

Poznań, 2 stycznia 2013

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

**Ocena 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*”**

I. Ocena dorobku naukowego

Dr Marzena JANKOWSKA-ANYSZKA studiowała chemię na Uniwersytecie Warszawskim. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w 2000 roku na podstawie rozprawy doktorskiej p.t. „*Synteza, badania fizykochemiczne i biologiczne analogów 5'-końca mRNA i U snRNA*”, a jej promotorem był prof. dr hab. Andrzej TEMERIUŚ.

Całkowity dorobek naukowy Habilitantki, od uzyskania stopnia magistra do chwili obecnej, składa się z 44 publikacji z listy filadelfijskiej, w tym po doktoracie 27. Jej prace były cytowane dotychczas 951 razy, a indeks Hirscha wynosi 16. O jakości czasopism, w których publikuje dr JANKOWSKA-ANYSZKA świadczy sumaryczny Impact Factor wynoszący 181 (2012). Wszystkie prace opublikowane zostały w anglojęzycznych, międzynarodowych czasopismach naukowych: *J. Molec. Biol.*, *RNA*, *Org. Biomol. Chem.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *Nucleic Acids Research*, *Tetrahedron Lett.*, *Bioorg. Med. Chem.*, *FEBS Journal*, *Molecular and Cellular Biology*, *J. Biol. Chem.*, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acid*, *Molecular & Biochemical Parasitology*, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, *Journal of Physics: Condensed Matter*, *Acta Biochimica Polonica*, *EMBO Journal*, *Biochemistry*, *Z. Naturforsch.*, *Antiviral Research*, *BBA*, *J. Photochem. Photobiol.*, *Cell*.

Zaraz po obronie pracy doktorskiej została zatrudniona na stanowisku adiunkta. Zespół w którym od początku swej kariery zawodowej pracowała dr JANKOWSKA-ANYSZKA od wielu lat zajmuje się badaniami syntezy chemicznej, struktury i funkcji biologicznej analogów końca 5' mRNA.

Dr JANKOWSKA-ANYSZKA 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 E. RHOADSEM z Louisiana State University, USA. W jego laboratorium odbyła trzy staże badawcze – w sumie 10 miesięcy. Odbyła też 3 miesięczny staż badawczy w laboratorium dr Wojciecha RYCHLIKA w National Biosciences Inc., w Minneapolis, USA. Inny krótki staż odbyła w laboratorium dr Iaina MATTAJA w Europejskim Centrum Biologii Molekularnej (EMBL) w Heidelbergu, RFN. To właśnie podczas tych staży dała się poznać jak dojrzały chemik syntetyk projektujący i umiejący otrzymać zaprojektowane przez siebie analogi końca 5' mRNA

zawierające różnorodnie podstawione reszty guanylowe. Jej współdziałanie z biochemikami na etapie projektowania było niezwykle istotne. Poświadczają to listy współautorów publikacji opisujące ich i Habilitantki udziały w poszczególnych publikacjach. W takich sytuacjach chemik organik, rozumiejący reaktywność i właściwości chemiczne badanej przez siebie klasy związków może zaprojektować całe spektrum związków, które posłużą następnie do rozwiązania problemu biologicznego – w tym przypadku m.in. określeniu molekularnych mechanizmów rozpoznawania końca mRNA na etapie inicjacji biosyntezy białka i dojrzewania kapu (metylowanie enzymatyczne) u różnych organizmów eukariotycznych. W trakcie staży Habilitantka zapoznała się także w praktyce z zaawansowanymi metodami badania oddziaływań syntetyzowanych przez siebie analogów końca 5'-mRNA z białkami wchodzącymi w skład kompleksów inicjatorowych.

Dr Marzena JANKOWSKA-ANYSZKA brała aktywny udział w licznych konferencjach międzynarodowych, krajowych i zagranicznych, przedstawiając referat i bardzo liczne komunikaty – 61 doniesień naukowych.

