

AUTOREFERAT

dr Agnieszka Żylicz-Stachula

Pracownia Inżynierii Genetycznej
Katedra Biotechnologii Molekularnej
Instytut Ochrony Środowiska i Zdrowia Człowieka
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk 2016

1. **Imię i nazwisko:** Agnieszka Żylicz-Stachula

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej:**

2000 mgr biotechnologii; Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego; praca magisterska pt. „Izolacja nowych endonukleaz restrykcyjnych z termofilnych bakterii rodzaju *Bacillus*”; promotor: dr hab. Stanisław Żolnierowicz

*część eksperymentalna wykonana w firmie Eurx Sp. zo. o. w Gdańsku

2007 doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii, specjalność: biologia molekularna; Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie; rozprawa doktorska pt. „Termofilna endonukleaza restrykcyjna TspGWI – nowa specyficzność na pograniczu trzech klas bakteryjnych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych”; promotor: Prof. dr hab. Janusz Bujnicki z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

*część eksperymentalna wykonana w firmie Eurx Sp. zo. o. w Gdańsku

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

1999-2006 EURx Sp. zo.o. – firma biotechnologii molekularnej (joint venture with Molecular Biology Resources Inc., Milwaukee, WI, USA), Gdańsk; stanowisko: pracownik naukowy

2007-2008 Zakład Teoretycznej Chemii Fizycznej, Katedra Chemii Fizycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański; stanowisko: asystent

2008-2012 Zakład Teoretycznej Chemii Fizycznej, Katedra Chemii Fizycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański; stanowisko: adiunkt

Od 2012 Pracownia Inżynierii Genetycznej, Katedra Biotechnologii Molekularnej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański; stanowisko: adiunkt

4. **Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stanowi cykl 7 powiązanych tematycznie publikacji, dotyczących systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych, pochodzących z termofilnych bakterii należących do rodzaju *Thermus*. Cykl zawiera 7 prac oryginalnych. Prace te zostały opublikowane w latach 2011-2015. Dotyczą one zarówno badań podstawowych jak i ich zastosowań aplikacyjnych w nowych technologiach inżynierii genetycznej i w metagenomice. Publikacje te są rezultatem interdyscyplinarnej współpracy z ośrodkami naukowymi oraz firmami biotechnologicznymi w Polsce i za granicą.

Łączna wartość współczynnika oddziaływania IF prac składających się na osiągnięcie wynosi **19,763**. Łączna liczba punktów MNiSW prac składających się na osiągnięcie wynosi **200**.

a) **tytuł osiągnięcia naukowego:**

Analiza porównawcza endonukleazo-metylotransferaz z rodziny enzymów, pochodzących z bakterii rodzaju *Thermus*

b) **publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

- 4.1 **Zylicz-Stachula, A***, Zebrowska J., Czajkowska, E., Wrese, W., Sulecka, E., Skowron, P.M. Engineering of TaqII bifunctional endonuclease DNA recognition fidelity: the effect of a single amino acid substitution within the methyltransferase catalytic site. *Mol Biol Rep* (2016); DOI: 10.1007/s11033-016-3949-3. (IF_{2014/2015} **2,024**; MNiSW₂₀₁₅ = **20**). Udział w pracy: 60%.
- 4.2 **Zylicz-Stachula, A.**, Żolnierkiewicz, O., Sliwiska, K., Jezewska-Frackowiak, J., Skowron, P.M.* Modified 'one amino acid-one codon' engineering of high GC content TaqII-coding gene from thermophilic *Thermus aquaticus* results in radical expression increase. *Microb Cell Fact* (2014), 13:7. (IF₂₀₁₄ = **4,221**; MNiSW₂₀₁₅ = **40**). Udział w pracy: 50%.
- 4.3 **Zylicz-Stachula***, A., Jezewska-Frackowiak, J., Skowron, P.M.* Cofactor analogue-induced chemical reactivation of endonuclease activity in a DNA cleavage/methylation deficient TspGWI N473A variant in the NPPY motif. *Mol Biol Rep* (2014), 41(4):2313-2323. (IF₂₀₁₄ = **2,024**; MNiSW₂₀₁₅ = **20**). Udział w pracy: 65%.
- 4.4 **Zylicz-Stachula, A.**, Żolnierkiewicz, O., Jasiński, J., Skowron, P.M. * New genomic tool: ultra-frequently cleaving TaqII/sinefungin endonuclease with a combined 2.9 bp recognition site, applied to the construction of horse DNA libraries. *BMC Genomics* (2013), 14: 370. (IF₂₀₁₃ **4,041**; MNiSW₂₀₁₅ = **40**). Udział w pracy: 55%.
- 4.5 **Zylicz-Stachula, A.**, Żolnierkiewicz, O., Lubys, A., Ramanauskaite, D., Mitkaite, G., Bujnicki, J.M., Skowron, P.M.* Related bifunctional restriction endonuclease-methyltransferase triplets: TspDTI, Tth111II/TthHB27I and TsoI with distinct specificities. *BMC Mol Biol* (2012), 13:13. (IF₂₀₁₂ = **2,796**; MNiSW₂₀₁₅ = **30**). Udział w pracy: 45%.
- 4.6 **Zylicz-Stachula, A.**, Żolnierkiewicz, O., Śliwińska, K., Jezewska-Frackowiak, J., Skowron, P.M.* Bifunctional TaqII restriction endonuclease: redefining the prototype DNA recognition site and establishing the Fidelity Index for partial cleaving. *BMC Biochemistry* (2011), 12:62. (IF₂₀₁₁ = **1,988**; MNiSW₂₀₁₅ = **20**). Udział w pracy: 45%.
- 4.7 **Zylicz-Stachula, A.**, Żolnierkiewicz, O., Jezewska-Frackowiak, J., Skowron, P.M.* Chemically-induced alterations in TspGWI restriction specificity: a novel TspGWI/sinefungin endonuclease with theoretical 3-bp cleavage frequency. *Biotechniques* (2011), 50(6), 397-406. (IF₂₀₁₁ = **2,669**; MNiSW₂₀₁₅ = **30**). Udział w pracy: 60%.

* - autor korespondencyjny

Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład każdego autora w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w **załączniku nr 5**. Oświadczenia habilitantki dotyczące wykonanych prac oraz procentowego w nich udziału znajdują się w **załączniku nr 3**.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich zastosowań aplikacyjnych:

Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne (RM) są funkcjonalnym, prokariotycznym odpowiednikiem układu immunologicznego organizmów eukariotycznych, stanowiąc ochronę przed infekcją bakteriofagowym DNA. Odkrycie endonukleaz restrykcyjnych (ENaz) zrewolucjonizowało biologię molekularną, wpływając jednocześnie na rozwój wielu innych dziedzin nauki i przemysłu. Szeroko zakrojone badania nad systemami RM rozpoczęły się ponad 50 lat temu i nadal trwają, co świadczy o istotnym znaczeniu tej grupy białek [Loenen i inni, 2014]. Jednocześnie enzymy te stanowią doskonały model do badań strukturalno-funkcjonalnych oddziaływań białko – DNA oraz do badań mechanizmów warunkujących specyficzne rozpoznawanie sekwencji DNA. Ponadto śledzenie przebiegu i mechanizmów ewolucji systemów RM przyczynia się do zrozumienia skomplikowanej biologii i wzajemnych zależności, funkcjonujących w pasjonującym świecie mikroorganizmów, zwłaszcza tych zasiedlających środowiska ekstremalne.

W ciągu ostatnich pięciu lat nastąpił gwałtowny rozwój technik sekwencjonowania nowej generacji (ang. NGS). W ciągu tego okresu liczba zdeponowanych w GenBanku sekwencji genomowego DNA bakterii i archebakterii wzrosła ponad 12.5 razy. Pod koniec 2014 roku w GenBanku znajdowało się już ponad 5000 kompletnych genomów bakterii i archebakterii [Roberts i inni, 2015]. W związku z tym wzrosło również zainteresowanie badaniami dotyczącymi nowych systemów RM, zwłaszcza tych należących do Typu I i III.

Obecnie znanych jest 561 prototypowych specyficzności ENaz Typu II [REBASE_20.02.16: <http://rebase.neb.com>]. Większość z nich pochodzi jednak z bakterii mezofilnych. Spośród dostępnych komercyjnie ENaz Typu II stosunkowo niewiele wykazuje aktywność w temperaturach powyżej 45°C [Gupta i Sharma, 2014; REBASE: <http://rebase.neb.com>]. Odporność na denaturację/inaktywację termiczną może być korzystna zarówno z punktu widzenia stabilności enzymu w trakcie przechowywania czy reakcji enzymatycznej jak również wykorzystania tego typu zaawansowanych narzędzi molekularnych w procedurach wymagających zastosowania wyższych temperatur np. w metodach opartych o technikę PCR: PEAR (ang. Polymerase - Endonuclease Amplification Reaction) [Wang i inni, 2010], Thermostable Restriction Enzyme PCR Screening [Huang i inni, 2006] or RTD-PCR (ang. Restriction Endonuclease-mediated Real-time Digestion-PCR [Zhao i inni, 2013].

Bogate źródło termostabilnych ENaz stanowią bakterie należące do rodzaju *Thermus*. Spośród nich na szczególną uwagę zasługuje odkryta przez nasz zespół w 2003 roku rodzina homologicznych enzymów, posiadających domenę ENazy i metylotransferazy (MTazy) w jednym łańcuchu polipeptydowym (Typ IIC).

