



Prof. dr hab. Marianna Kańska  
Uniwersytet Warszawski  
Wydział Chemii  
Pracownia Chemii Biomolekuł  
Ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
Tel. 22-822 0211 w. 509  
e.mail. [mkanska@chem.uw.edu.pl](mailto:mkanska@chem.uw.edu.pl)

Warszawa, 15 grudnia 2012 r.

## **Recenzja**

**dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej**

**dr Marzeny Jankowskiej-Anyszki**

**pt.**

**SYNTEZA ANALOGÓW KOŃCA 5' mRNA KLUCZOWYCH W BADANIACH NAD  
MECHANIZMAMI PROCESÓW EKSPRESJI GENÓW U EUKARIOTÓW".**

Dr Marzena Jankowska-Anyszka, zatrudniona od 1988 r. na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w charakterze samodzielnego pracownika inżyniersko-technicznego, w 2000 r. obroniła pracę doktorską. Dysertacja pt. „Synteza, badania fizykochemiczne i biologiczne analogów 5'-końca mRNA i U saRNA” była wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Andrzeja Temeriusza. Od 2000 r. jest zatrudniona na Wydziale Chemii UW na etacie adiunkta.

### **Dorobek naukowy**

Ogólny dorobek naukowy Habilitantki składa się z 44 publikacji o sumarycznym Impact Factor (IF) wynoszącym 181, w tym po uzyskaniu stopnia

doktora opublikowała 27 prac, których sumaryczny IF = 102. Liczba cytowań tych prac aktualnie wynosi 951, a Indeks Hirscha - 16. Pracę były publikowane w renomowanych, anglojęzycznych czasopismach naukowych z bazy Journal Citation Report (JCR) takich jak: *RNA*, *Cell*, *Journal of Molecular Chemistry*, *Journal of Biological Chemistry*, *FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Journal*, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, *Nucleic Acids Research*, *Organic and Biomolecular Chemistry*, *Biochemistry*, *Biochimica and Biophysica Acta* oraz kilku innych. Habilitantka jest także współautorem 3 rozdziałów monograficznych serii *Chemistry of Nucleic Acid Components* oraz rozdziałów w wydawnictwach krajowych. Jest również współautorem 61 komunikatów lub posterów prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych.

### **Recenzja habilitacji**

Dr Marzena Jankowska-Anyszka przedstawiła do rozprawy habilitacyjnej zwięzłe podsumowanie cyklu składającego się z 8 monotematycznych publikacji zatytułowane jako „SYNTEZA ANALOGÓW KOŃCA 5' mRNA KLUCZOWYCH W BADANIACH NAD MECHANIZMAMI PROCESÓW EKSPRESJI GENÓW U EUKARIOTÓW”. Jest ono poświęcone chemii i biochemii końcowych fragmentów mRNA zwanych 'kapami'. Porównując temat tej rozprawy z tytułem Jej pracy doktorskiej (Synteza, badania fizykochemiczne i biologiczne analogów 5'-końca mRNA i U saRNA”) wyraźnie widać, że habilitantka kontynuuje i rozwija tematykę badawczą rozpoczętą na progu jej kariery naukowej. Jednak badania związane z habilitacją dotyczą innych zagadnień niż te, które przedstawiono w rozprawie doktorskiej. Publikacje będące przedmiotem habilitacji dotyczą opracowania metod syntezy różnych pochodnych kapu, metod ich wydzielenia oraz charakterystyki kompleksów białko-kap metodami fizykochemicznymi (analiza rentgenowska, spektroskopia NMR), biofizycznymi (fluorescencja białka, miareczkowanie izometryczne) i biologicznymi( *in vitro* oraz *in vivo*).

Za jedno z najważniejszych swych osiągnięć dr Marzena Jankowska-Anyszka uważa opracowanie i wykonanie syntezy dinukleotydowych analogów kapu, zawierających przyłączone znaczniki lub linkery, co czyni je użytecznymi do badania ich oddziaływań z końcem 5' mRNA (publ. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **9**, 5564, 2011). Analogi kapu (zarówno MMG jak i TMG) otrzymała przez przyłączenie

kwasu lewulinowego do jednej reszty rybozy (obecnej w dinukleotydzie). Następnie, do tak sfunkcjonalizowanego dinukleotydowego kapu, poprzez drugą wolną grupę karboksylową kwasu lewulinowego, został przyłączony znacznik lub ligand, którymi były: etylenodiamina (użyteczna do dalszych reakcji chemicznych lub do zakotwiczenia kapu na powierzchniach złoża), pochodna biotyny (jej kompleksy z awidyną i streptawidyną są stosowane w chromatografii) oraz stabilny rodnik (4-amino TEMPO) wykorzystywany w technice paramagnetycznego rezonansu elektronowego (ERS).

