

Prof. dr hab. Maria Koziółkiewicz
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
90-924 Łódź
maria.koziolkiewicz@p.lodz.pl

Łódź, 10 marca 2021r.

**Ocena osiągnięcia naukowego i całokształtu dorobku
naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego
dr Agaty Igi Świątkowskiej w związku z postępowaniem
o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego
w dziedzinie: nauki ścisłe i przyrodnicze, w dyscyplinie nauki biologiczne**

Recenzję przedstawiam na wniosek **Dyrektora Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN** realizującego postanowienie **Rady Naukowej IChB PAN** z dnia 21 grudnia 2020r. (uchwała nr 82/2020/Internet). Recenzję przygotowałam w oparciu o zestaw dokumentów przesłany 15 stycznia b.r. Zbiór ten zawiera 1) autoreferat wraz z informacją o aktywności dydaktycznej, 2) wykaz osiągnięć naukowych, 3) publikacje wchodzące w skład monotematycznego osiągnięcia naukowego oraz 4) oświadczenia Habilitantki i współautorów opisujące wkład poszczególnych osób w badania oraz przygotowanie publikacji.

Dane osobowe

Dr Agata Iga Świątkowska jest absolwentką Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, gdzie w 2002 roku, po zrealizowaniu w IChB PAN pracy dyplomowej pt. „Analiza strukturalna regionów niekodujących wirusa zapalenia wątroby typu C”, ukończyła studia magisterskie na kierunku biologia (specjalizacja: biotechnologia). W roku 2008 na podstawie rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Zastosowanie rybozemu delta i rybonukleazy Dicer do ukierunkowanej degradacji cząsteczek RNA o silnie uporządkowanej strukturze przestrzennej”, zrealizowanej w IChB pod opieką prof. dr hab. Jerzego Ciesiołki (i wyróżnionej przez Radę Naukową IChB PAN) uzyskała stopień doktora nauk chemicznych w zakresie biochemii.

W latach 2008-2012 Kandydatka odbyła staż podoktorski w laboratorium prof. Davida Tollerveya na Uniwersytecie Edynburskim (Institute of Cell Biology, Wellcome Trust Centre for Cell Biology). Kolejny staż, tym razem 6-miesięczny, dr Świątkowska odbyła w 2015 roku w laboratorium

doktora Claudio Alonso na Uniwersytecie Sussex (Brighton, Wlk. Brytania). Od 2015 roku do chwili obecnej pracuje jako adiunkt w Zakładzie Biochemii RNA kierowanym przez profesora Jerzego Ciesiołkę.

Ocena monotematycznego osiągnięcia naukowego

Jako monotematyczne osiągnięcie naukowe dr Agata Iga Świątkowska przedstawiła cykl publikacji pod tytułem „Określenie roli regionu terminalnego 5' mRNA p53 w ekspresji genu *TP53*”. Cykl obejmuje siedem artykułów opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych z listy JCR, specjalizujących się w zagadnieniach z zakresu biochemii i biologii molekularnej (sumaryczna wartość współczynnika IF tych czasopism wynosi, zgodnie z rokiem opublikowania, 27,03). Artykuły te zostały opublikowane w latach 2013-2020 i są pracami wieloautorskimi (3-7 autorów). W czterech pracach dr Agata Świątkowska jest pierwszym autorem, natomiast w pozostałych trzech – drugim, z tym że w publikacji w *Sci. Reports* (2018) rolę pierwszego autora pełnią równorzędnie dwie osoby. Fakt ten potwierdzają opisy zawarte w odpowiednich oświadczeniach - dr Świątkowskiej i dr Zydowicz-Machtel. W takim układzie należy przyjąć, że dr Świątkowska jest pierwszym autorem w pięciu publikacjach. W trzech publikacjach pełniła ona rolę autora korespondencyjnego. Artykuły ukazały się w następujących czasopismach: *RNA Biology* (2 prace, IF=5,350), *International Journal of Molecular Sciences* (IF=4,556), *Scientific Reports* (IF=4,011), *PLos One* (2 prace, IF=3,534), *Acta Biochimica Polonica* (IF=1,169). Zgodnie z wymaganiami formalnymi dr Świątkowska i pozostali współautorzy publikacji wchodzących w skład cyklu przedłożyli oświadczenia o ich wkładzie w realizację poszczególnych prac.

Cykl publikacji wchodzących w skład monotematycznego osiągnięcia naukowego dotyczy struktury i funkcji 5'-końcowego odcinka mRNA kodującego białko p53 oraz mechanizmów odpowiedzialnych za ekspresję białka p53 pełnej długości oraz jego skróconej izoformy $\Delta 40p53$. Białko p53 znane jako „strażnik genomu” funkcjonuje jako czynnik transkrypcyjny aktywujący geny, których białkowe produkty (lub microRNA, np. miR34) są zaangażowane m.in. w zatrzymanie cyklu komórkowego, naprawę DNA, odpowiedź komórki na czynniki stresowe lub apoptozę. Zdolność białka p53 do koordynowania tych, często przeciwstawnych procesów (cell death – cell life), tłumaczy się m.in. jego oddziaływaniami z DNA lub białkami, a te interakcje są możliwe dzięki licznym modyfikacjom potranslacyjnym, którym może ulegać ok. 35 spośród 393 aminokwasów składających się na łańcuch polipeptydowy tej proteiny.