Enzymy te cechują się stosunkowo rzadko spotykanym wśród ENaz (rozpoznających różne sekwencje DNA) podobieństwem sekwencji aminokwasowej (aa). Z tego powodu stanowią one doskonały model do badań skomplikowanych zależności pomiędzy sekwencją rozpoznawaną, strukturą białka a jego termostabilnością oraz do badań ewolucyjnych. Do pozostałych kryteriów definiujących wyżej wymienioną rodzinę należą: masa cząsteczkowa (ok. 120 kDa), podobieństwo sekwencji rozpoznawanej oraz miejsca trawienia DNA, organizacja domen, struktura czwartorzędowa (białka monomeryczne w roztworze, prawdopodobnie przejściowo dimeryzują po rozpoznaniu specyficznej sekwencji DNA), stymulacja aktywności ENazy przez S-adenozyl-L-metioninę (SAM) lub jej analogi [Skowron i inni, 2003].

A. Analiza teoretyczna i eksperymentalna termostabilnych enzymów z rodziny białek typu *Thermus* (Żylicz-Stachula i inni, 2012)

Pierwszym genem należącym do rodziny białek typu *Thermus*, który został przeze mnie sklonowany, był gen *tspGWIRM*. Wyniki dotyczące RM.TspGWI zostały przedstawione w mojej rozprawie doktorskiej oraz w publikacji Żylicz-Stachula i inni, 2009, która nie wchodzi w skład omawianego osiągnięcia naukowego [Żylicz-Stachula i inni, 2009, erratum 2014]. W powyższej publikacji przedstawiono analizę bioinformatyczną sekwencji aa RM.TspGWI, wykazano istnienie znaczącego podobieństwa pomiędzy sekwencjami aa białek RM.TaqII i RM.TspGWI, zaproponowano model struktury białka, wytypowano reszty aa tworzące centra katalityczne ENazy i MTazy oraz zweryfikowano doświadczalnie przewidywania dotyczące funkcji kluczowych reszt aa. Homologiczne białka RM.TspGWI i RM.TaqII zbudowane są z tandemowo ułożonych domen, przypominających układ podjednostek strukturalno-funkcjonalnych systemów RM Typu I. W przeciwieństwie do enzymów Typu I, enzymy RM.TaqII i RM.TspGWI nie posiadają jednak domen translokazy zależnej od ATP. Zawierają one natomiast centralnie położoną domenę helikalną wraz z konserwowaną ewolucyjnie domeną katalityczną MTazy (przypominającą podjednostkę HsdM systemów RM Typu I). Cechą wspólną tych enzymów jest również funkcjonalna domena nukleazy (zawierająca motyw katalityczny PD-DXK), zlokalizowana na N-końcu polipeptydu. Domena ta stanowi odpowiednik podjednostki HsdR systemów RM Typu I. Przedstawione w publikacji wyniki uzasadniły utworzenie zaproponowanej wcześniej przez nasz zespół rodziny homologicznych białek typu *Thermus* [Skowron i inni, 2003].

W ramach cyklu publikacji wchodzących w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego wyizolowałam kolejny prototypowy enzym RM.TspDTI z bakterii *Thermus* sp. DT, a także przeprowadziłam sekwencjonowanie N-terminalnego końca polipeptydu oraz fragmentów proteolitycznych białka RM.TspDTI. Następnie na podstawie uzyskanych sekwencji aminokwasowych zaprojektowałam zestawy starterów. Wykorzystując techniki: PCR oraz „ang. promiscuous” PCR amplifikowałam segment DNA kodujący kompletny gen *tspDTIRM* wraz z sekwencjami flankującymi. Odczytaną sekwencję DNA zdeponowałam w GenBanku [EF095489]. Natywny gen *tspDTIRM* sklonowałam do bakterii *Escherichia coli* (*E. coli*) pod kontrolą indukowalnego termicznie promotora P_R z bakteriofaga lambda. Zoptymalizowałam ekspresję rekombinowanego genu i opracowałam wydajną procedurę oczyszczania rekombinowanego białka. Wyizolowany enzym RM.TspDTI scharakteryzowałam pod względem biochemicznym.

Następnie we współpracy z Prof. dr hab. Januszem Bujnickim przeprowadziłam analizę bioinformatyczną, która wykazała, że białko RM.TspDTI jest białkiem fuzyjnym, charakteryzującym się podobieństwem sekwencji aa do enzymów RM.Tth111II, RM.TthHB27I i RM.TsoI, składającym się z tandemowo ułożonych domen: N-końcowej domeny nukleazy o zwoju PD-(D/E)XK, domeny helikalnej, domeny MTazy oraz C-końcowej domeny odpowiedzialnej za wiązanie DNA. Na podstawie wykonanej analizy teoretycznej zidentyfikowałam prawdopodobną lokalizację elementów struktury odpowiedzialnych za oddziaływanie z DNA. Niestety nie udało się jednoznacznie ustalić szczegółów strukturalnych tego rejonu. Wytypowano jednak rejony, które mogą odpowiadać za specyficzność enzymu TspDTI: WTRLAK968, PQET987 oraz KSMGS1028. Stwierdzono również, że C-końcowa domena białka składa się z dwóch subdomen TRD (ang. Target Recognition Domain) rozdzielonych motywami strukturalnymi zbudowanymi z alfa-helis, typu ang. coiled-coil (Rys. 1). W celu ustalenia funkcji tych dwóch subdomen wspólnie z moim doktorantem Robertem Boratyńskim skonstruowałam mutanty genu *tspDTIRM*, pozbawione rejonu kodującego TRD1 lub TRD2 [załącznik nr 4, pkt. K; praca doktorska; Robert Boratyński, 2013]. Niestety konsekwencją wprowadzonych delecji był brak ekspresji zmutowanych genów w bakteriach *E. coli*, co uniemożliwiło oczyszczenie delecyjnych wariantów białka do badań biochemicznych.



Rys. 1 Schematyczne przedstawienie układu domen dwufunkcyjnych enzymów należących do podrodziny RM.TspDTI.

Omówiona powyżej organizacja domen w białku RM.TspDTI przypomina organizację domen enzymu RM.TspGWI [Żylicz-Stachula i inni, 2009, erratum 2014]. Jednakże, pomimo znaczącego podobieństwa biochemicznego i podobieństwa sekwencji rozpoznawanych, enzymy te wykazują ograniczone podobieństwo sekwencji aa. Z tego względu podzieliłam rodzinę enzymów typu *Thermus* na dwie podrodziny: podrodzinę białek homologicznych do RM.TspGWI oraz podrodzinę białek homologicznych do RM.TspDTI [Żylicz-Stachula i inni, 2012] (Tab. 1). Ponadto przeglądając dostępne bazy danych enzymów restrykcyjnych znalazłam kilka nowych ENaz/MTaz, wykazujących znaczące podobieństwo sekwencji aa do termostabilnych enzymów z rodziny białek typu *Thermus* (Tab. 1) [Żylicz-Stachula i inni, 2012; Skowron i inni, 2013].

ENaza	Źródło	Sekwencja rozpoznawana	Miejsce cięcia	Optymalna temperatura reakcji	Masa cząsteczkowa (Da)
Podrodzina RM.TspGWI					
RM.TspGWI	<i>Thermus sp.</i>	ACGGA	N _{11/9}	65-70°C	120 201
RM.TaqII	<i>Thermus aquaticus</i>	GACCGA	N _{11/9}	65-70°C	125 674
RM.TaqIII	<i>Thermus aquaticus</i>	CACCCA	N _{11/9}	65-70°C	~ 120 000
RM.RpaI	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	GTYGGAG	N _{11/9}	37°C	119 291
Podrodzina RM.TspDTI					
RM.TspDTI	<i>Thermus aquaticus</i>	ATGAA	N _{11/9}	65-70°C	126 885
RM.Tth111II/TthHB27I	<i>Thermus thermophilus</i>	CAARCA	N _{11/9}	65-70°C	125 955
RM.TsoI	<i>Thermus scotoductus</i>	TARCCA	N _{11/9}	55°C	126 474
RM.CchII	<i>Chlorobium chlorochromatii</i>	GGARGA	N _{11/9}	37°C	121 699
Termolabilne enzymy, potencjalnie homologiczne do enzymów z rodziny białek typu <i>Thermus</i>, niezakwalifikowane do konkretnej podrodziny ze względu na brak dostępnych sekwencji aa					
EciI	<i>E. coli</i>	GGCGGA	N _{11/9}	37°C	~ 120 000
RleAI	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	CCCACA	N _{12/9}	26°C	-

Tab. 1 Enzymy należące do rodziny białek typu *Thermus*. Szarym kolorem zaznaczono enzymy, pochodzące z bakterii mezofilnych.