Do rozprawy habilitacyjnej dr Marzena JANKOWSKA-ANYSZKA wybrała 8 z 44 publikacji. Jest to cykl prac poświęconych syntezie analogów końca 5' mRNA i ich wykorzystaniu w badaniach mechanizmów procesów ekspresji genów u eukariontów. W 5 z tych publikacji jest autorem korespondującym. Prace te zostały opublikowane w anglojęzycznych, międzynarodowych czasopismach naukowych: *J. Molec. Biol.*, *RNA*, *Org. Biomol. Chem.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2), *Nucleic Acids Research*, *Tetrahedron Lett.*, *Bioorg. Med. Chem.* O randze czasopism świadczy sumaryczny IF wynoszący 33.

Udział Habilitantki w przygotowaniu współautorskich publikacji był znaczący i został precyzyjnie określony w przedstawionej dokumentacji oraz potwierdzony oświadczeniami współautorów. Współautorzy precyzyjnie określili swoje zaangażowanie w przygotowanie wspólnych publikacji.

Dr Marzena JANKOWSKA-ANYSZKA uzyskała w czasie swojej pracy zawodowej dwukrotnie Nagrodę Dydaktyczną Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (lata 2005 i 2011), uwzględniające jej zaangażowanie m.in. w opracowanie nowych ćwiczeń na zajęciach laboratoryjnych z biochemii. Uzyskała także Nagrodę Dziekana Wydziału Chemii z okazji Dnia Edukacji Narodowej (1996).

Dr Marzena JANKOWSKA-ANYSZKA była wykonawcą w kilkunastu projektach badawczych finansowanych zarówno z funduszy krajowych jak i zagranicznych (KBN, MNiSW, Polsko-Amerykański Fundusz im. Marii Skłodowskiej-Curie). Nie była kierownikiem żadnego projektu i wynika to najprawdopodobniej z faktu bardzo dobrego finansowania zespołu od lat zdobywającego bardzo skutecznie środki finansowe na badania analogów kapu.

Habilitantka prowadzi zajęcia dydaktyczne dla studentów Uniwersytetu Warszawskiego. Zorganizowała laboratoryjne zajęcia kursowe z biochemii dla studentów Wydziału Chemii w ramach przedmiotu „*Laboratorium Biochemia*”. Przygotowanie obejmowało opracowanie programu zajęć, opracowanie wszystkich ćwiczeń, zorganizowanie warsztatu i wyposażenia laboratorium. Miało więc charakter kompleksowy. To dobry test organizacyjny.

Ponadto opracowała program kursowego wykładu z biochemii i wyklada ten przedmiot dla studentów Wydziału Chemii. Jest zaangażowana w prowadzenie zajęć dydaktycznych - laboratorium i proseminarium - z chemii organicznej dla studentów Wydziału Chemii i Wydziału Biologii UW. Ponadto prowadzi ćwiczenia indywidualne z syntezy organicznej.

Prowadzi także zajęcia w ramach Krajowego Funduszu na Rzecz Dzieci. Brała udział w przygotowaniu olimpijczyków do udziału w Międzynarodowej Olimpiadzie Chemicznej (w 2000 r.). Była opiekunem naukowym licznych dyplomantów: licencjaty (3), prace magisterskie (6), opieka nad studentami realizującymi Indywidualny Tok Studiów (2), funkcja opiekuna roku studentów (5 lat, Wydział Chemii). Angażuje się też w pracę ze studentami Międzywydziałowych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych na Uniwersytecie Warszawskim (4 podopiecznych).

A zatem również na polu dydaktyczno-organizacyjnym Habilitantka legitymuje się wyraźnym dorobkiem. To kolejne potwierdzenie jej przygotowania do prowadzenia samodzielnej działalności.

