



Poznań, 09.05.2021

Dr hab. Piotr Ziółkowski, prof. UAM
Pracownia Biologii Genomu
Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

**Ocena osiągnięcia naukowego i aktywności naukowej dr Agnieszki Żmieńko
w związku z ubieganiem się o stopień doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne**

Uwagi wstępne

Niniejsza ocena została przygotowana na podstawie:

1. autoreferatu zawierającego omówienie osiągnięć naukowych i działalności naukowej Habilitanta,
2. publikacji naukowych stanowiących osiągnięcie naukowe i będących przedmiotem postępowania habilitacyjnego,
3. oświadczeń współautorów ww. publikacji naukowych,
4. wykazu opublikowanych prac naukowych oraz informacji o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki,
5. informacji parametrycznych dostępnych w domenie publicznej.

Informacje biograficzne

Pani dr Agnieszka Żmieńko ukończyła studia magisterskie na Uniwersytecie im. A. Mickiewicza w roku 2000 uzyskując tytuł magistra biotechnologii. Bezpośrednio po studiach rozpoczęła pracę nad doktoratem w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, w Pracowni Biologii Molekularnej Roślin kierowanej ówczesznie przez prof. dr hab. Andrzeja Legockiego. W roku 2006 obroniła pracę doktorską zatytułowaną "Analiza ekspresji genów hydrolazy S-adenozylhomocysteiny, L-asparaginazy oraz ENOD40 z *Lupinus luteus* we wczesnych etapach rozwoju brodawki korzeniowej" uzyskując stopień doktora nauk chemicznych w zakresie biochemii. Wkrótce po obronie została zatrudniona w IChB PAN, gdzie pracuje do chwili obecnej. W latach 2011-2012 oraz 2014-2020 dr Żmieńko była zatrudniona również na Politechnice Poznańskiej w charakterze adiunkta. W trakcie doktoratu odbyła półroczny staż na Uniwersytecie Arystotelesa w Salonikach.



Nadesłana dokumentacja wniosku jest kompletna, tak więc spełnione zostały wszystkie wymogi formalne niezbędne do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

Ocena osiągnięcia naukowego

Pani doktor Agnieszka Żmieńko przedstawiła osiągnięcie naukowe zatytułowane "Identyfikacja polimorfizmu liczby kopii DNA jako istotnego składnika kształtującego zmienność genetyczną *Arabidopsis thaliana*" w formie zbioru czterech publikacji. Pierwsza z nich ukazała się w *Theoretical and Applied Genetics* (pięcioletni IF = 3,759) w roku 2014, druga praca ukazała się w *BMC Genomics* (pięcioletni IF = 4,276) w roku 2016, kolejna praca została opublikowana we *Frontiers in Plant Science* (pięcioletni IF = 4.672) w 2012 a ostatnia ukazała się w *Plant Cell* (pięcioletni IF = 10.144) w 2020 roku. Praca z roku 2014 ma charakter przeglądowy, natomiast pozostałe trzy publikacje prezentują wyniki badań. W pracach z 2014, 2016 i 2020 dr A. Żmieńko jest pierwszym autorem, natomiast w pracy z 2017 i 2020 – autorem korespondencyjnym. Warto w związku z tym zauważyć, że w publikacji z *Plant Cell* (2020) dr Żmieńko jest zarówno pierwszym jak i korespondencyjnym autorem, a praca była zrealizowana w części w oparciu o projekty badawcze, w których dr Żmieńko jest kierownikiem. Fakty te podkreślają jej szczególną rolę w przygotowywaniu tej właśnie pracy i świadczą moim zdaniem o samodzielności naukowej Habilitantki. W sumie publikacje wskazane w osiągnięciu naukowym miały łączny pięcioletni *impact factor* równy 22,851 i były cytowane 118 razy, co jest bardzo dobrym wynikiem świadczącym o znaczącym wpływie uzyskanych wyników na rozwój dyscypliny naukowej. W tym kontekście warto podkreślić, że praca przeglądowa Habilitantki opublikowana w 2014 została wyróżniona przez bazę Web of Science jako „Highly cited in the field”, a praca z 2020 roku została opatrzona komentarzem w sekcji *Plant Science Research Weekly* na portalu *Plantae*.