Większość z tych nowo wytypowanych enzymów (poza RM.TsoI) pochodzi z organizmów mezofilnych, co jest kolejnym dowodem na istnienie efektywnych mechanizmów horyzontalnego transferu genów pomiędzy mikroorganizmami zasiedlającymi izolowane środowiska ekstremalne, a mikroorganizmami żyjącymi w niższych temperaturach/ w bardziej złożonych ekosystemach. Strategia mikroorganizmów termofilnych polega na efektywnej adaptacji do funkcjonowania w warunkach ekstremalnych, które w znaczący sposób minimalizują konkurencję. Taka adaptacja zachodzi również dzięki wydajnemu pozyskiwaniu „obcych” genów, istotnych dla bakterii termofilnych z punktu widzenia ich metabolizmu, ochrony przed bakteriofagami lub uzyskania przewagi nad innymi mikroorganizmami, z którymi muszą one konkurować. Bakterie z rodzaju *Thermus* charakteryzują się tzw. naturalną kompetencją [Thermus species., ed. Sharp.R i Williams.R,

1995], czyli są w stanie przyjmować i utrzymywać w genomie duże fragmenty egzogenego DNA. Ta naturalna kompetencja uzależniona jest od produktów, co najmniej 16 różnych genów [Friedrich i inni, 2001, 2002] i dotyczy zarówno genomowego jak i plazmidowego DNA. W genomach tych bakterii znaleziono też wiele funkcjonalnych paralogów międzygatunkowych i wewnątrzgatunkowych. Wykazano również, że bakterie z rodzaju *Thermus* posiadają tzw. megaplazmidy, np. w bakteriach *Thermus aquaticus* (*T. aquaticus*) znaleziono 4-5 różnych megaplazmidów [*Thermus* species (Biotechnology Handbooks), ed. Sharp.R i Williams.R, 1995]. Jednym z opisanych w literaturze przykładów takich plazmidów są megaplazmidy wyizolowane z *Thermus thermophilus* HB8 i HB27, w których skład wchodzi między innymi geny odpowiedzialne za adaptację do życia w temperaturach ekstremalnych, kodujące różne systemy naprawy uszkodzeń DNA [Bruggeman i Chen, 2006]. Interesującym dla mnie aspektem biologii bakterii z rodzaju *Thermus* jest współistnienie mechanizmów naturalnej kompetencji wraz z licznymi funkcjonalnymi systemami restrykcyjno-modyfikacyjnymi, chroniącymi te bakterie przed egzogenym DNA. Kolejną ciekawą zagadką do rozwiązania jest sposób, w jaki te dwa przeciwstawne mechanizmy mogą działać antagonistycznie w jednej komórce bakteryjnej.

B. Klonowanie natywnego i syntetycznego genu *taqIIRM* – opracowanie strategii zwiększenia poziomu ekspresji genów kodujących termostabilne ENazy w bakteriach *E. coli*. (Żylicz-Stachula i inni, 2014)

Ze względu na swoje pochodzenie, liczbę par zasad i charakterystyczny dla bakterii z rodzaju *Thermus* sposób wykorzystania kodonów (ang. codon usage) natywne geny kodujące dwufunkcyjne ENazy/MTazy z rodziny białek typu *Thermus* nie ulegają wysokiej ekspresji w bakteriach *E. coli*. Ponadto są to geny stosunkowo trudne do klonowania, ponieważ kodują enzymy posiadające aktywność ENazy, potencjalnie „toksyczną” dla komórek gospodarza bakteryjnego. Towarzysząca aktywność MTazy nie jest wystarczająca do ochrony DNA genomowego gospodarza w momencie instalowania się systemu RM w komórce (dane nieopublikowane). Nie wiadomo też, w jaki sposób regulowany jest poziom obu aktywności, zlokalizowanych w jednym polipeptydzie. Aby ominąć problem niskiej ekspresji i uzyskać odpowiednią ilość białka do dalszych badań zastosowano zmodyfikowaną strategię optymalizacji kodonów (ang. one amino acid-one codon). W tym celu zaprojektowano i zsyntetyzowano gen o długości 3315 pz, kodujący enzym RMTaqII. Syntetyczny gen charakteryzował się znacznie obniżonym % par GC oraz ograniczoną liczbą drugorzędowych struktur mRNA. Z 1105 kodonów aż 718 (65%) zostało zmienionych w celu zwiększenia ekspresji w bakteriach *E. coli*. Podobne podejście nie zostało wcześniej opisane w literaturze w kontekście klonowania genów kodujących ENazy. Zastosowana strategia typu „one amino acid-one codon” została wybrana celowo, ze względu na nasze obawy, iż zbyt wysoka ekspresja rekombinowanego genu, a co się z tym wiąże duża nadprodukcja białka, mogłaby doprowadzić do gwałtownej lizy rekombinowanych bakterii *E. coli*. Z tego właśnie powodu zdecydowałam się zastosować strategię opisywaną w literaturze jako mniej efektywną w porównaniu do strategii „randomizacji kodonów” (ang. codon randomization), polegającą na losowym doborze kodonów z puli najczęściej występujących w danym genomie albo najczęściej występujących w genach ulegających wysokiej ekspresji [Menzela, 2011]. Natywny i syntetyczny wariant genu *taqIIRM* został przeze mnie sklonowany do bakterii *E. coli* (we współpracy z moją doktorantką mgr Olgą Żołnierkiewicz (załącznik nr 4; pkt. K), w oparciu o system ekspresyjny wykorzystujący indukowany temperaturowo promotor P_R z bakteriofaga lambda, wcześniej przetestowany dla homologicznego białka RM.TspGWI [Żylicz-Stachula i inni, 2009]. Hodowle bakteryjne przed indukcją prowadzono w temperaturze 28°C, aby maksymalnie ograniczyć ewentualną aktywność ENazy RM.TaqII, wynikającą z potencjalnej „nieszczelności” zastosowanego systemu ekspresji. Po indukcji hodowle prowadzono w temperaturze 42°C, umożliwiając prawidłowe fałdowanie się białka. W wyniku zastosowanej strategii uzyskałam znaczący wzrost ekspresji zoptymalizowanego genu *taqIIRM*, w porównaniu do niezmienionego genu, otrzymując ponad 10-krotnie więcej

białka RM.TaqII na 1 g masy bakteryjnej. Ponadto w omawianej pracy przedstawiłam wydajną procedurę oczyszczania rekombinowanego białka, oznaczyłam aktywność ENazy i MTazy, zanalizowałam właściwości biochemiczne rekombinowanego białka, między innymi ustaliłam optymalną temperaturę reakcji rekombinowanej ENazy RM.TaqII.

C. Weryfikacja sekwencji rozpoznawanej przez enzym RM.TaqII (Żylicz-Stachula i inni, 2011)

Jednym z najbardziej zagadkowych prototypowych enzymów należących do rodziny *Thermus* jest RM.TaqII [Barker i inni, 1984; Żylicz-Stachula i inni, 2011, 2014]. Ten dwufunkcyjny enzym (posiadający domenę ENazy i MTazy w jednym łańcuchu polipeptydowym – Typ IIC) jest białkiem homologicznym do RM.TspGWI. Podobieństwo sekwencji aa pomiędzy tymi dwoma enzymami jest jednym z najwyższych opisywanych do tej pory w literaturze podobieństw sekwencji pomiędzy ENazami, rozpoznającymi różne sekwencje DNA [Żylicz-stachula i inni, 2009; Erratum 2014].

Według publikacji Barker i inni, 1984 natywna ENaza RM.TaqII posiada zdolność specyficznego rozpoznawania dwóch wariantów 6-nt sekwencji DNA: 5'-GACCGA-3' oraz 5'-CACCCA-3'.

W publikacji Żylicz-Stachula i inni, 2011, która wchodzi w skład omawianego osiągnięcia naukowego, wykazałam, że w przeciwieństwie do natywnego enzymu wariant rekombinowany rozpoznaje jedynie sekwencję 5'-GACCGA-3'. Pomimo zaobserwowanej różnicy w sekwencji rozpoznawanej, nie stwierdziłam zmiany miejsca cięcia DNA. W obu przypadkach hydroliza wiązania fosfodiesterowego następowała zawsze w ściśle określonej odległości 11 i 9 nt od sekwencji rozpoznawanej z utworzeniem 2-nukleotydowych (nt) 3'-wystające lepkich końców. W przypadku rekombinowanego enzymu RM.TspGWI, pomimo znaczącego podobieństwa do sekwencji aa RM.TaqII, nie zaobserwowałam różnicy w specyficzności sekwencji rozpoznawanej pomiędzy natywnym i rekombinowanym wariantem białka [Żylicz-Stachula, 2002, 2009]. Co więcej podobne zjawisko nie zostało jak dotąd opisane w literaturze dla żadnej ze znanych ENaz.

W celu wyjaśnienia tego ciekawego problemu sformułowałam kilka hipotez badawczych. Pierwsza z nich zakłada, że w bakteriach *T. aquaticus* YT-1 istnieje dodatkowy system RM, w którego skład wchodzi nowa prototypowa ENaza, rozpoznająca sekwencję 5'-CACCCA-3'. Do tej pory opisano w literaturze dwa systemy RM Typu II z bakterii *T. aquaticus*: TaqI - rozpoznający sekwencję 5'-TAGC-3' [Sato i inni, 1977] oraz RM.TaqII [Barker i inni, 1984; Żylicz-Stachula i inni, 2011, 2014]. Druga z hipotez zakłada, że rekombinowany wariant białka RM.TaqII może znacznie różnić się strukturą lub brakiem modyfikacji potranslacyjnych od natywnego wariantu np. z powodu nieprawidłowego fałdowania się białka czy też braku odpowiedniego aparatu enzymatycznego w mezofilnych bakteriach *E. coli*. Takie hipotetyczne różnice strukturalne mogłyby spowodować utratę zdolności rozpoznawania jednego z dwóch wariantów sekwencji DNA. Trzecia hipoteza opiera się na założeniu istnienia nieznannej dodatkowej podjednostki, której obecność mogłaby warunkować rozpoznawanie sekwencji 5'-CACCCA-3'. Aby zweryfikować wymienione powyżej hipotezy badawcze próbowałam uzyskać finansowanie na realizację powyższego projektu, aplikując o granty w konkursach NCN (załącznik nr 4; pkt. F).

