

Poznań, 16 lipca 2012

Prof. dr hab. Wojciech T. MARKIEWICZ
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
61-704 Poznań, ul. Noskowskiego 12/14

**Ocena dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej
dr Jacka Jemielitego
pt. „*Synteza i właściwości analogów końca 5' mRNA z modyfikowanym
łańcuchem trifosforanowym*”**

I. Ocena dorobku naukowego

Na całkowity dorobek naukowy habilitanta, od uzyskania stopnia magistra w 1997 r. do chwili obecnej, składa się 51 publikacji z listy filadelfijskiej (w tym po doktoracie 46). Jego prace były cytowane dotychczas 427 razy, a indeks Hirscha wynosi 13. O jakości czasopism, w których publikuje dr JEMIELITY świadczy sumaryczny Impact Factor (2010), ponad 173. Habilitant jest też współautorem 5 zgłoszeń patentowych z których 3 to zgłoszenia międzynarodowe w trybie PCT. Wszystkie prace opublikowane zostały w anglojęzycznych, międzynarodowych czasopismach naukowych. Wśród czasopism można wymienić m.in. *RNA*, *New J. Chem.*, *ChemBioChem*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *Org. Biomol. Chem.*, *Tetrahedron Lett.*, *Biochemistry*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, ale także *Molec. Cell*, *Gene Therapy*, *Journal of Biological Chemistry*.

Do rozprawy habilitacyjnej dr JEMIELITY wybrał 13 (IF 2,6 – 6,05) z 46 opublikowanych po doktoracie publikacji. W 8 z nich jest autorem korespondującym. Praca nr 13, w której Habilitant jest pierwszym i korespondującym autorem, podsumowuje dotychczasowe badania nad syntezą analogów kapu modyfikowanych w obrębie mostka oligofosforanowego i pokazuje szerokie spektrum możliwych przyszłych badań z wykorzystaniem tego typu związków. Ponadto dr JEMIELITY wybrał ze swego dorobku 5 dodatkowych publikacji pokazujących potencjał aplikacyjny analogów kapu ze zmodyfikowanym mostkiem trifosforanowym, w których analogi te miały kluczowe znaczenie dla uzyskania opisanych wyników (IF 4,5 – 14,2).

Udział Habilitanta w przygotowaniu publikacji współautorskich był znaczący i w przedstawionym do oceny materiale został precyzyjnie określony i potwierdzony oświadczeniami współautorów.

Habilitant studiował chemię na Uniwersytecie Warszawskim. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w 2002 roku na podstawie rozprawy doktorskiej p.t. „*Enzymatyczne syntezy znakowanych związków aromatycznych i ich wykorzystanie w badaniu mechanizmu reakcji katalizowanej przez wiązkę fenyloalaninową*” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marianny KAŃSKIEJ na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Zaraz po obronie pracy doktorskiej został zatrudniony na stanowisku specjalisty naukowo-technicznego, dołączając do zespołu prof. dr hab. Edwarda DARŻYŃKIEWICZA, w Zakładzie

Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki UW. Zatrudnienie na stanowisku adiunkta od października tego samego roku (2002) poprzedził krótki staż naukowy w Institute of Structural Biology, Grenoble, Francja (1 miesiąc), w czasie którego dr JEMIELITY śmiało wkroczył w nową dla siebie problematykę badań biosyntezy białka przy użyciu analogów tzw. kapu (*ang. cap*, modyfikacja na końcu 5' eukariotycznych mRNA). W kolejnym roku dr Jacek JEMIELITY odbył 3-miesięczny staż naukowy na Uniwersytecie w Turku, Finlandia, zajmując się syntezą oligonukleotydów posiadających na końcu 5' strukturę kapu na podłożu stałym. Dr JEMIELITY zmieniając wydział, pozostał jednak w kręgu badań chemicznych pozwalających zrozumieć molekularną naturę procesów biologicznych. Zespół prof. dr hab. DARZYŃKIEWICZA od lat zajmuje się badaniami nad strukturą i rolą końca 5' mRNA.