Zagadnieniem, które szczególnie interesuje dr Agnieszkę Żmieńko jest polimorfizm liczby kopii i jego wpływ na zmienność genetyczną w genomach roślinnych. To zagadnienie znalazło swoje odzwierciedlenie w tytule osiągnięcia habilitacyjnego, z uwzględnieniem faktu, że prace doświadczalne prowadzone przez Habilitantkę skupiają się na roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana*. Wybór takiej tematyki badawczej jest jak najbardziej uzasadniony. Po pierwsze, polimorfizm w liczbie kopii genów wydaje się jednym z najważniejszych aspektów ewolucji genomów eukariotycznych zarówno w kontekście adaptacji środowiskowej, jak i specjacji. Nie od dziś wiadomo, że nowe geny nie wyłaniają się z genomu zupełnie *de novo*, lecz powstają przede wszystkim w wyniku swoistej „reutilizacji” genów już istniejących. Aby było to możliwe przy zachowaniu pełnej funkcjonalności genomu, musi wprawdzie dojść do utworzenia dodatkowych kopii genowych, które dzięki uzyskanemu w ten sposób rozluźnieniu presji selekcyjnej stają się poligonem doświadczalnym ewolucji umożliwiając testowanie nowych genów względem zmieniających się warunków środowiskowych. Po drugie, ze względu na pewne ograniczenia technologii sekwencjonowania nowej generacji nasza wiedza o polimorfizmie kopii w naturalnych populacjach organizmów jest bardzo ograniczona i



wymaga uzupełnienia. Obecnie dysponujemy wprawdzie metodami pozwalającymi na sekwencjonowanie fragmentów o długości nawet kilkudziesięciu tysięcy par zasad, takich jak *PacBio* czy *Oxford Nanopore*, jednak ich zastosowanie na szeroką skalę, jaka wymagana jest w badaniach zmienności populacyjnej, pozostaje wciąż niemożliwe. Ponadto sam wybór modelu badawczego jest bardzo trafny: *A. thaliana* jest gatunkiem, który nigdy nie udomowiony przez człowieka nie był w żadnym stopniu poddany selekcji sztucznej, o której wiadomo, że w dramatyczny sposób ogranicza naturalną zmienność. Co więcej, rozbudowany program sekwencjonowania genomów *A. thaliana* dostarczył Habilitantce solidnej bazy do studiowania polimorfizmu liczby kopii poprzez udostępnianie sekwencji genomowej opartej na krótkich odczytach dla ponad 1000 różnych linii oraz dostępowi do nasion dla zsekwencjonowanych linii.

Pierwsza praca wchodząca w skład osiągnięcia habilitacyjnego, która ukazała się w *Theor Appl Genet* w 2014 roku, ma charakter przeglądowny. Habilitantka podejmując decyzję o rozpoczęciu badań w zakresie polimorfizmu liczby kopii postanowiła dokonać gruntownego przeglądu literaturowego na ten temat, by szczegółowo poznać obecny stan wiedzy, zidentyfikować braki w naszym rozumieniu tego zagadnienia i lepiej zaplanować swoje przyszłe działania. Publikacja stanowi prawdziwe kompendium wiedzy na temat polimorfizmu liczby kopii w genomach roślinnych a główna autorka tej pracy wykazała się zdolnością do całościowej analizy bogatego materiału literaturowego i jednocześnie syntezy najważniejszych osiągnięć. W pracy pokrótce opisano mechanizmy powstawania CNV i wpływ tych zmian na ekspresję informacji genetycznej, a szczegółowo przedstawiono ówczesne metody identyfikacji CNV, opisano dowody świadczące o powszechnej obecności tego typu polimorfizmów w genomach roślinnych, by finalnie opisać wielkoskalowe programy sekwencjonowania populacji w kontekście dostarczanych przez nie informacji na temat CNV. Wartościowym elementem pracy jest obszerna tabela zawierająca szczegółowe podsumowanie całogenomowych badań polimorfizmu CNV w genomach roślinnych. O tym, że ta praca przeglądowa miała nowatorski charakter będąc pierwszą, która w taki sposób omawia wspomniane zjawisko świadczy fakt, że praca jest do chwili obecnej szeroko cytowana i zasłużyła na oznaczenie „Highly cited paper” w bazie Web of Science, znajdując się wśród 1% najlepiej cytowanych publikacji w obszarze „Agricultural Sciences”. Habilitantka oświadczyła, że jej rola w przygotowywaniu publikacji polegała na udziale w określeniu koncepcji pracy, zgromadzeniu i przeanalizowaniu materiałów źródłowych, zaplanowaniu i przygotowaniu wszystkich ilustracji oraz sporządzeniu tabel a także przygotowaniu manuskryptu, który został finalnie zredagowany we współpracy z pozostałymi autorami.