Pomimo ograniczonych środków finansowych wspólnie z Dr Joanną Makowską oraz doktorantką mgr Joanną Żebrowską, której jestem opiekunem naukowym, wykonałyśmy wstępne badania dotyczące struktury rekombinowanego białka RM.TaqII (CD, DSC, badania fluorescencji kompleksów białko:ANS). Ponadto we współpracy z Prof. dr hab. Mathiasem Bochtlerem podjęłam pierwsze próby krystalizacji kompleksu RM.TaqII:DNA w obecności SIN i SAH. Uzyskałam również wstępną wersję sekwencji genomu *T. aquaticus* YT-1, którą zdeponowałam w GenBanku [LHCI01000000] (załącznik nr 4; pkt. Q).

Ponadto, udało mi się wyizolować z bakterii *T. aquaticus* YT-1 kolejną dwufunkcyjną ENazę/MTazę rozpoznającą sekwencję 5'-CACCCA-3' i tnącą DNA w odległości 11 i 9 nt od sekwencji rozpoznawanej, co potwierdziło moją pierwszą hipotezę badawczą. Wyizolowany enzym RM.TaqIII (Tab.1) jest białkiem o masie cząsteczkowej około 120 kDa, podobnie jak enzym RM.TaqII i inne enzymy należące do rodziny białek typu *Thermus*. Białko RM.TaqIII jest prawdopodobnie kodowane przez funkcjonalny paralog genu *taqIIRM*, który znajduje się w genomie *T. aquaticus* YT-1. Według ostatnich doniesień literaturowym bakterie rodzaju *Thermus* charakteryzują się niezwykle plastycznym, poliploidalnym genomem, co ułatwia im naprawę uszkodzeń powstających w wysokich temperaturach [Ohtani i inni, 2010].

Oznacza to, że wszystkie kluczowe dla bakterii geny występują w komórce w postaci kilku kopii. W trakcie ewolucji bakterii *T. aquaticus* YT-1 (w jednej z kopii genu *taqIIRM* w rejonie kodującym domenę TRD) pojawiły się prawdopodobnie spontaniczne mutacje, które spowodowały zmianę sekwencji rozpoznawanej. W efekcie tych mutacji powstał kolejny wariant enzymu, bardzo podobny pod względem biochemicznym do RM.TaqII.

Powyższe wyniki i hipotezy badawcze zaprezentowałam na konferencji: 7th NEB Meeting 2015 w Gdańsku (**załącznik nr 4; pkt. B**, publikacja w przygotowaniu). Obecnie prowadzę dalsze badania nad tymi unikalnymi systemami RM. Projekt ten realizuję wspólnie z uznanymi powszechnie specjalistami w tematyce endonukleaz restrykcyjnych: Prof. Sir Richardem Robertsem, Dr Goeffrey'em Wilsonem, Dr Richardem Morganem oraz Dr Alexeyem Fomenkovem z firmy New England Biolabs, z którymi nawiązałam współpracę w trakcie wymienionej powyżej konferencji naukowej.

D. Indukowana chemicznie, kontrolowana relaksacja sekwencji rozpoznawanej (Żylicz-Stachula i inni, 2011; Żylicz-Stachula i inni, 2013)

Jednym z najciekawszych aspektów biologii badanej przez nasz zespół rodziny ENaz/MTaz jest unikalna i jednocześnie zróżnicowana modulacja aktywności enzymatycznej pod wpływem SAM lub jej analogu sinefunginy (SIN). Oprócz pełnienia funkcji efektoru allosterycznego SAM jest równocześnie donorem grupy metylowej w reakcji metylowania DNA. Stymulacja lub inhibicja aktywności ENaz przez SAM została już wcześniej opisana w literaturze i jest cechą charakterystyczną dla wielu enzymów należących do Typu IIC. Funkcję efektoru allosterycznego ENazy mogą pełnić również różne analogii SAM, np. SIN czy S-adenozylhomocysteina (SAH). Związki te odgrywają rolę w sygnalizacji przełączenia pomiędzy trybem modyfikacyjnym i restrykcyjnym, wpływając na zmianę konformacji enzymu powiązaną z jednoczesną zmianą oddziaływań białka z poszczególnymi zasadami sekwencji rozpoznawanej. Wśród badanych ENaz z rodziny białek typu *Thermus* żaden z enzymów nie wykazywał stymulacji aktywności pod wpływem SAH. Wszystkie badane ENazy były natomiast silnie stymulowane w obecności SIN. Podobne działanie stwierdziłam w przypadku SAM, która powodowała wzrost aktywności większości badanych ENaz: RM.TspDTI, RM.TaqII, RM.Tth111II, RM.TthHB27I oraz RM.TsoI, działając hamująco jedynie w przypadku RM.TspGWI – enzymu homologicznego do RM.TaqII.

W omawianym cyklu prac przeanalizowałam sekwencje rozpoznawane oraz właściwości biochemiczne dwóch prototypowych ENaz/MTaz RM.TspGWI i RM.TaqII w obecności SAM i SIN [Żylicz-Stachula, 2011, 2013]. Podczas powyższych badań wykazałam, że enzymy z rodziny białek typu *Thermus* posiadają unikalną zdolność do relaksacji sekwencji rozpoznawanej, indukowaną poprzez obecność SIN w mieszaninie reakcyjnej [Żylicz-Stachula, 2011, 2013]. W obecności SIN ENazy TspGWI i TaqII rozpoznają zdegenerowane warianty sekwencji DNA, różniące się 1 nt od sekwencji kanonicznej. Stwierdziłam, że relaksacja ta może dotyczyć dowolnego nt w obrębie sekwencji rozpoznawanej. Dodatkowym czynnikiem wzmacniającym stopień relaksacji sekwencji rozpoznawanej jest DMSO. W przypadku RM.TaqII kombinacja

SIN/DMSO skutkuje rozpoznawaniem wariantów sekwencji, które różnią się od sekwencji kanonicznej dwoma nt. Miejsce trawienia DNA nie ulega natomiast zmianie zarówno w przypadku RM.TspGWI jak i RM.TaqII. W omawianych pracach wykazałam, że w obecności SIN ENaza TspGWI zmienia swoją specyficzność z 5-nt sekwencji do odpowiednika 3-nt sekwencji DNA. Natomiast specyficzność ENazy TaqII może zostać przekształcona pod wpływem kombinacji SIN/DMSO z 6-nt sekwencji do odpowiednika 2,9-nt sekwencji. Obie ENazy w obecności SIN ulegają konwersji do ultra-częstotliwych enzymów [Żylicz-Stachula, 2011, 2013], odpowiadających pod względem częstości cięcia DNA unikalnym ENazom CviJI/CviJI*, SetI oraz FaiI (REASE: <http://rebase.neb.com>). Odkryta przez nas, indukowana chemicznie zmiana specyficzności sekwencji rozpoznawanych przez TspGWI i TaqII została wykorzystana również do celów praktycznych - stworzenia nowych, ultra-często tnących narzędzi molekularnych, przeznaczonych do konstrukcji reprezentatywnych, zrandomizowanych bibliotek genomowych. Przydatność nowych narzędzi molekularnych wykazałam poprzez wykorzystanie aktywności ENazy TaqII/SIN/DMSO do konstrukcji reprezentatywnej biblioteki DNA genomowego konia domowego (*Equus caballus*) [Żylicz-Stachula i inni, 2013]. Obecnie, technologie genomowe oraz projekty masowego sekwencjonowania (w tym grupa projektów sekwencjonowania genomów wszystkich organizmów na Ziemi) są jedną z wiodących gałęzi biologii i z pewnością najbliższe dziesięciolecia będą upływały pod znakiem katalogowania bioinformatycznego bioróżnorodności. Tym samym nasze badania nad enzymami z rodziny białek typu *Thermus* generują nie tylko wiedzę w zakresie enzymologii tych wysoce nietypowych ENaz-MTaz, lecz stanowią również istotny wkład naukowy w poszerzaniu podstawowej wiedzy ogólnobiologicznej.

Warto nadmienić, że SIN jest naturalnie występującym antybiotykiem, wyizolowanym z bakterii *Streptomyces incarnatus* NRRL 8089 oraz *Streptomyces griseolus* [Yadav i inni, 2014]. Związek ten posiada silne działanie antygrzybiczne, antywirusowe i antypierwotniakowe [Fukuda i inni, 2010]. Ostatnio wykazano również hamujące działanie tego antybiotyku na tworzenie się biofilmu *Streptococcus pneumoniae in vitro* i zdolność tych bakterii do kolonizacji *in vivo* [Yadav i inni, 2014]. Ciekawym aspektem badanego zjawiska relaksacji sekwencji rozpoznawanej przez ENazę pod wpływem SIN mogłoby być synergistyczne, anty-bakteriofagowe działanie SIN, pozwalające na efektywne ograniczenie infekcji. Znane są termofilne gatunki *Streptomyces*, które zamieszkują te same nisze ekologiczne co bakterie z rodzaju *Thermus*. Jak dotąd nie opisano jednak w literaturze genów biosyntezy SIN pochodzących z termofilnych mikroorganizmów. Nie wiadomo więc czy SIN może być związkiem naturalnie występującym w środowisku, zamieszkiwanym przez bakterie z rodzaju *Thermus*.