II. Ocena pracy habilitacyjnej

II.1. Ocena zgodności z wymogami formalnymi

Jako podstawa rozprawy habilitacyjnej przedstawionych zostało 8 prac opublikowanych w okresie 2009 - 2012 w następujących czasopismach: *J. Molec. Biol., RNA, Org. Biomol. Chem., Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2), *Nucleic Acids Research, Tetrahedron Lett., Bioorg. Med. Chem.* Wszystkie przedstawione prace to oryginalne wieloautorskie prace doświadczalne, a w 5 z nich dr JANKOWSKA-ANYSZKA jest autorem korespondującym.

Oświadczenia współautorów nie pozostawiają wątpliwości co do zasadniczego wkładu pani dr JANKOWSKIEJ-ANYSZKI w oceniane publikacje, takiego jakiego oczekujemy od samodzielnego pracownika naukowego. Oświadczenia nie tylko nie są lakoniczne, ale szczegółowo relacjonują zaangażowanie poszczególnych współautorów w realizację wszystkich aspektów publikacji. Taki opis jest dodatkowym źródłem informacji dla oceniającego dorobek Habilitantki, pozytywnie świadczący o jej samodzielności naukowej.

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

II.2. Zakres i wartość merytoryczna rozprawy

Tematyka badań analogów 5'-końca mRNA prowadzonych na Uniwersytecie Warszawskim w zespołach prof. prof. TEMERUSZA i DARŻYNKIEWICZA 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. Habilitantka skupiła swą uwagę na analogach kapu modyfikowanych w obrębie nukleozad (reszt guaninowych) i reszt nukleozydowych. Modyfikowała jednak również łańcuch polifosforanowy.

Transkrypty genów organizmów eukariotycznych (mRNA) będące produktami polimerazy RNA typu II na swoim 5' końcu zawierają strukturę nazywaną kapem. Tworzy ją 7-metyloguanozyna połączona nietypowym dla kwasów nukleinowych wiązaniem 5',5'-trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem ($m^7GpppN\dots$). W przypadku nicienia *Caenorhabditis elegans* i glisty świńskiej *Ascaris suum* znaczna część ich mRNA zawiera hipermetylowany kap - TMG kap - z resztą trimetyloguanozylową ($m_3^{2,2,7}GpppN\dots$).

Odkrycie N^2 -guaninometylotransferaz odpowiedzialnych za metylowanie egzocyklicznej grupy aminowej podczas syntezy TMG kapu oraz enzymów odpowiedzialnych za degradację kapu (DcpS) było silnym impulsem dla badań w tym obszarze. Badania te mają również

znaczenie praktyczne, gdyż białka oddziałujące z mRNA mogą stanowić nowe cele terapeutyczne ze względu na zróżnicowanie struktury kapu u różnych eukariontów.

W syntezie analogów kapu zasadniczym etapem syntezy jest utworzenie wiązania pirofosforanowego pomiędzy dwiema podjednostkami nukleotydowymi. Większość stosowanych podejść syntetycznych opiera się na wprowadzeniu (aktywacja) do jednej podjednostki nukleotydowej dobrej grupy opuszczającej oraz użyciu drugiej podjednostki jako czynnika nukleofilowego. Dr JANKOWSKA-ANYSZKA zastosowała syntezę poprzez reakcję fosforoimidazolidów z nukleofilami nukleotydowymi w obecności bezwodnego chlorku cynku w warunkach opracowanych przez Mitsuo SEKINE i skutecznie wykorzystywaną przez macierzysty zespół badaczy z Uniwersytetu Warszawskiego. Opanowanie do perfekcji metod syntezy i pracy z tą klasą związków było warunkiem koniecznym dla uzyskania sukcesu. Związki te są bardzo wrażliwe chemicznie i wymagają dużych umiejętności dla ich oczyszczenia i scharakteryzowania. Udało się to Habilitantce i jej podopiecznym. Zasadniczym chemicznym obiektem zainteresowań habilitantki było otrzymywanie analogów kapu w różnym stopniu metylowanych w obrębie reszt guanylowych kapu czy też niosących inne niż metylowe grupy alkilowe. Ponadto bardzo ciekawy jest projekt otrzymania acetalowych pochodnych lewulinowych analogów kapu, które pozwoliły otrzymać m.in. podłoża stałe zawierające immobilizowane analogi kapu. Badania te z pewnością znajdują kolejne zastosowania.