Jeden z analogów kapu z przyłączonym kwasem lewulinowym i etylenodiaminą (jako znacznikiem) został użyty do badania mechanizmu jego rozpoznawania przez białko zwane jądrowym kompleksem wiążącym cap (CBC – *cap binding complex*) oraz jego mutanty. Otrzymane wyniki posłużyły do zaproponowania hipotetycznego modelu połączenia mRNA zakończonego 5' kapem z białkiem CBC (*J. Molecular Biology*, **385**, 618, 2009).

Dr Marzena Jankowska-Anyżka zsyntezowała też cztery inne analogi kapu, sfunkcjonalizowane w reszcie rybozy kwasem lewulinowym, a następnie sprzężone z użyciem 1,6-diaminoheksanu z polisacharydem Sefarozą. Uzyskane w ten sposób złoża były użyte w technice chromatografii powinowactwa do rozdzielenia i izolacji isoformy białka IFE-5 (*initiation factor eucaryotic*) pochodzącego z glisty *Caenorhabditis elegans*, który jest modelowym organizmem w badaniach biologicznych (*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 6131, 2011). W celu uzyskania większej trwałości złoża chromatograficznego do trójfosforanowego mostka dinukleotydu dodatkowo wstawiono grupę metylenową, aby uodpornić analog kapu na działanie enzymów hydrolitycznych obecnych w ekstraktach komórkowych. Są to pierwsze, opisane w literaturze, złoża zawierające w swojej strukturze dinukleotydy z łącznikiem metylenowym w mostku trifosforanowym.

Powyższe sukcesy nad uzyskaniem złożeń chromatograficznych przydatnych do identyfikacji małych białek tj. CBS i IFE-5 skłoniły dr Marzenę Jankowską-Anyżkę do poszukiwania sposobu przydatnego do analizy komponentów mRNA znajdujących się w organizmach nicieni *Caenorhabditis elegans* oraz *Ascaris suum*, a mianowicie poprzez zmodyfikowanie trimetyloguanozyny kapu (TMG) w odcinek liderowy, SL, (*splicing leader*), który zwiększa wydajność translacji mRNA. Przyłączenie do takiego kapu biotyny umożliwi zakotwiczenie tego komponentu na powierzchniach

funkcjonalizowanej streptawidyną. Habilitantka opracowała procedury przyłączenia do kapu poprzez mostek fosforanowy 22 nukleotydowego SL (pochodzącego ze szczepów dzikich, jak i mutantów) do reszty rybozy w dinukleotydzie, jak również biotyny służącej do wiązania go z złożem. Opracowała również metody wydzielenia i oczyszczania otrzymywanych produktów. Wyniki tych badań zostały opublikowane *Tetrahedron Lett.*, **53**, 4843, 2012, gdzie po raz pierwszy podano dane o 12 analogach kapu MMG i TMG zawierającego tak długi SL (22 nukleotydy). Związki te aktualnie są sprawdzane jako potencjalne narzędzia w badaniach mechanizmu translacji mRNA w organizmach nicieni i nad białkami uczestniczącymi w tym procesie.

Jeden z powyższych związków tj. TMG-SL wraz z innymi analogami kapu znalazł zastosowanie do badań oddziaływań z białkiem eIF4E-3 pochodzącym z *Ascaris suum*. Praca ukazała się w *Nucleic Acids Res.* Widma NMR kompleksów wskazują, że oligonukleotydowy odcinek SL oddziałuje z białkiem eIF4E-3, co może wywoływać zmiany konformacji białka niezbędne podczas translacji. Praca ta podaje również wyniki badań oddziaływania tego białka z analogami kapu zsyntezowanych przez dr Marzenę Jankowską-Anyszkę, które otrzymano za pomocą wygaszania fluorescencji i miareczkowania kalorymetrycznego. Wykorzystując wcześniej zsyntezowane złoża analogów kapu na Sefarozie porównano także powinowactwa białek eIF4E-3 pochodzenia ludzkiego i z *Ascaris suum* oraz podano strukturę krystalograficzną kompleksu białka eIF4E z analogiem TMG kapu.