E. Opracowanie nowej strategii inżynierii dwufunkcyjnych ENaz/MTaz w kierunku wariantów enzymatycznych o poprawionych właściwościach poprzez mutagenezę miejscowo-specyficzną w rejonie kodującym motyw IV MTazy (motyw NPPY) (Żylicz – Stachula i inni, 2014; Żylicz-Stachula i inni, 2015)

W trakcie doświadczalnej weryfikacji przewidywań dotyczących funkcji poszczególnych reszt aminokwasowych, tworzących centra katalityczne RM.TspGWI i RM.TaqII zauważyłam, że substytucje asparaginy (odpowiednio N473 lub N472) alaniną spowodowały interesującą zmianę aktywności badanych enzymów. Wyżej wymieniona asparagina stanowi jeden z aa w konserwowanym ewolucyjnie motywie IV MTazy (motyw NPPY). Sekwencja konsensus tego motywu to: (S/N/D)PP(Y/F/W). Wspomniana asparagina jest prawdopodobnie, podobnie jak w MTazie TaqI [Goedecke i inni, 2001], odpowiedzialna za tworzenie wiązania wodorowego z grupą aminową substratowej adeniny, znajdującej się w sekwencji rozpoznawanej. Adenina ulega 'wypętnieniu' z dwuniciowej helisy DNA. Drugie, słabsze wiązanie wodorowe tworzy się pomiędzy pierwszą proliną motywu NPPY i adeniną. W przypadku RM.TspGWI podstawienie asparaginy alaniną doprowadziło do powstania wariantu białka pozbawionego aktywności ENazy i MTazy. Jednakże w obecności SIN badana aktywność ENazy została odtworzona, osiągając

około 25-50% aktywności niezmienionego białka, w zależności od substratowego DNA [Żylicz – Stachula i inni, 2014]. W przypadku RM.TaqII substytucja analogicznej asparaginy alaniną wywołała odmienny efekt. Uzyskany wariant białka zachował ograniczoną aktywność MTazy (około 8x mniejszą od niezmienionego enzymu). Jednocześnie aktywność ENazy w standardowych warunkach reakcyjnych została prawie całkowicie wyeliminowana, niezależnie od obecności SAM lub SIN. Natomiast niewielka zmiana warunków reakcyjnych, polegająca na zwiększeniu temperatury reakcji o 5°C oraz na zmianie pH o 0.5 jednostki, spowodowała zależne od SIN odtworzenie aktywności ENazy na poziomie 25% aktywności niezmienionego białka. Uzyskany wariant RM.TaqII charakteryzował się jednocześnie znacznie zwiększoną wiernością rozpoznawania sekwencji DNA [Żylicz-Stachula i inni, 2015]. Uzyskane wyniki udowodniły, że asparagina w pozycji 473/472 ma kluczowe znaczenie dla modulacji obu aktywności enzymatycznych białek, należących do badanej rodziny. Na podstawie tych wyników sformułowałam hipotezę badawczą, która zakładała możliwość inżynierii wszystkich enzymów należących do rodziny białek typu *Thermus* w kierunku poprawy ich właściwości, poprzez substytucję asparaginy w motywie NPPY. W celu weryfikacji tej hipotezy, wspólnie z mgr Ewą Sulecką (doktorantką, której jestem opiekunem naukowym; **załącznik nr 4; pkt K**), przeprowadziłyśmy mutagenezę nasycającą w kodonie alaniny 472 białka RM.TaqII. Uzyskałyśmy szereg mutantów, z których kilka wybrałyśmy do optymalizacji ekspresji, izolacji wariantów białka i dalszych badań biochemicznych. W swoim wyborze kierowałyśmy się właściwościami podstawionych w pozycji 472 aminokwasów. W wyniku tego doświadczenia uzyskałyśmy trzy warianty białka RM.TaqII o kilkukrotnie zwiększonej aktywności ENazy i MTazy w porównaniu do niezmienionego wariantu. W przeciwieństwie do niezmienionego enzymu, warianty te charakteryzują się również zdolnością do całkowitego trawienia DNA substratowego. Omawiane wyniki zostały zaprezentowane na konferencji 7th NEB Meeting 2015 w Gdańsku (**załącznik nr 4; pkt. B**, publikacja w przygotowaniu). Opracowana metoda jest prawdopodobnie metodą uniwersalną dla ENazy Typu IIC/IIG/IIS.

Podsumowując, przedstawione prace stanowią ważny wkład w pogłębienie wiedzy na temat biologii termofilnych bakterii z rodzaju *Thermus* oraz nietypowych systemów RM funkcjonujących w tych bakteriach.

Do chwili obecnej, nasz zespół opublikował już 14 prac dot. enzymów z rodziny białek typu *Thermus*, z czego 7 prac wchodzi w skład omawianego osiągnięcia naukowego. Pozostałe prace nie zostały włączone ze względu na mniejszy udział habilitantki lub na fakt, iż część opublikowanych wyników została wykorzystana przez habilitantkę w pracy doktorskiej (**załącznik nr 3; pkt. II.A**).

Cztery kolejne prace (których jestem współautorem), dotyczące tej tematyki, są obecnie w recenzjach lub w trakcie przygotowywania.

Za swoje najważniejsze osiągnięcia naukowe uważam:

- Zweryfikowanie sekwencji rozpoznawanej przez enzym RM.TaqII, rozwiązanie problemu dotyczącego zaobserwowanej różnicy w sekwencjach rozpoznawanych przez natywny i rekombinowany wariant enzymu RM.TaqII, a także odkrycie i wyizolowanie enzymu RM.TaqIII.
- Ustalenie sekwencji aa enzymu RM.TspDTI. Przeprowadzenie analizy bioinformatycznej sekwencji aa oraz wyodrębnienie dwóch podrodzin w obrębie rodziny białek typu *Thermus*. Rozszerzenie tej rodziny o enzymy pochodzące z bakterii mezofilnych.
- Opracowanie metody pozwalającej na znaczące zwiększenie ekspresji genów kodujących termostabilne ENazy/MTazy w bakteriach *E. coli*.

- Odkrycie indukowanej chemicznie, kontrolowanej relaksacji sekwencji rozpoznawanej przez enzymy z rodziny białek typu *Thermus* oraz stworzenie nowego narzędzia molekularnego do konstrukcji reprezentatywnych bibliotek genomowych.
- Opracowanie nowej strategii inżynierii dwufunkcyjnych ENaz/MTaz w kierunku wariantów enzymatycznych o poprawionych właściwościach poprzez mutagenzę miejscowo-specyficzną w rejonie kodującym motyw IV MTazy.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:

Dorobek naukowy (szczegółowo przedstawiony w załączniku nr 3)

Łączna liczba publikacji pełnotekstowych (z wyłączeniem prac z cyklu habilitacyjnego): 12 (w tym pierwszy autor w 3 pracach), suma IF = 41,284, MNiSW = 375, w tym:

- przed doktoratem 2 publikacje (w tym pierwszy autor w 1 pracy), o IF = 13,625, MNiSW = 80;
- po doktoracie 10 publikacji (w tym pierwszy autor w 2 pracach, o IF = 27,659, MNiSW = 295;

Cykl habilitacyjny: 7 publikacji (w tym pierwszy autor w 7 pracach, autor korespondencyjny w 2 pracach), o IF = 19,763, MNiSW = 200.

Sumaryczna liczba publikacji pełnotekstowych (z pracami z cyklu habilitacyjnego): 19 (w tym pierwszy autor w 10 pracach, autor korespondencyjny w 2 pracach), suma IF = 60,72, MNiSW = 575.

Łączna liczba streszczeń zjazdowych 40 (0 przed uzyskaniem stopnia doktora, 40 po uzyskaniu stopnia doktora): 27 na konferencjach międzynarodowych i 13 na konferencjach krajowych. Prace były cytowane 87 razy, a wyłączając autocytowania 25 razy. Indeks Hirscha wynosi 6 (według Web of Science z dnia 22.II.2016).

Projekty badawcze realizowane po uzyskaniu stopnia doktora w charakterze kierownika lub wykonawcy:

UG-BW 8000-5-0143-8 (2008): „Wpływ S-adenozyl-L-methioniny, Sinefunginy i S-adenozyl-L-homocysteiny na aktywność endonukleazy restrykcyjnej TspGWI – badania eksperymentalne” (kierownik projektu).

UG-BW 8000-5-0265 (2009): „Mechanizmy regulujące aktywność endonukleazy restrykcyjnej TspGWI - badania eksperymentalne” (kierownik projektu).

KBN/N N204 023135 (2008 – 2011). „Badania foto- i radioreaktywności cząsteczek DNA modyfikowanych pochodnymi halogenowymi zasad nukleinowych. Studia eksperymentalne i kwantowo chemiczne” (wykonawca).

MNiSW N N204 156040. (2011-2014). „Foto- i radioczuwanie DNA przy użyciu bromopochodnych zasad nukleinowych” (wykonawca).

NCN, OPUS, UMO-2012/05/B/ST5/00368 (2013-2016). „Wpływ sekwencji nukleotydowej na wydajność radio- i fotouszkodzeń dwuniciowych fragmentów DNA znakowanych halogenopochodnymi zasad nukleinowych” (wykonawca w 2013 r.).

Projekty badawczo-rozwojowe o znaczeniu praktycznym realizowane po uzyskaniu stopnia doktora w charakterze wykonawcy:

Projekt rozwojowy NCBiR w zakresie: biotechnologia NR12-0070-06/2009 (2009-2013). „Opracowanie technologii przemysłowego otrzymywania rekombinowanych cholinoesteraz na podstawie klonowania molekularnego genów kodujących enzymy” (główny wykonawca).