Dr Jacek JEMIELITY uzyskał w czasie swojej pracy zawodowej cały szereg nagród i wyróżnień: zespołową Nagrodę Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego im. Grzegorza BIAŁKOWSKIEGO za projektowanie i chemiczne syntezy analogów kapu oraz biofizyczne badania ich oddziaływań z czynnikami białkowymi w 2008 roku, stypendium tygodnika POLITYKA „Zostańcie z nami” (2008), stypendia rektorskie w latach 2004 - 2007 oraz Nagrodę Rektora UW III stopnia za osiągnięcia naukowe w 2004 roku.

Dr JEMIELITY może poszczycić się nie tylko współpracą i jej dobrymi wynikami, wtedy gdy dotyczy to młodych współpracowników – magistranci, doktoranci – ale także sukcesami płynącymi z długoletniej współpracy z prof. Robertem RHOADSEM z Louisiana State University, USA.

Dr Jacek JEMIELITY był kierownikiem projektu badawczego MNiSW Nr N204 089438 (2010-2013): „*Biotynylowane i fluorescencyjnie znakowane analogi końca 5' mRNA (kapu) - nowe możliwości w badaniach funkcji struktury kapu i metabolizmu mRNA*”. Był głównym wykonawcą w licznych projektach kierowanych przez prof. DARZYŃKIEWICZA, a także koordynatorem grantu ufundowanego przez firmę farmaceutyczną BioNTech AG, Mainz, Niemcy - (2010-2012) - „*Synthesis of chemically modified cap analogs for preclinical and clinical studies*”.

Habilitant prowadzi zajęcia dydaktyczne dla studentów Uniwersytetu Warszawskiego. W latach 2002-2008 prowadził zajęcia dla studentów Wydziału Fizyki, którzy wybrali specjalność *BIOFIZYKA*. Współorganizował program nauczania i prowadzi zajęcia dla słuchaczy dwóch specjalności kierunku „*Zastosowania Fizyki w Biologii i Medycynie*” w ramach Międzywydziałowych Interdyscyplinarnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych (MISMaP). Był opiekunem naukowym licznych dyplomantów (licencjaty 6), magistrantów (5) oraz doktorantów (3). Obecnie jest promotorem pomocniczym w 2 przewodach doktorskich, a także nadzoruje siedmioro studentów (licencjaty i prace magisterskie). Prowadzi także zajęcia w ramach Krajowego Funduszu na Rzecz Dzieci. Pracuje z uzdolnioną młodzieżą, laureatami i stypendystami prestiżowych konkursów czy olimpiad naukowych.

Ważnym osiągnięciem dr. JEMIELITEGO było zorganizowanie Laboratorium Chemii Bioorganicznej w Zakładzie Biofizyki i jego wyposażenie w nowoczesną aparaturę badawczą, poprzedzone udanymi staraniami o pozyskanie środków na ten cel. Fakt, że znalazł się wśród członków Zespołu Dziekańskiego ds. przygotowania aplikacji Wydziału Fizyki UW o status KNOW świadczy o wysokiej pozycji Habilitanta w jego środowisku zawodowym.

A zatem również na polu dydaktyczno-organizacyjnym Habilitant legitymuje się znaczącym dorobkiem i jest w pełni dojrzały do prowadzenia samodzielnej działalności.

II. Ocena pracy habilitacyjnej

II.1. Ocena zgodności z wymogami formalnymi

Jako podstawa rozprawy habilitacyjnej przedstawionych zostało 13 prac opublikowanych w okresie 2003 - 2012 w następujących czasopiśmie: *RNA* (3), *Tetrahedron Lett.* (2), *New J. Chem.* (2), *Bioorg Med. Chem.* (2), *Biochemistry* (1), *Bioorg Med. Chem. Lett.* (1), *Org. Biom. Chem.* (1) oraz *ChemBioChem* (1). Jedną z prac w *New J. Chem* jest pracą przeglądową i jej autorem korespondującym jest Habilitant. Wszystkie pozostałe prace to oryginalne wieloautorskie prace doświadczalne, a w 8 z nich autorem korespondującym jest dr JEMIELITY.