W celu zbadania wpływu dużego podstawnika przy pierwszej guanozynie w kapie Habilitantka zsyntezowała analog z dużym podstawnikiem benzylowym przy N<sup>2</sup> (bzI<sup>2</sup>m<sup>7</sup>GMP) wg procedury opisanej w *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **20**, 4781, 2012. Użyto go do badania powinowactwa białek eIF4E-3 z *Ascaris suum* i pochodzenia ludzkiego oraz inhibicji translacji w warunkach *in vitro*. Badania powinowactwa wykazały, że zawada przestrzenna przy N<sup>2</sup> nie stanowi przeszkody w wiązaniu kapu z białkiem. Także ten analog kapu był skuteczniejszym inhibitorem translacji niż m<sup>7</sup>GTP.

Sukcesem dr Marzeny Jankowskiej-Anyszki zakończyły się także syntezy analogów kapu znakowane stabilnym (<sup>13</sup>C) i radioaktywnym (<sup>14</sup>C) izotopem węgla, które są niezwykle użyteczne w badaniach interakcji kapu z białkiem eIF4E metodami NMR (<sup>13</sup>C) i radiometrycznymi (<sup>14</sup>C) oraz do monitorowania enzymatycznej

degradacji kapu (*Bioorganic & Medicinal Chemistry Lett.*, 22, 4391, 2012). Znacznik  $^{13}\text{C}$  został wprowadzony w postaci trzech grup metylowych połączonych z guanozyną ( $\text{m}_3^{2,2,7}\text{GpppG}$ ), w przypadku  $^{14}\text{C}$  radioaktywny atom węgla znajdował się pozycji  $\text{N}^7$  ( $\text{m}^7\text{GpppG}$ ).

Do badania enzymów katalizujących syntezę kapu guanino-N2-metylotransferaz (Tgs) dr Marzena Jankowska-Anyszka zaprojektowała i wykonała syntezę serii analogów kapu (pochodne mono-, di-, tri- oraz tetra fosforanowe, jak również dinukleotydy z mostkami tri- oraz tetra fosforanowymi) Analogi te miały jedną (w pozycji 7 lub  $\text{N}^2$ ), dwie (pozycje  $\text{N}^2$ ,  $\text{N}^7$ ) lub trzy ( $\text{N}^2$ ,  $\text{N}^2$ ,  $\text{N}^7$ ) grupy metylowe (*RNA*, 16, 211, 2010). Badania wykazały, że kluczowym czynnikiem decydującym o aktywności enzymów metylotransferaz (Tgs) jest obecność podstawnika w pozycji  $\text{N}^7$ .

Przedstawione publikacje, na których opiera się prezentowana rozprawa, są dziełem wielu autorów. Należy jednak podkreślić, że w 5 z nich, w których Habilitantka figuruje jako autor korespondencyjny, wymienionych jest tylko od 2 do trzech autorów. Także w tych ostatnich pracach udział dr Marzeny Jankowskiej-Anyszki jest przeważający (od 70 -do 90%), a dwaj autorzy wykonywali badania pod Jej bezpośrednim kierownictwem naukowym. Ten cykl monotematycznych publikacji, wchodzący w skład rozprawy habilitacyjnej, ma sumaryczny IF równy 33,3.

Do pracy są załączone oświadczenie współautorów, określający ich wkład w poszczególną pracę. W tym miejscu należy wziąć pod uwagę szerzący się zwyczaj publikacji osiągnięć naukowych będących dziełem wielu autorów. Jest to powszechne w dziedzinach interdyscyplinarnych, gdzie w realizację projektów jest zaangażowanych wiele zespołów badawczych. Odnosi się to także do dziedzin związanych z chemią organiczną. Sukces w syntezie nawet bardzo skomplikowanego związku chemicznego, o potencjalnym znaczeniu biologicznym, a nie popartego dalszymi badaniami zastosowanymi, należy do kategorii „sztuka dla sztuki”.

