Jednakże, wkład własny w siedem z tych prac został oceniony jedynie na 15% lub mniej. W mojej opinii jest to typowe dla relatywnie dużych, dynamicznych zespołów badawczych, pracujących na tym samym projekcie, gdzie publikacje mają sześciu i więcej autorów. Na całkowity dorobek naukowy Habilitantki składają się publikacje cytowane ponad 100 razy (na dzień 1.06.2016), w tym 28 razy bez autocytowań, w czasopismach o łącznym współczynniku oddziaływań ponad 60. Niską liczbę cytowań może powodować dość wąska specjalizacja badań Habilitantki. Ponadto, jest też ona autorką i współautorką licznych doniesień konferencyjnych: 13 krajowych i 28 międzynarodowych, a także referatów. Na uwagę zasługuje również fakt, że Pani dr Agnieszka Żylicz-Stachula pracując wiele lat w zespole prof. dr hab. Piotra Skowrona, który w swoich badaniach stawia nacisk na aplikacyjność, brała udział w jego projektach komercyjnych o znaczeniu przemysłowym, zakończonych również zgłoszeniem patentowym. Brała udział jako wykonawca w czterech grantach badawczo-rozwojowych (NCBiR, Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka) oraz w trzech o charakterze nauk podstawowych (NCN, MNiSW). Tematyka tych projektów znacznie różni się od projektów głównego nurtu zainteresowań Habilitantki, co świadczy o Jej „elastyczności” i otwartości naukowej. W ramach swojej aktywności naukowej wykonała, też szereg ekspertyz zamawianych przez firmy biotechnologiczne. Była też dwukrotnie uhonorowana nagrodą zespołową Rektora UG jako współautor cyklu publikacji naukowych, w 2012 i 2014 roku.

W ramach swojej aktywności naukowej Pani dr Agnieszka Żylicz-Stachula ma udokumentowany przejaw współpracy międzynarodowej z grupą badawczą prof. Arvidasa Lubysa z Thermo Fisher Scientific (Litwa). Wspomina również o rozpoczętym projekcie sekwencjonowania genomu *Thermus* sp. YT-1 we współpracy z New England Biolabs, USA. Natomiast nie odbyła ona dłuższych staży naukowych w zagranicznych ośrodkach naukowych, wykonała jedynie kilka praktyk krótkoterminowych i szkoleń.

Z obowiązku recenzenta muszę też wskazać najsłabsze strony aktywności naukowej Habilitantki. Nie może ona wykazać się powołaniem jako recenzent projektów

krajowych/międzynarodowych lub recenzowaniem artykułów naukowych w dobrych czasopismach. Zazwyczaj takie powołania są dowodem na odczuwalną pozycję w środowisku naukowym. Recenzowała jedynie dwa razy dla Acta Biochemica Polonica oraz Journal of Biotechnology and Biomaterials. Nie udało Jej się również, jak dotąd zdobyć samodzielnie funduszy na badania ze źródeł zewnętrznych, poza Uniwersytetem Gdańskim, czego sama Habilitantka jest świadoma, wskazując na szereg prób składania aplikacji grantowych do NCN i FNP. Należy to bardzo docenić i mieć nadzieję, że wytrwałość i zdobywane doświadczenie w przygotowywaniu tych i kolejnych projektów zaowocują w przyszłości.

Ocena dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego

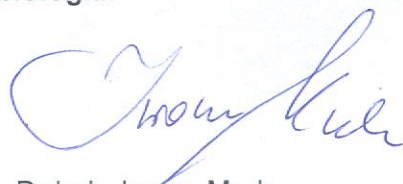
Pani dr Agnieszka Żylicz-Stachula ma duże doświadczenie dydaktyczne. Jako pracownik naukowo-dydaktyczny prowadziła, bądź wciąż prowadzi liczne wykłady dla studentów chemii studiów I i II stopnia oraz dla doktorantów, takie jak: Współczesne metody stosowane w diagnostyce medycznej i biotechnologii; Biotechnologia w ochronie środowiska i zdrowia człowieka; Podstawy genetyki molekularnej i inżynierii genetycznej; Podstawy biologii i patologii komórki eukariotycznej; Podstawy biologii komórki eukariotycznej; czy Genetyka molekularna. Habilitantka nie podała wprawdzie swojego udziału godzinowego w tych zajęciach, ale i tak liczba prowadzonych wykładów na tym etapie rozwoju zawodowego jest bardzo duża. Do tego prowadzi też seminaria, ćwiczenia laboratoryjne oraz opiekuje się studentami w ramach pracowni dyplomowych i specjalizacyjnych. Była do tej pory promotorem 7 prac magisterskich, opiekunem naukowym 4 prac magisterskich i 6 prac licencjackich. Co ważne, opiekuje się obecnie 6 projektami doktorskimi, natomiast formalnie występowała w funkcji promotora pomocniczego jednego zakończonego przewodu doktorskiego. Jako recenzent nie mam wątpliwości, że po udanym zakończeniu postępowania habilitacyjnego, w niektórych przewodach doktorskich Pani dr Żylicz-Stachula może formalnie stać się samodzielnym promotorem rozprawy doktorskiej. Habilitantka również aktywnie uczestniczyła w imprezach promujących Wydział Chemii UG oraz wykazała się zdolnościami organizacyjnymi współtworząc laboratoria badawcze dla Pracowni Biotechnologii Molekularnej, czy Teoretycznej Chemii Fizycznej UG. Była też współautorem skryptu dla studentów w ramach projektu „Kształcenie kadr dla innowacyjnej Gospodarki opartej na wiedzy w zakresie agrochemii, chemii i ochrony środowiska (Inno-AgroChemOś)”.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu całokształtu działalności naukowej, dydaktycznej, popularyzatorskiej, organizacyjnej oraz na polu współpracy międzynarodowej Pani dr Agnieszki Żylicz-Stachuli, stwierdzam, że w moim przekonaniu spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego. Jej dorobek naukowy jest wartościowy, nie tylko w aspekcie poznawczym, ale też

aplikacyjnym. Potwierdza Jej wysokie kompetencje oraz dojrzałość naukową. Bardzo wysoko oceniam też Jej zaangażowanie w proces dydaktyczny, popularyzatorski i organizacyjny.

Wyrażam przekonanie, że Pani dr Agnieszka Żylicz-Stachula spełnia wszystkie wymogi kwalifikacyjne stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego zgodnie z warunkami określonymi w aktualnie obowiązującej Ustawie o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych (Dz.U.Nr 65, poz.595, z późniejszymi zmianami). W związku z tym popieram wniosek o nadanie Jej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych, w dyscyplinie biologia.



Dr hab. Iwona Mruk