W tym świetle nie ma potrzeby dyskusji jakie się zwykle prowadzi w przypadku rozpraw habilitacyjnych opartych o prace wieloautorskie, a szczególnie wtedy gdy prace zostały przygotowane i/lub opublikowane zagranicą ze współudziałem badaczy z laboratoriów zagranicznych. Oświadczenia współautorów nie pozostawiają zresztą wątpliwości co do rzeczywiście zasadniczego wkładu pana dr. JEMIELITEGO w oceniane publikacje, takiego jakiego oczekujemy od samodzielnego pracownika naukowego.

Przedstawiona do oceny materiał spełnia zatem wymogi formalne stawiane pracom habilitacyjnym.

II.2. Zakres i wartość merytoryczna rozprawy

Tematyka badań analogów kapu modyfikowanych w obrębie mostka trifosforanowego prowadzonych w Instytucie Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego w zespole prof. DARŻYŃKIEWICZA ma bardzo duże znaczenia zarówno dla rozwoju metodologii syntezy chemicznej tych związków, jak również ze względu na ich właściwości, dla zastosowań ich jako wartościowych narzędzi w biotechnologii, biologii molekularnej oraz potencjalnie w medycynie.

W syntezie analogów kapu zasadniczym etapem syntezy jest utworzenie wiązania pirofosforanowego pomiędzy dwiema podjednostkami nukleotydowymi. Większość stosowanych podejść syntetycznych opiera się na wyposażeniu (aktywacja) jednej podjednostki nukleotydowej w dobrą grupę opuszczającą oraz użyciu drugiej podjednostki jako czynnika nukleofilowego. Spośród opisanych w literaturze przedmiotu wariantów dr JEMIELITY wybrał drogę poprzez fosforoimidazolidy wprowadzane z użyciem jako aktywatora mieszaniny 2,2'-ditiodipirydyny i trifenylofosfiny (reakcja MUKAIYAMY - HASHIMOTO), a następnie jego reakcje z nukleofilem nukleotydowym w obecności bezwodnego chlorku cynku w warunkach opracowanych przez Mitsuo SEKINE i współpracowników. Opanowanie do perfekcji tej metody aktywacji i kondensacji stało się podstawą sukcesu prac syntetycznych Habilitanta i jego podopiecznych. Zapewniło powodzenie wszystkim przedsięwzięciom badawczym zespołu prowadzącego wszechstronne badania analogów kapu, bardzo aktywnie publikującym w ostatniej dekadzie. Trzeba przyznać, że chemia ta jest trudna pod względem warsztatowym, a same związki bardzo wrażliwe chemicznie wymagają dużych umiejętności dla ich oczyszczenia i scharakteryzowania. Udało się nie tylko pokazać duży potencjał metody z wykorzystaniem P-imidazolidów, ale zastosować ją do syntezy 9 analogów modyfikowanych w łańcuchu fosforanowym.

W *publikacji nr 1* przedstawiona została synteza i właściwości serii dinukleotydowych analogów kapu zawierających mostek trifosforanowy. Modyfikacje kapu obejmowały długość mostka oligofosforanowego (tri-, tetra-, pentaosforany) oraz resztę rybozy fragmentu 7-metyloguanozynowego kapu (2'-O-metylo-, 3'-O-metylo oraz 2'-deoksy). Otrzymane analogi kapu scharakteryzowano spektroskopowo (NMR) i wykorzystano w badaniach zdolności do stymulowania zależnej od kapu translacji po wbudowaniu do mRNA. Wykazano, że długość mostka oligofosforanowego ma istotny wpływ na powinowactwo do czynnika inicjującego translację (eIF4E). Wykazano również, że metylowanie grupy 2'-hydroksylowej reszty rybozyowej zapobiega odwrotnej inkorporacji analogu do transkrypty równie skutecznie jak w pozycji 3', co miało duże znaczenie w późniejszych badaniach. Stwierdzono zwiększenie wydajności translacji *in vitro* w przypadku transkryptów zakończonych tetra fosforanowymi analogami kapu, w odróżnieniu od pentaosforanowych.