### **Działalność dydaktyczna i zawodowa**

Dr Marzena Jankowska-Anyszka jest wszechstronnie zaangażowana nie tylko w proces dydaktyczny realizowany na Wydziale Chemii UW, a także działalność popularyzacji i szerzenia nauk chemicznych wśród szczególnie uzdolnionej

młodzieży szkół średnich. Prowadzi wykład kursowy Biochemia dla studentów Wydziału Chemii UW; jest także kierownikiem, zorganizowanej przez siebie, studenckiej Pracowni Biochemii. Uczestniczy zajęciach seminaryjnych i w pracowniach chemii organicznej dla studentów Wydziałów Chemii i Biologii UW oraz w pracowni specjalizacyjnej. Była promotorem 5 prac magisterskich i promotorem 3 prac licencjackich. Była przez 5 lat opiekunem rocznika studentów oraz opiekunem studentów MSMP (Międzywydziałowe Studia Matematyczno-Przyrodnicze). Bierze czynny udział w warsztatach naukowych dla stypendystów Krajowego Funduszu na Rzecz Dzieci, gdzie dodatkowo recenzuje projekty naukowe uczestników. Uczestniczy w przygotowaniach laureatów Olimpiady Chemicznej do zawodów w Międzynarodowej Olimpiadzie Chemicznej. Za swą działalność dydaktyczną dr Marzena Jankowska-Anyszka została trzykrotnie wyróżniona nagrodami dydaktycznymi przyznawanymi przez władze Uczelni. Przez ostatnie dwie kadencje Habilitantka była członkiem Rady Naukowej Wydziału Chemii UW, oraz członkiem Komisji ds. Pracowników Niebędących Nauczycielami Akademickimi.

W trakcie swojej pracy zawodowej Habilitantka była wykonawcą w 9 krajowych grantach badawczych finansowanych przez MNiSzW oraz KBN. Jako wykonawca uczestniczyła również w 4 międzynarodowych projektach naukowych finansowanych przez EuroNanoMed, NIH FIRCA i II Polsko-Amerykański fundusz im. Marii Skłodowskiej-Curie. Dziedzina nauki, uprawianej przez Habilitantkę, wpisywała się w tematykę badawczą wszystkich grantów

Z uwagi na interdyscyplinarny charakter swych badań Dr Marzena Jankowska-Anyszka ściśle współpracowała z ośrodkami krajowymi i zagranicznymi. Prowadzi wspólne badania nad syntezą składników kwasów nukleinowych z zespołem badawczym kierowanym przez Prof. dr hab. Edwarda Darżynkiewicza z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Ostatnio rozwija także współpracę z zespołem Prof. dr hab. Ewy Bulskiej z Wydziału Chemii UW. Szczególnie podkreśla ona rolę wyników, które osiągnęła dzięki współpracy z grupą badawczą kierowaną przez Prof. R.E. Davis'a z University of Colorado School of Medicine. Habilitantka sześciokrotnie odbywała kilkumiesięczne staże naukowe w laboratoriach uniwersyteckich w USA (Luisiana State University, National Biosciences Inc. Mineapolis) i w Europie (Europejskie Centrum Biologii Molekularnej, EMBL -The European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg), co pozwalało udoskonalać i rozwijać swój warsztat

naukowy. Dr Marzena Jankowska-Anyszka jest członkiem *International Society of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*.

### **Wnioski końcowe**

Ogólny dorobek literaturowy i osiągnięcia naukowe dr Marzeny Jankowskiej-Anyszki oceniam bardzo wysoko i są istotnym wkładem w dziedzinę nauki związanej z biochemią kwasów nukleinowych. Badanie oddziaływań białek uczestniczących w translacji mRNA u nicieni (*Caenorhabditis Elegans* i *Ascaris suum*) potencjalnie mogą być wykorzystane do projektowania nowych leków przeciwko gliście ludzkiej, którym to pasożytem, bytującym w jelicie cienkim, jest zainfekowanych około 1 miliardów ludzi w większości dzieci.

Reasumując stwierdzam, że na podstawie otrzymanej dokumentacji dorobek naukowy i dydaktyczny dr Marzeny Jankowskiej-Anyszki spełnia wymagania (art. 16 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 r. wraz z późniejszymi zmianami) stawiane kandydatom do uzyskania stopnia dr habilitowanego. Przetło wnioskuje do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie dr Marzeny Jankowskiej-Anyszki do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