Projekt EU3.1 Inicjowanie działalności innowacyjnej Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (2007–2013) UDA-POIG.03.01.00-00-010/10-00: „Opracowanie technologii produkcji opatrunku hydrożelowego trzeciej generacji na bazie alginianów i substancji biologicznie czynnych wprowadzonych do opatrunku.”, finansowany poprzez Nickel Technology Park Poznań dla celowej spółki MedVentures Sp.z o.o we współpracy z UG (główny wykonawca).

Grant inwestycyjny (przemysłowy) Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 1.4, EU/NCBiR: POIG.01.04.00-22-140/12: „Nowa technologia wytwarzania szczepionek profilaktycznych i terapeutycznych o zwielokrotnionej stymulacji układu immunologicznego” dla celowej spółki biotechnologicznej BioVentures Institute Sp. zo.o. we współpracy z UG (główny wykonawca).

Grant NCBiR STRATEGMED Regenova (2014-2017) “Nowe technologie farmakologicznej stymulacji regeneracji” realizowany przez konsorcjum UG, GUMED, PG, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, spółka MedVentures oraz spółka Pro-Science Polska (wykonawca).

Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Studia rozpoczęłam w 1995 roku na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (MWB UG-GUMed). Jeszcze w trakcie studiów prowadziłam działalność naukową w ramach kilku indywidualnych staży studenckich, realizowanych w ośrodkach krajowych i zagranicznych. Swoją własną działalność naukową rozpoczęłam na czwartym roku studiów w ramach stażu naukowego w firmie biotechnologicznej Eurx Sp. zo. o. W 1999 roku, po ukończeniu wakacyjnego stażu naukowego, otrzymałam od pana Prof. dr hab. Piotra Skowrona propozycję zatrudnienia w charakterze pracownika naukowego w wyżej wymienionej firmie oraz możliwość wykonywania części doświadczalnej pracy magisterskiej w ramach realizowanego przeze mnie projektu poszukiwania nowych termostabilnych endonukleaz restrykcyjnych o potencjalnym znaczeniu przemysłowym. Wyniki pracy magisterskiej, zatytułowanej „Izolacja nowych endonukleaz restrykcyjnych: BspGWI i BspTUI z termofilnych bakterii rodzaju *Bacillus*”, zaprezentowałam na konferencji: 8th International Students Conference w 2000 roku w Gdańsku.

W 2000 roku ukończyłam studia z oceną bardzo dobrą i rozpoczęłam dalszą pracę w firmie Eurx, trwającą od 1999 r. aż do listopada 2006 roku.

Pracując w firmie Eurx byłam głównym wykonawcą wieloletniego programu poszukiwania nowych termofilnych endonukleaz restrykcyjnych. Rezultatem tego projektu było odkrycie przeze mnie dwóch endonukleaz restrykcyjnych o nowej specyficzności: RM.TspGWI i RM.TspDTI oraz wielu termofilnych izoschizomerów znanych enzymów restrykcyjnych. Znalezisko to było wtedy unikatowe w skali światowej – stanowiło 50% nowych specyficzności odkrytych na całym świecie w roku 2002. W wyniku powyższych osiągnięć naukowych uzyskałam nieformalny status samodzielnego pracownika naukowego w firmie EURx Sp z o.o.

W latach 2001-2006 prowadziłam samodzielnie wiele projektów naukowych, dotyczących: (i) klonowania oraz ekspresji różnych prokariotycznych i eukariotycznych genów, (ii) inżynierii

białkowej, a także izolacji natywnych i rekombinowanych białek bakteryjnych/wirusowych, między innymi szeregu ENaz, znajdujących się obecnie w ofercie handlowej firmy EURx Molecular Biotechnology Sp. zo. o. (<http://www.eurx.com.pl>). Projekty te zostały przeze mnie szczegółowo omówione w **załączniku nr 3; pkt. II.I.**

Dalsze badania dotyczące znalezionych przeze mnie na piątym roku studiów prototypowych enzymów RM.TspGWI i RM.TspDTI zaowocowały odkryciem nowej rodziny endonukleaz restrykcyjnych typu *Thermus* oraz dwiema oryginalnymi publikacjami w czasopiśmie *Nucleic Acids Research*, a następnie moją rozprawą doktorską. Pragnę nadmienić, że ze względu na politykę korporacyjną zatrudniającej mnie firmy biotechnologicznej wyżej wymienione prace były niestety jedynymi pracami opublikowanymi przez nasz zespół w latach 2000-2006. Tego typu polityka, prowadząca do unikania publikowania wyników w przypadku braku ochrony patentowej, prowadzi niestety do ograniczenia możliwości rozwoju naukowego zatrudnionych w przemyśle młodych pracowników naukowych. Przykre skutki tej niekorzystnej dla mnie polityki odczuwam niestety do chwili obecnej, zwłaszcza podczas kolejnych prób uzyskania finansowania własnych badań naukowych w ramach konkursów NCN i FNP.

Pragnąc dalej realizować moją pasję naukową w 2006 roku podjęłam niezwykle trudną dla mnie decyzję życiową, dotyczącą rezygnacji z intratnej pracy w firmie biotechnologicznej. W dalszego rozwoju naukowego nawiązałam współpracę z Prof. dr hab. Januszem Bujnickim z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Od listopada 2006 do listopada 2007, mając pełne poparcie i zgodę Prof. dr hab. Piotra Skowrona, przygotowywałam rozprawę doktorską, w której wykorzystalam częściowo wyniki badań naukowych, uzyskanych jeszcze w trakcie pracy w firmie Eurx.

Rezultatem prac prowadzonych w ramach mojego doktoratu są następujące publikacje (jedna z nich ukazała się już po obronie pracy doktorskiej):

- Żylicz-Stachula, A., Bujnicki, J.M., Skowron, P.M. Cloning and analysis of bifunctional DNA methyltransferase/nuclease TspGWI, the prototype of a *Thermus* sp. family. *BMC Mol. Biol.*, (2009), 10, 52. Erratum in *BMC Mol Biol* 2014;15:16. (IF₂₀₀₉ = **2,848**; MNiSW₂₀₁₅ = **30**).
- Skowron, P.M., Majewski, J., Żylicz-Stachula, A., Rutkowska, S.R., Jaworowska, I., Harasimowicz-Słowińska, R. A new *Thermus* sp. class-IIS enzymes subfamily: isolation of a "twin" restriction endonuclease TspDTI, with a novel specificity 5'-ATGAA(N11/9)-3' related to TspGWI, TaqII and Tth111I. *Nucleic Acids Res* (2003), 31, e74. (IF₂₀₀₃ = **6,575**; MNiSW₂₀₁₅ = **40**).
- Żylicz-Stachula, A., Harasimowicz-Słowińska, R., Sobolewski, I., Skowron, P.M. TspGWI, a thermophilic class-IIS restriction endonuclease from *Thermus* sp. recognizes novel asymmetric sequence 5'-ACGGA(N11/9)-3'. *Nucleic Acids Res* (2002), 30, e33. (IF₂₀₀₂ **7,051**; MNiSW₂₀₁₅ = **40**).

Rozprawę doktorską zatytułowaną „Termofilna endonukleaza restrykcyjna TspGWI – nowa specyficzność na pograniczu trzech klas bakteryjnych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych”, przygotowaną pod opieką Prof. dr hab. Janusza Bujnickiego, obroniłam w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie w listopadzie 2007 roku, uzyskując stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii. Recenzentami pracy byli Prof. dr hab. Andrzej Piekarów oraz Prof. dr hab. Zofia Szweykowska-Kulińska. Moja praca doktorska dotyczyła: izolacji natywnego enzymu TspGWI, sekwencjonowania, analizy bioinformatycznej, klonowania i ekspresji genu *tspGWTRM* w bakteriach *E. coli* oraz kompleksowej analizy biochemicznej natywnego i rekombinowanego wariantu badanego białka.

Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Po obronie doktoratu rozpoczęłam pracę w Zakładzie Teoretycznej Chemii Fizycznej (obecnie Pracownia Sensybilizatorów Biologicznych) w Katedrze Chemii Fizycznej na Wydziale Chemii UG, kierowanym przez Prof. dr hab. Janusza Raka, gdzie brałam udział w interdyscyplinarnych badaniach eksperymentalnych dotyczących radio- i fotosensybilizatorów DNA, mających na celu selektywne uwrażliwienie komórek nowotworowych na działanie promieniowania wysokoenergetycznego oraz UV. Przed moim zatrudnieniem zespół Prof. Janusza Raka zajmował się głównie badaniami teoretycznymi, wykorzystującymi zaawansowane metody obliczeniowe. W trakcie mojej pracy w Zakładzie Teoretycznej Chemii Fizycznej odegrałam znaczącą rolę w tworzeniu i organizacji nowego laboratorium naukowo-badawczego, szkoleniu moich współpracowników (studentów i doktorantów Wydziału Chemii UG) w zakresie współczesnych technik biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, które wprowadzaliśmy do badań nad radio- i fotosensybilizatorami DNA. Miałam również znaczący udział w przygotowywaniu 3 grantów badawczych (wymienionych w **załączniku nr 3; pkt. II.I**), które umożliwiły zespołowi Prof. dr hab. Janusza Raka zakup podstawowego sprzętu laboratoryjnego oraz rozpoczęcie zaplanowanych, interdyscyplinarnych prac doświadczalnych.