Do najważniejszych osiągnięć opisanych w przedstawionym cyklu publikacji zaliczam zaprojektowanie szeregu nowych związków nukleotydowych i opracowanie metod ich syntezy. Tymi związkami są z pewnością dinukleotydowe analogi kapu zawierające w obrębie reszty rybozylovej drugiej jednostki nukleozydowej acetalową funkcję lewulinianową umożliwiającą przyłączenie różnych znaczników, sond czy linkerów w miejscu mało zaangażowanym w oddziaływanie z białkiem. Zaproponowany został uniwersalny sposób funkcjonalizacji, który może być wykorzystany do otrzymywania wielu innych analogów kapu, tak mono-, di- jak i oligonukleotydowych [H3]. Otrzymano złoża do chromatografii powinowactwa oparte o analogi di nukleotydowe, mono- i trimetyloguanozynowe kapu, w tym również takie, o zwiększonej odporności na hydrolizę enzymami degradującymi kap [H4], oligonukleotydy o długości 22 jednostek nukleotydowych z dołączonym na końcu 5' mono- lub trimetyloguanozynowym kapem [H6], dinukleotydowe analogi z mono- i trimetyloguanozynowym kapem znakowane izotopami ^{13}C i ^{14}C [H7], mononukleotydowe analogi trimetyloguanozynowego kapu posiadające w pozycji N^2 jeden lub dwa podstawniki o różnym charakterze [H8].

Ważnym osiągnięciem jest poznanie jądrowego kompleksu CBC (ang. *Cap Binding Complex*) [H1], kinetyki jego wiązania z kapem i zaproponowanie modelu wiązania mRNA zakończonego MMG kapem. Dało się określić istotną rolę odcinka liderowego SL w oddziaływaniach z inicjacyjnym czynnikiem translacyjnym eIF4E-3 z *Ascaris suum*, a także krystalograficzną strukturę kompleksu eIF4E-3 z kapem trimetyloguanozynowym (H5). Za istotne uważam również wykazanie zróżnicowanej specyficzności metylotransferaz z różnych organizmów [H2].

Znaczenie nie tylko poznawcze, ale i praktyczne ma ustalenie, że N^2 -monopodstawione pochodne m^7GMP są skutecznymi inhibitorami translacji w pasożytniczym nicieniu *A. suum* (H8). Rezultaty te przybliżają nas do poznania adaptacji białek eIF4E nicieni do współdziałania z cząsteczkami mRNA zakończonymi MMG lub TMG kapem podczas inicjacji translacji, poznania mechanizmu enzymatycznej syntezy TMG kapu, a także

wiązania kapu przez kompleks CBC. Ustalenia te mogą być wykorzystane w przyszłości dla opracowania np. leków przeciwpasożytniczych.

Dr Marzena JANKOWSKA-ANYSZKA jest, w świetle przedstawionej analizy dorobku naukowego i zawodowego oraz oceny rozprawy habilitacyjnej, dojrzałym badaczem legitymującym się znaczącym dorobkiem naukowym i uznanym specjalistą w zakresie syntezy chemicznej analogów kapu i badania procesu ekspresji genów organizmów eukariotycznych.

Podsumowując, omówione wyżej prace dr Marzeny JANKOWSKIEJ-ANYSZKI wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej wniosły oryginalny i ważki wkład w rozwój metod chemicznej syntezy analogów 5'-końca mRNA oraz w badania mechanizmów procesów ekspresji genów u eukariotów. Mają one także duże znaczenie aplikacyjne. Pod względem merytorycznym spełniają wymogi stawiane rozprawom habilitacyjnym.

III. Ocena formy prac

Przedstawiona dokumentacja została przygotowana poprawnie i jest wystarczająca do przeprowadzenia oceny 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 Marzeny JANKOWSKIEJ-ANYSZKI 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*