Rezultaty analizy metodą miareczkowania fluorescencyjnego pozwoliły wyznaczyć energie oddziaływania analogów kapu różniących się długością mostka oligofosforanowego z białkiem eIF4E oraz jego mutantami (mutacje pozycji Ser209 i Lys159). Stwierdzono, że elektrostatyczne odpychanie redukuje powinowactwo białka eIF4E do kapu. Opisano również syntezę mononukleotydowych analogów kapu o wydłużonym mostku trifosforanowym: m⁷Gp₄ i m⁷Gp₅ (*publikacja nr 2*).

W *publikacji nr 3* opisano wydajną, ogólną metodę syntezy 5'-bisfosfonianów nukleozydów. Nieblokowane nukleozydy poddano regioselektywnemu fosfonylowaniu za pomocą chlorku metylenobis(fosfonianowego). Użyteczność metody wykazano fosfonylując 8 różnych nukleozydów, uzyskując wysokie wydajności, a przede wszystkim wykorzystując do otrzymania metylenowych analogów kapu (*publikacje nr 5 i 6*).

W *publikacji nr 4* opisano nową efektywną metodę syntezy analogów di- i trifosforanów nukleozydów modyfikowanych resztą tiosforanową w terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego. Skuteczność metody potwierdzono syntetyzując 6 analogów β-tiodifosforanowych oraz 3 γ-tiotrifosforanowe. Opracowaną metodologię wykorzystano w syntezie modyfikowanych dinukleotydowych analogów kapu (*publikacje nr 8, 9 i 10*).

W kolejnej publikacji (*nr 5*) opisano syntezę 4 dinukleotydowych analogi kapu, w tym 2 typu ARCA („*Anti-Reverse Cap Analogs*”), które posiadały grupę metylenową w różnych pozycjach mostka trifosforanowego. Pozwoliło to na selektywne uodpornienie takich analogów na poszczególne enzymy odpowiedzialne za degradację kapu w obrębie różnych ścieżek degradacji mRNA. Okazało się, że analogi modyfikowane w pozycji 3'-rybozy są odporne na enzym *DcpS* (ang. Decapping Scavenger). Analogi metylenobisfosfonianowe okazały się bardzo przydatne w badaniach szlaków degradacji mRNA i badaniach struktury enzymu odpowiedzialnego degradację mRNA.

Badania opisane w *publikacji nr 8* okazały się istotne dla potencjalnych zastosowań terapeutycznych analogów kapu. Okazało się, że analogi tiosforanowe, posiadają wszystkie cechy konieczne dla zastosowania mRNA w terapii genowej. Problemy stereochemiczne wynikające z podstawienia atomów tlenu atomami siarki zostały szczegółowo zbadane także pod względem konsekwencji biologicznych. Ze względu na duży potencjał aplikacyjny tych związków ich synteza, właściwości i zastosowania zostały zgłoszone do opatentowania. Należy w tym miejscu podkreślić, że Habilitant docenia znaczenie właściwej ochrony własności intelektualnej i podejmuje zachowania i działania niezbędne do jej skutecznego wprowadzenia. To ważna umiejętność i niezbędna kwalifikacja młodego uczonego.

Podobnie, w *publikacji nr 9* okazało się, że analogi kapu zawierające resztę tiofosforanową w pozycji β są w dużym stopniu odporne na działanie *in vitro* enzymu *hDcp2*, a zatem wydajność ich translacji była znacznie wyższa. Właściwości te spotkały się z bardzo dużym zainteresowaniem grup badawczych zajmujących się zastosowaniem mRNA do celów terapeutycznych. Podjęto współpracę z zespołem z Uniwersytetu Jana Gutenberga (RFN) z myślą o opracowaniu w przyszłości szczepionek przeciwnowotworowych opartych na mRNA.

Problem modyfikacji kapu selenem zamiast siarki podjęto w *publikacji nr 11*. To również bardzo interesujący aspekt badań, który stał się przedmiotem zgłoszenia patentowego. Modyfikowane selenem dinukleotydy, czy transkrypty, ze względu na obecność ciężkiego atomu selenu, mogą być użyteczne w badaniach strukturalnych.