Wyniki naszych wspólnych badań zostały opublikowane:

- **Zylicz-Stachula, A.**, Polska, K., Skowron, P.M., Rak, J. Artificial Plasmid Labeled with 5-Bromo-2'-deoxyuridine: A Universal Molecular System for Strand Break Detection. *ChemBioChem* (2014), 15(10):1409-1412. (IF₂₀₁₄ = **3,088**; MNiSW₂₀₁₅ = **30**)
- Zdrowowicz, M., Michalska, B., **Zylicz-Stachula, A.**, Rak, J. Photoinduced Single Strand Breaks and Intrastrand Cross-Links in an Oligonucleotide Labeled with 5-Bromouracil. *J Phys Chem B*. (2014), 118(19):5009-5016. (IF₂₀₁₄ = **3,302**; MNiSW₂₀₁₅ = **30**)
- Sobolewski, I., Polska, K., **Żylicz-Stachula, A.**, Jeżewska-Fraćkowiak, J. Rak J., Skowron, P. Enzymatic synthesis of long double-stranded DNA labeled with haloderivatives of nucleobases in a precisely pre-determined sequence. *BMC Biochemistry* (2011), 12:47. (IF₂₀₁₂ = **1,988**; MNiSW₂₀₁₅ = **20**).
- Michalska, B., Sobolewski, I., Polska, K., Zielonka, J., **Żylicz-Stachula, A.**, Skowron, P., Rak, J. PCR synthesis of double stranded DNA labeled with 5-bromouridine. A step towards finding a bromonucleoside for clinical trials. *J Pharm Biomed Anal* (2011), 56, 671-677. (IF₂₀₁₁ = **2,967**; MNiSW₂₀₁₅ = **35**)
- Polska, K., Zielonka, J., Chomicz, L., Czerwicka, M., Stepnowski, P., Guzow, K., Wicz, W., Smużyńska, M., Kasprzykowski, F., **Żylicz-Stachula, A.**, Skowron, P.M., Rak, J. Unexpected photoproduct generated via the acetone-sensitized photolysis of 5-Bromo-2'-deoxyuridine in a water/isopropanol solution: experimental and computational studies. *J Phys Chem B* (2010), 114, 16902-16907. (IF₂₀₁₀ = **3,603**; MNiSW₂₀₁₅ = **30**).

Pracując w zespole Prof. dr hab. Janusza Raka pozostałam jednak ściśle związana z interesującą mnie od okresu studiów tematyką termostabilnych endonukleaz restrykcyjnych. Za zgodą Prof. dr hab. Janusza Raka około 50% swojego czasu pracy nadal poświęcałam na badania enzymów należących do odkrytej przez nas rodziny białek typu *Thermus*, planując wykorzystać opublikowane prace do przygotowania własnej habilitacji. Swoje badania kontynuowałam we współpracy z Prof. dr hab. Januszem Bujnickim oraz z Prof. dr hab. Piotrem Skowronem, moim przełożonym z okresu pracy w firmie Eurx, który w 2006 został zatrudniony na Wydziale Chemii UG. W 2010 roku przeszukując internetowe bazy danych znalazłam trzy kolejne enzymy: RM.TsoI z bakterii *Thermus scotoductus* oraz RM.RpaI i RM.CchII, pochodzące z mezofilnych bakterii, które ze względu na znaczące podobieństwo sekwencji aminokwasowej zakwalifikowałam do rodziny białek typu *Thermus*. Konsekwencją tego odkrycia było nawiązanie

przez nasz zespół współpracy naukowej z Prof. Arvydasem Lubysem (Dyrektorem Badań i Rozwoju w firmie Thermo Fisher Scientific Baltics UAB; Department of Botany and Genetics, Vilnius University, Lithuania). Współpraca ta zaowocowała do tej pory 3 publikacjami:

- **Żylicz-Stachula, A.**, Żolnierkiewicz, O., Lubys, A., Ramanauskaite, D., Mitkaite, G., Bujnicki, J.M., Skowron, P.M. Related bifunctional restriction endonuclease-methyltransferase triplets: TspDII, Tth111II/TthHB27I and TsoI with distinct specificities. *BMC Mol Biol* (2012), 13:13. (IF₂₀₁₂ = **2,796**; MNiSW₂₀₁₅ = **30**)
- Skowron, P.M., Vitkute, J., Ramanauskaite, D., Mitkaite, G., Jezewska-Frackowiak, J., Zebrowska, J., **Zylicz-Stachula, A.**, Lubys, A. Three-stage biochemical selection: cloning of prototype class IIS/IIC/IIG restriction endonuclease-methyltransferase TsoI from the thermophile *Thermus scotoductus*. *BMC Mol Biol.* (2013), 14:17. (IF₂₀₁₃ = **2,057**; MNiSW₂₀₁₅ = **30**)
- Jezewska-Frackowiak, J., Lubys, A., Vitkute, J., Zakareviciene, I., Zebrowska, J., Krefft D, Skowron, M., **Zylicz-Stachula, A.**, Skowron, P.M.: A new prototype IIS/IIC/IIG endonuclease-methyltransferase TsoI from the thermophile *Thermus scotoductus*, recognizing 5'-TARCCA(N11/9)-3' sequences. *J. Biotechnol.* (2015), 194:19-26. (IF_{2014/2015} = **2,884**; MNiSW₂₀₁₅ = **30**)

Ponadto od 2007 wspólnie z Prof. Piotrem Skowronem oraz Dr inż. Joanną Jezewską-Frackowiak współtworzyliśmy nową Katedrę Biotechnologii Molekularnej, organizując od podstaw nowoczesne i dynamicznie działające laboratorium biologii molekularnej, aplikując o granty aparaturowe i naukowo-badawcze, rozwijając współpracę z zagranicznymi i krajowymi ośrodkami badawczymi, a także szkoląc wybranych studentów i doktorantów Wydziału Chemii, zainteresowanych badaniami interdyscyplinarnymi na pograniczu chemii i biologii molekularnej, którzy stali się wkrótce cennymi członkami naszego zespołu.

We wrześniu 2012 roku uzyskałam możliwość oficjalnego przeniesienia się do współtworzonej przeze mnie Katedry Biotechnologii Molekularnej, kierowanej przez Prof. dr hab. Piotra Skowrona, gdzie pracuję do dnia dzisiejszego na stanowisku adiunkta. Ze względu na moje sprecyzowane od początku zainteresowania naukowe, a przede wszystkim na ograniczenia czasowe, związane z dużą liczbą realizowanych projektów badawczych, zdecydowałam się na zakończenie mojej dotychczasowej współpracy naukowej z panem Prof. dr hab. Januszem Rakiem. Na moją decyzję wpłynął również w znacznej mierze fakt, iż w skład zespołu Prof. dr hab. Janusza Raka wchodziły już odpowiednio wyszkolone osoby (częściowo również przeze mnie), które z powodzeniem mogły zastąpić mnie w prowadzonych wcześniej w ramach współpracy pracach badawczych. Zespół Prof. dr hab. Janusza Raka jest obecnie niezwykle prężnie działającym zespołem, prowadzącym zaawansowane badania teoretyczne i eksperymentalne.

Przez cały czas staram się również zachować ścisły związek z przemysłem biotechnologicznym, między innymi poprzez staże naukowe i współpracę z firmami biotechnologicznymi (REVONGEN, New England Biolabs, Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, MedVentures, BioVentures, Innovabion, ProScience), a także udział w licznych projektach aplikacyjnych (**załącznik nr 3; pkt. II.I**).

6. Plany badawcze:

Obecnie biorę aktywny udział w dwóch dużych projektach badawczo-rozwojowych, dotyczących nowoczesnych metod konstrukcji rekombinowanych szczepionek nowej generacji oraz medycyny regeneracyjnej (**załącznik nr 3; pkt. II.I**). Jednak najbliższym mi tematem badawczym, realizowanym od 2000 roku, pozostają nadal unikalne metylotransferazo-

endonuklasy z rodziny białek typu *Thermus*. Projekt ten, w przeciwieństwie do innych realizowanych przeze mnie badań aplikacyjnych, ma charakter poznawczy. Do tej pory zaowocował już 14 publikacjami w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, których jestem współautorem. Kolejne publikacje są obecnie w trakcie przygotowywania. Projekt ten ma nadal duży potencjał publikacyjny i budzi zainteresowanie uznanych ekspertów w dziedzinie ENaz, o czym miałam okazję przekonać się, prezentując wyniki swoich badań na odbywającej się raz na cztery lata międzynarodowej konferencji: 7th NEB Meeting on DNA Restriction and Modification w Gdańsku w sierpniu 2015 (**załącznik nr 4; pkt B**), gdzie zostałam zaproszona do wygłoszenia referatu. Pomimo dotychczasowych trudności w uzyskaniu w Polsce finansowania tej tematyki badawczej (do tej pory złożyłam 4 wnioski grantowe w konkursach NCN i 1 w FNP, które zostały wymienione w **załączniku nr 4; pkt. F**) mam nadzieję, że uzyskam w końcu możliwość kontynuacji swoich badań w ramach własnego projektu naukowego. Pod koniec 2014 roku nawiązałam współpracę naukową z panem Prof. dr hab. Matthiasem Bochtlerem z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, w ramach której podjęłam pierwsze próby krystalizacji rekombinowanego białka RM.TaqII w kompleksie z DNA oraz SIN lub SAH, które są analogami SAM - kofaktora MTazy TaqII. Enzymy z grupy *Thermus* są bardzo trudnymi białkami do badań krystalograficznych ze względu na swoją masę cząsteczkową (około 120 kDa) oraz obecność ruchomej domeny ENazy. Do tej pory nikomu nie udało się uzyskać struktury żadnego termostabilnego przedstawiciela enzymów tego typu. Obecnie przygotowujemy delecyjny wariant białka TaqII, posiadający aktywność MTazy, ale pozbawiony domeny ENazy, w celu zwiększenia szansy na uzyskanie odpowiedniej jakości stabilnych kryształów kompleksu białko-DNA. Udało nam się już skonstruować taki wariant. W tej chwili pracujemy jeszcze nad optymalizacją ekspresji rekombinowanego genu oraz oczyszczeniem odpowiedniej ilości białka do dalszych badań krystalograficznych.