Kolejna praca opublikowana w *BMC Genomics* w 2016 roku jest już typową pracą eksperymentalną, w której przeprowadzono analizę polimorfizmów CNV dla regionu ok. 26 kbp, obejmującego 5 genów. Zastosowano dwa różne, komplementarne podejścia badawcze: analizę MLPA oraz technikę emulsyjnego PCR, a zbadano niemałą liczbę 189 linii *Arabidopsis thaliana*. Obie metody dawały bardzo zbliżone wyniki dotyczące CNV, jednak metoda



emulsyjnego PCR pozwalała na precyzyjne określenie liczby kopii aż do 14, podczas gdy w metodzie MLPA progiem dokładnych pomiarów było ok. 6 kopii. Dodatkowo, autorzy przeprowadzili analizy filogenetyczne stwierdzając, że opisywane przez nich polimorfizmy liczby kopii zachodziły wielokrotnie i niezależnie w różnych liniach. Ważnym moim zdaniem osiągnięciem jest bardzo wnikliwa analiza regionu CNV_611 zawierającego geny *AT3G18530* i *AT3G18535* w kontekście mechanizmów jego powstawania/usuwania w populacjach *A. thaliana*. Autorom udało się odtworzyć te procesy a weryfikacja eksperymentalna punktów rekombinacji („breakpointów”) w pełni potwierdziła postawione hipotezy. Wynik ten jest ważny dla pogłębienia naszego zrozumienia praw rządzących ewolucją genomów roślinnych. Należy też zauważyć, że cała praca jest obszerna, przejrzysta i dopracowana w najdrobniejszych szczegółach.

W publikacji w *BMC Genomics* dr Żmieńko pełniła funkcję pierwszego autora (spośród pięciu autorów) i nie ulega wątpliwości, że jej udział w pracy był absolutnie kluczowy. W tej pracy autorzy drugi i czwarty to doktorantka i studentka, które znajdowały się pod bezpośrednią opieką Habilitantki. Zgodnie ze stosownymi oświadczeniami dr Żmieńko opracowała koncepcję badań i zaplanowała eksperymenty, wykonała znaczną część doświadczeń, przeprowadziła większość analiz bioinformatycznych i zaproponowała model powstawania CNV w tym regionie, a także napisała w znacznej mierze manuskrypt i przygotowała wszystkie figury.

W 2017 roku Habilitantka opublikowała artykuł we *Frontiers in Plant Science*, który jest klasyczną pracą metodyczną. Jest to szczegółowy protokół przeprowadzania analizy liczby kopii przy użyciu techniki MLPA. Na uwagę zasługuje fakt przygotowania tego protokołu w bardzo przystępny sposób, umożliwiający jego zastosowanie również przez osoby niebędące specjalistami w zakresie biologii molekularnej. W tym celu do protokołu dołączono szereg użytecznych narzędzi, np. skoroszyt Excel pozwalający na półautomatyczne projektowanie sond molekularnych na potrzeby techniki MLPA. Zaprezentowane w pracy dane w sekcji „Anticipated results” zostały dobrze zaplanowane obejmując zarówno zestawy genów niewykazujących zmienności liczby kopii, następnie zestawy bialleliczne pod kątem liczby kopii oraz zestawy multialleliczne. Sprawdzone zostało również jaki wpływ na wyniki ma obecność dodatkowych, niespecyficznych miejsc wiązania sond. Zaprezentowane przykłady dobrze korespondują do potencjalnych sytuacji eksperymentalnych, w których mogą znaleźć się użytkownicy techniki MLPA.

Dr Agnieszka Żmieńko w tej pracy pełniła rolę autora korespondencyjnego i odpowiadała za określenie koncepcji pracy i opracowanie protokołu MLPA, zaplanowaniu doświadczeń optymalizacyjnych, interpretacji i dyskusji wyników, przygotowaniu części rysunków oraz napisaniu manuskryptu. Trzeba podkreślić fakt, że pierwszych dwóch autorów tej publikacji – dr Anna Samelak-Czajka i Małgorzata Marszałek-Zeńczak – były doktorantkami nad którymi opiekę sprawowała Habilitantka. Stąd ponownie trzeba przyznać, że wkład p. dr Żmieńko w powstanie tej pracy był bardzo istotny.