Kolejną modyfikacją kapu zbadaną przez Habilitanta było zastąpienie atomu tlenu atomem azotu. W *publikacji nr 12* opisano udane próby wprowadzenia ugrupowania NH w wybrane pozycje mostka fosforanowego w strukturze dinukleozydo-5',5'-oligofosforanów. Analogi NH okazały się silnymi inhibitorami procesu biosyntezy białka zależnej od kapu. Okazało się, że mimo wbudowywania się do mRNA, efektywność translacji tak modyfikowanych transkryptów jest raczej niska.

Zwieńczeniem prac stanowiących bardzo dobrą rozprawę habilitacyjną dr JEMIELITEGO jest publikacja o charakterze przeglądowym (*nr 13*). To podsumowanie prac nad syntezą analogów kapu modyfikowanych w mostku oligofosforanowym zawiera również plan przyszłych badań procesu translacji eukariotycznych mRNA.

Reasumując, analiza cytowań w bazie danych: *Web of Knowledge* z Institute of Scientific Information (ISI, Philadelphia). Suma cytowań dla 51 publikacji w bazie: 427, dla 46 publikacji po doktoracie 417. Średnia cytowań publikacji po doktoracie 417/46 wynosi 9,07; indeks Hirscha 13. Jest to bardzo dobry rezultat, zważywszy również młody wiek i krótki staż pracy Habilitanta. Jest to dodatkowy wskaźnik potwierdzający dojrzałość zawodową dr. JEMIELITEGO. Jednocześnie, jest to znacznie lepsza miara sukcesu i kwalifikacji zawodowych Habilitanta niż IF czasopism czy też suma IF czasopism, w których zostały opublikowane wyniki badań kandydatki.

W świetle przedstawionej analizy dorobku naukowego i zawodowego oraz oceny rozprawy habilitacyjnej dr Jacek JEMIELITY jest dojrzałym badaczem legitymującym się znaczącym dorobkiem naukowym i uznanym specjalistą w zakresie syntezy chemicznej analogów kap i procesu translacji eukariotycznych mRNA.

Podsumowując, omówione wyżej prace dr Jacka JEMIELITEGO Magdaleny wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej wniosły oryginalny i ważki wkład w rozwój metod chemicznej syntezy analogów 5'-końca mRNA oraz inicjacji procesu translacji. Mają one także duże znaczenie aplikacyjne. Pod względem merytorycznym spełniają wymogi stawiane rozprawom habilitacyjnym.

III. Ocena formy prac

Praca przedstawiona została w postaci zestawu dokumentów w formie elektronicznej (PDF) umieszczonych na płycie CD: 21 oryginalnych publikacji doświadczalnych (12+5 dodatkowych), pracy przeglądowej (1), oraz patentów (3). Jeden załączony plik patentu jest nieprawidłowy - plik *Kowalska_PCT_2009.pdf* odpowiada patentowi WO2009/094199A1, zamiast dostępnemu w publicznej bazie <http://pl.espacenet.com> patentowi WO2009/149253A3 lub wersji amerykańskiej US2011092574A1. Ponadto na płycie CD

znajdują się dokumenty PDF: wniosek, dane kontaktowe, autoreferat w języku polskim i angielskim, skan odpisu dyplomu doktorskiego, oświadczenie Habilitanta o udziale w pracach stanowiących podstawę habilitacji, skany oświadczeń współautorów oraz wyciąg z bazy *Web of Knowledge* cytowań Habilitanta na dzień 13.03.2012.

Przedstawiona dokumentacja jest, poza wymienionym patentem, prawidłowa i w pełni wystarczająca do przeprowadzenia oceny przedłożonej rozprawy habilitacyjnej.

IV. Wniosek końcowy

Na podstawie dokonanej oceny dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej, mam zaszczyt przedstawić Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego mój wniosek o dopuszczenie dr. Jacka JEMIELITEGO do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego zgodnie z trybem przewidzianym w art. 18a ustawy z dnia 18 marca 2011 r. (Dziennik Ustaw Nr 84, poz. 455) o zmianie ustawy „*Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz o zmianie niektórych innych ustaw*”.



Prof. dr hab. Wojciech T. Markiewicz
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polska Akademia Nauk
Noskowskiego 12, 61704 Poznań
tel.: 61 8528503 wew. 180, faks: 61 8520532
e-mail: markwt@ibch.poznan.pl