Ponadto zamierzam nadal kontynuować badania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych znajdujących się w bakteriiach *T. aquaticus* YT-1: TaqII i odkrytego ostatnio przez mnie TaqIII, w kontekście istniejących w tych bakteriiach unikalnych mechanizmów ewolucyjnych, prowadzących do tworzenia nowych wariantów białka ze zmienioną specyficznością rozpoznawanej sekwencji DNA. Interesują mnie również wzajemne zależności oraz sposób regulacji ekspresji genów tworzących wyżej wymienione systemy RM, a także zweryfikowanie sformułowanej przez mnie hipotezy badawczej, dotyczącej istnienia nieznanych mechanizmów funkcjonujących w bakteriiach z rodzaju *Thermus*, działających na poziomie transkrypcji badanych genów lub na poziomie obróbki potranslacyjnej badanych białek, prowadzących do zmiany specyficzności sekwencji rozpoznawanej, a w konsekwencji do zwiększenia liczby funkcjonalnych ENaz w komórkach bakteryjnych. Projekty te zamierzam realizować we współpracy z New England Biolabs (USA).

7. Bibliografia

Barker, D., Hoff, M., Oliphant, A., White, R. A second Type II restriction endonuclease from *Thermus aquaticus* with an unusual sequence specificity. *Nucleic Acids Res.* (1984), 12(14):5567-5581.

Boratyński, R. Charakterystyka i właściwości fizyko-chemiczne nietypowych endonukleaz restrykcyjnych klasy IIS. (2014) – rozprawa doktorska.

Biotechnology Handbooks. Red. Atkinson, T., Sherwood, F. *Thermus* species. Vol. 9, red. Sharp, R., Williams, R., 1995, Springer Sciences, Business Media New York.

Brüggemann, H., Chen, C. Comparative genomics of *Thermus thermophilus*: Plasticity of the megaplasmid and its contribution to a thermophilic lifestyle. *J Biotechnol.* (2006), 124(4):654-661.

Friedrich, A., Hartsch, T., Averhoff, B. Natural Transformation in Mesophilic and Thermophilic Bacteria: Identification and Characterization of Novel, Closely Related Competence Genes in *Acinetobacter* sp. Strain BD413 and *Thermus thermophilus* HB27. *Appl Environ Microbiol.* (2001), 67(7): 3140–3148.

- Friedrich, A., Prust, C., Hartsch, T., Henne, A., Aeverhoff, B. Molecular analyses of the natural transformation machinery and identification of pilus structures in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* strain HB27. *Appl Environ Microbiol.* (2002), 68(2):745-755.
- Fukuda, K., Tamura, T., Ito, H., Yamamoto, S., Ochi, K., Inagaki, K. Production improvement of antifungal, antitrypanosomal nucleoside sinefungin by rpoB mutation and optimization of resting cell system of *Streptomyces incarnatus* NRRL 8089. *J Biosci Bioeng.* (2010), 109(5):459-465.
- Huang, C.G., Agre, P., Strange, K., Lamitina, T. Isolation of *C. elegans* deletion mutants following ENU mutagenesis and thermostable restriction enzyme PCR screening. *Mol Biotechnol.* (2006), 32(1):83-86.
- Goedecke, K., Pignot, M., Goody, R.S., Scheidig, A.J., Weinhold, E. Structure of the N6-adenine DNA methyltransferase M.TaqI in complex with DNA and a cofactor analog. *Nat Struct Biol.* (2001), 8(2):121-125.
- Gupta, D., Sharma, N. Thermostable restriction endonucleases from thermophilic bacteria. *Int Res J Pharm* (2014), 5(4):259-263.
- Loenen, W.A., Dryden, D.T., Raleigh, E.A., Wilson, G.G., Murray, N.E. Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 2014, 42(1):3-19.
- Menzella HG: Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* (2011), 3:10-15.
- Ohtani, N., Tomita, M., Itaya, M. An extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, is a polyploid bacterium. *J Bacteriol.* (2010) 192(20):5499-5505.
- Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D. REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* (2015), D298-299.
- Sato, S., Hutchinson, C.A. 3rd and Harris, J.I. A thermostable sequence-specific endonuclease from *Thermus aquaticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, (1977), 74(2), 542-546.
- Shinomiya, T., Kobayashi, M., Sato, S. A second site specific endonuclease from *Thermus thermophilus* 111, Tth111II. *Nucleic Acids Res.* (1980), 8(15): 3275-3285.
- Skowron, P.M., Vitkute, J., Ramanauskaite, D., Mitkaite, G., Jezewska-Frackowiak, J., Zebrowska, J., Żylicz-Stachula, A., Lubys, A. Three-stage biochemical selection: cloning of prototype class IIS/IIC/IIG restriction endonuclease-methyltransferase TsoI from the thermophile *Thermus scotoductus*. *BMC Mol Biol.* (2013), 14:17.
- Skowron, P.M., Majewski, J., Żylicz-Stachula, A., Rutkowska, S.M., Jaworowska, I., Harasimowicz-Słowinska, R.I. A new *Thermus* sp. class-IIS enzyme sub-family: isolation of a 'twin' endonuclease TspD'TI with a novel specificity 5'-ATGAA(N(11/9))-3', related to TspGWI, TaqII and Tth111II. *Nucleic Acids Res.* (2003), 31:e74.
- The Restriction Enzyme Database [<http://rebase.neb.com>]
- The GenBank sequence database [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>]
- Wang, X., Gou, D., Xu, S.Y. Polymerase-endonuclease amplification reaction (PEAR) for large-scale enzymatic production of antisense oligonucleotides. *PLoS One* (2010), 5(1):e8430.
- Yadav, M.K., Park, S.W., Chae, S.W., Song, J.J. Sinefungin, a natural nucleoside analogue of S-adenosylmethionine, inhibits *Streptococcus pneumoniae* biofilm growth. *Biomed Res Int.* (2014), 2014:156987.
- Zhao, J., Xie, F., Zhong, W., Wu, W., Qu, S., Gao, S., Liu, L., Zhao, J., Wang, M., Zhou, J., Jie, H, Chen, W. Restriction endonuclease-mediated real-time digestion-PCR for somatic mutation detection. *Int J Cancer* (2013), 132(12):2858-2866.
- Żylicz-Stachula, A., Jezewska-Frackowiak, J., Skowron, P.M. Cofactor analogue-induced chemical reactivation of endonuclease activity in a DNA cleavage/methylation deficient TspGWI N473A variant in the NPPY motif. *Mol Biol Rep* (2014a), 41(4):2313-2323.
- Żylicz-Stachula, A. Zolnierkiewicz, O., Sliwinska, K., Jezewska-Frackowiak, J., Skowron, P.M. Modified 'one amino acid-one codon' engineering of high GC content TaqII-coding gene from thermophilic *Thermus aquaticus* results in radical expression increase. *Microb Cell Fact.* (2014b), 13:7.

- Żylicz-Stachula, A., Żolnierkiewicz, O., Jasiński, J., Skowron, P.M. A new genomic tool, ultra-frequently cleaving TaqII/sinefungin endonuclease with a combined 2.9-bp recognition site, applied to the construction of horse DNA libraries. *BMC Genomics* (2013), 14(1):370.
- Żylicz-Stachula, A., Żolnierkiewicz, O., Lubys, A., Ramanauskaite, D., Mitkaite, G., Bujnicki, J.M., Skowron, P.M. Related bifunctional restriction endonuclease-methyltransferase triplets: TspDTI, Tth111III/TthHB27I and TsoI with distinct specificities. *BMC Mol Biol* (2012), 13:13.
- Żylicz-Stachula, A., Żolnierkiewicz, O., Jeżewska-Fraćkowiak, J., Skowron, P.M. Chemically-induced alterations in TspGWI restriction specificity: a novel TspGWI/sinefungin endonuclease with theoretical 3-bp cleavage frequency. *Biotechniques* (2011), 50(6), 397-406.
- Żylicz-Stachula, A., Żolnierkiewicz, O., Śliwińska, K., Jeżewska-Fraćkowiak, J., Skowron, P.M. Bifunctional TaqII restriction endonuclease: redefining the prototype DNA recognition site and establishing the Fidelity Index for partial cleaving. *BMC Biochemistry* (2011), 12:62.
- Żylicz-Stachula, A., Bujnicki, J.M., Skowron, P.M. Cloning and analysis of bifunctional DNA methyltransferase/nuclease TspGWI, the prototype of a *Thermus* sp. family. *BMC Mol Biol.* (2009), 10:52.
- Żylicz-Stachula, A., Bujnicki, J.M., Skowron, P.M. Erratum: Cloning and analysis of bifunctional DNA methyltransferase/nuclease TspGWI, the prototype of a *Thermus* sp. family. *BMC Mol Biol.* (2014), 15:16.
- Żylicz-Stachula, A., Harasimowicz-Słowińska, R.I., Sobolewski, I., Skowron, P.M. TspGWI, a thermophilic class-IIS restriction endonuclease from *Thermus* sp., recognizes novel asymmetric sequence 5'-ACGGA(N11/9)-3'. *Nucleic Acids Res* (2002), 30:e33.