Z kolei praca opublikowana w *Plant Cell* stanowi wielopoziomową, rozbudowaną analizę polimorfizmu liczby kopii w 1060 zsekwencjonowanych genomów *A. thaliana* należących do różnych ekotypów. Habilitantka opracowała złożony analityczny „pipeline”, który w oparciu o siedem różnych programów zidentyfikował występujące w genomie *A. thaliana* regiony CNV. W sumie udało się w ten sposób znaleźć ponad 70 tys. dużych indeli i ponad 34 tys. regionów CNV, z których 19 tys. było potwierdzonych przy użyciu co najmniej dwóch programów. W oparciu o tak przygotowany zestaw danych Habilitantka mogła zadawać konkretne pytania w odniesieniu do ewolucji struktury genomu w kontekście polimorfizmu CNV. Na przykład stwierdziła, że CNV znacznie częściej pokrywają transpozony aniżeli sekwencje genowe, i znacznie częściej występują w pobliżu regionów centromerowych aniżeli w obrębie ramion chromosomowych. Najciekawsze analizy dotyczą par gen-transpozon, które z reguły mają ten sam statut (CNV lub NONVAR). W tej pierwszej grupie znalazły się przede wszystkim geny kodujące białka pozakomórkowe a także zaangażowane w odpowiedzi na zmiany środowiskowe, podczas gdy w drugiej grupie dominowały geny uczestniczące w podstawowych procesach komórkowych. Istotnym jest również odkrycie, że aż ponad 5000 genów wykazuje zróżnicowanie typu CNV.

W dalszej części pracy wykonano również eksperymentalną walidację poprawności przewidywań bioinformatycznych w oparciu o grupę kilkudziesięciu genów dla ponad 300 ekotypów, przy zastosowaniu metody MLPA. Wyniki tej analizy w pełni zgadzały się z rezultatami analizy bioinformatycznej. Habilitantka przeprowadziła również analizę, której celem było sprawdzenie, na ile rozkład populacyjny wariantów CNV odzwierciedla strukturę populacji *A. thaliana*. Okazuje się, że markery CNV w znacznie lepszym stopniu odzwierciedlają rozkład geograficzny poszczególnych linii *Arabidopsis* aniżeli markery SNP. Co więcej, analiza ta potwierdziła niedawno zaproponowaną hipotezę o dwóch falach migracji *A. thaliana* na półkuli północnej.

Zachęcona takimi danymi Habilitantka postanowiła również wykorzystać dane na temat polimorfizmu CNV do analiz GWAS. Ma to sens zwłaszcza w odniesieniu do tych QTL, które związane są nie z allelami genów, ale z poziomem ich ekspresji. Analiza asocjacji została przeprowadzona w oparciu o 23 cechy fenotypowe i pozwoliła na potwierdzenie takiej asocjacji dla dwóch genów związanych z odpornością na patogeny. Uważam to za duże osiągnięcie Habilitantki, jako że otwiera ono szeroką możliwość badania zależności pomiędzy fenotypem a poziomem ekspresji wynikającym ze zmiennej liczby kopii genów. Przyznam szczerze, że w oparciu o te informacje sam w najbliższej przyszłości planuję skorzystać z tej wiedzy przy analizach GWAS którymi zajmujemy się w moim zespole. Efektem analiz prezentowanych w pracy w *Plant Cell* jest także udostępnienie browsera pozwalającego na sprawdzenie zmienności liczby kopii dla dowolnego genu *A. thaliana* w oparciu o dane z 1060 ekotypów.

W publikacji w *Plant Cell* dr Żmieńko było odpowiedzialna za zdefiniowanie koncepcji pracy i zaplanowanie wszystkich eksperymentów, przy czym większość z nich została przez



Habilitantkę wykonana. Poza tym dr Żmieńko wykonała znaczną część analiz bioinformatycznych, przeanalizowała uzyskane wyniki, opracowała koncepcję browsera do przeglądu polimorfizmu kopii genów, oraz napisała manuskrypt i opracowała ilustracje, tabele i suplementy. Fakt, że Habilitantka jest zarówno pierwszym jak i korespondencyjnym autorem tej publikacji najlepiej świadczy o jej wkładzie w jej przygotowanie. W tym miejscu warto też podkreślić rangę czasopisma, w którym praca się ukazała – *Plant Cell* to jedno z najbardziej prestiżowych i najbardziej rozpoznawanych pism naukowych dotyczących szeroko pojętej biologii roślin, w którym publikacja wiąże się zawsze z ogromem pracy i wielkim wysiłkiem autorów.

Przeglądając prace zgłoszone jako osiągnięcie naukowe dr Agnieszki Żmieńko trzeba przyznać, że wszystkie publikacje wchodzące w jego skład są bardzo wartościowymi pracami, istotnymi dla zrozumienia zmienności populacyjnej i ewolucji genomów roślinnych. Wszystkie te prace zostały przygotowane z najwyższą starannością i dbałością o szczegóły, i stanowią bardzo zwartą tematycznie grupę. Nie ulega mojej wątpliwości, że udział dr Żmieńko w ich przygotowaniu był absolutnie kluczowy. Biorąc pod uwagę fakt, że tematyka CNV nie była wcześniej badana w zespołach, w których dr Żmieńko pracowała, należy wyciągnąć wniosek, iż jest ona w dużej mierze odpowiedzialna za rozpoczęcie i rozwinięcie tej tematyki badawczej w IChB PAN.

Podsumowując całościowo osiągnięcie naukowe dr Agnieszki Żmieńko stwierdzam, że zawarte w nim wyniki badań nad polimorfizmem CNV w genomie *A. thaliana* wnoszą istotny wkład w rozwój dyscypliny *nauki biologiczne* i oceniam je zdecydowanie pozytywnie.

Ocena aktywności naukowej

Na pozostały dorobek dr Agnieszki Żmieńko składa się 6 artykułów opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora, 19 artykułów (w tym 14 z listy JRC) opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora, oraz odpowiednio po jednym rozdziale w monografiach. Widać wyraźnie, że po uzyskaniu stopnia doktora publikacje pojawiają się renomowanych czasopismach naukowych, takich jak *BMC Genomics*, *Oncotarget*, *Plant Physiology*, *Frontiers Plant Science* czy *Scientific Reports*. W kilku z tych publikacji Habilitantka występuje na pozycji pierwszego albo korespondencyjnego autora. Publikacje cechują się bardzo różną tematyką choć część z nich dotyczy aspektów metodycznych związanych z różnego typu analizami genomicznymi, co jest zgodne z zainteresowaniami naukowymi Habilitantki. Z drugiej strony różnorodność tematyczna tych prac wskazuje, że dr Żmieńko posiada umiejętności i wiedzę, która z powodzeniem może być zastosowana w badaniach niezwiązanych z jej bezpośrednimi zainteresowaniami. W skład dorobku naukowego wchodzi również współautorstwo w jednym patencie krajowym.

Dr Żmieńko w trakcie swojej kariery naukowej wielokrotnie prezentowała swoje wyniki na konferencjach krajowych i zagranicznych, zarówno w formie wystąpień ustnych (w tym



sześć wykładów na zaproszenie), jak i prezentacji posterowych. Równie istotny dla oceny aktywności naukowej jest udział Habilitantki w realizacji projektów badawczych. Łącznie doliczyłem się udziału w 15 takich grantach, finansowanych przede wszystkim przez NCN i wcześniej MNISW. Na szczególną uwagę jednak zasługują projekty, w których Habilitantka pełniła funkcję kierownika bądź głównego wykonawcy. Są to projekty bezpośrednio związane z tematyką zmienności liczby kopii i identyfikacją mechanizmów odpowiedzialnych za ich powstawanie. Najnowsze z tych grantów – Miniatura i Sonata, w których dr Żmieńko pełni funkcję kierownika – wskazują na umiejętność przygotowywania projektów badawczych, które z powodzeniem konkurują w otwartych konkursach NCN. Świadczy to o pozyskaniu przez Habilitantkę umiejętności starania się o fundusze na potrzeby prowadzenia badań i konstruowania własnego zespołu badawczego, które to cechy są kluczowe dla samodzielnej aktywności naukowej. Ponadto dr Żmieńko pełniła funkcję promotora pomocniczego w dwóch przewodach doktorskich (jeden zakończony obroną pracy w 2018 i drugi w toku) a także opiekuna naukowego we wcześniejszym przewodzie doktorskim (2014). Była także promotorem jednej pracy magisterskiej, sześciu prac licencjackich, ośmiu staży studenckich, od lat jest też aktywna na polu dydaktyki prowadząc wykłady i ćwiczenia dla studentów, zatem posiada odpowiednie kwalifikacje do kształcenia młodego pokolenia badaczy.

Współczynniki parametryczne dorobku naukowego Habilitanta są następujące: łączny pięcioletni współczynnik oddziaływania wyniósł 82,239, indeks Hirsza – 11, a sumaryczna liczba cytowań wyniosła 409. Są to wskaźniki dobre jak na badacza pracującego w tematyce roślinnej.

Ocena końcowa

Stwierdzam, że przedstawione mi do oceny osiągnięcia naukowe oraz pozostała aktywność naukowa dr Agnieszki Żmieńko spełniają wymogi stawiane w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) – w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Z tej te przyczyny pozytywnie opiniuję wniosek o nadanie doktor Agnieszce Żmieńko stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Piotr Ziółkowski