Inny mechanizm, odpowiedzialny za różnorodność strukturalną i funkcjonalną białka p53 to możliwość biosyntezy jego licznych izoform różniących się długością łańcucha polipeptydowego. Dotychczas zidentyfikowano 12 izoform białka p53 krótszych niż klasyczna cząsteczka licząca 393 aminokwasy. Ich synteza podlega regulacji zarówno na poziomie transkrypcji (np. selekcja

alternatywnych promotorów) jak i translacji (m.in. wybór alternatywnych kodonów AUG). Jednym z narzędzi pomocnych w badaniach mechanizmów odpowiedzialnych za biosyntezę określonych izoform białka p53 jest strategia antysensowych oligonukleotydów

W Zakładzie Biochemii RNA kierowanym przez prof. Jerzego Ciesiołkę już w 2010 roku zainicjowano badania nad strukturą i rolą 5'-końca mRNA białka p53 w procesie translacji. W tym czasie badania nad izoformami białka p53 były niemal w powijakach, nie mówiąc już o badaniach, które wyjaśniałyby udział tych izoform w regulacji procesów komórkowych. Dr Agata Świątkowska włączyła się w te prace ok. 2012 roku przygotowując projekt badawczy pt. *Expression of p53 protein and its N-truncated form ΔNp53 – towards better understanding the mechanism of p53 IRES-mediated translation process* finansowany przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej (Homing Plus). W kolejnych latach (2014-2017, 2016-2019) Habilitantka była wykonawcą dwóch projektów OPUS także poświęconych realizacji tej tematyki.

Wykorzystując strategię antysensowych oligonukleotydów, Kandydatka wykazała, że spinka U180-A218 i jednoniciowy fragment mRNA p53 oznaczony jako A219-U228 są elementami struktury II-rzędowej 5'-końcowego regionu tego mRNA istotnymi dla translacji z kodonu AUG1 i AUG2, szczególnie w warunkach stresu komórkowego, co wskazywało na ich funkcje regulatorowe (*PLos One*, 2013, *PLos One*, 2015). W pierwszym etapie badań, dla zminimalizowania aktywności RNazy H Habilitantka wykorzystywała oligonukleotydy metylowane w pozycji 2'-rybozy, ale wyselekcjonowane, najbardziej aktywne oligomery zostały także zsyntetyzowane jako gapmery LNA/PS z modyfikacją LNA na końcach 5' i 3' oraz wiązaniami tiofosforanowymi, co po podaniu oligomerów do komórek MCF-7 miało zwiększyć ich stabilność i zapewnić zdolność aktywowania RNazy H. W tych warunkach szczególnie aktywny okazał się jeden z badanych oligonukleotydów antysensowych – prawdopodobnie dzięki aktywacji RNazy H poziom mRNA p53 spadł w komórkach o ponad 50%, co pociągnęło za sobą również znaczące obniżenie poziomu białka. Dr Agata Świątkowska podkreśla możliwość ewentualnego wykorzystania najbardziej aktywnych oligonukleotydów antysensowych (takich jak oligomer 7b) w celu kontrolowanego modulowania ekspresji p53, co potencjalnie można byłoby wykorzystywać jako wsparcie w terapiach przeciwnowotworowych.

W dalszych etapach badań Habilitantka skupiła się na zbadaniu zależności pomiędzy strukturą wariantów regionu 5'-terminalnego mRNA p53, a efektywnością i szybkością procesu inicjacji translacji (*Sci. Rep.*, 2018). Kandydatka wykazała, iż wewnątrzkomórkowy poziom białka p53 zależy w znaczący sposób od efektywności procesu translacji, a nie tylko, jak powszechnie wiadomo, od szybkości degradacji ubikwitynowanej formy p53. Doktor Świątkowska udowodniła, że struktura II-rzędowa jest odpowiedzialna za czas i szybkość skanowania 5'-terminalnego regionu mRNA p53 przez rybosom. Wykazała także, iż efektywność i całkowity czas translacji jest zależny od sekwencji

nukleotydowej otaczającej kodon inicjatorowy AUG1. Badania dr Świątkowskiej pozwoliły także zidentyfikować podobieństwa i różnice pomiędzy ekspresją mysiego i ludzkiego genu *Trp53/TP53*.

Szczególnie interesujące są, w moim odczuciu, wyniki najnowszych badań prowadzonych przez Habilitantkę, mianowicie identyfikacja białek, które oddziałują z 5'-terminalnym regionem mRNA p53 i w ten sposób wpływają na ekspresję genu *TP53*. Identyfikacja białek regulujących proces transkrypcji i translacji p53 wymagała chromatografii powinowactwa na złożu z RNA wraz z zastosowaniem techniki spektrometrii mas. Źródłem „potencjalnych kandydatów” oddziałujących z mRNA (P0-Δ40p53 i P1-Δ40p53) były lizaty komórek MCF-7, HepG2 oraz HT-29. Wśród ok. 20 tzw. „potencjalnych kandydatów”, dr Świątkowska zidentyfikowała heterogenną rybonukleoproteinę K (hnRNP K), która wiąże się bezpośrednio do regionu 5'-terminalnego mRNA p53, regulując proces translacji w komórkach MCF-7, szczególnie w warunkach stresowych. Ponadto hnRNP K działa na poziomie transkrypcji, ponieważ może wiązać się z DNA, co stymuluje proces transkrypcji genu *TP53*. Poznanie roli hnRNPK w procesie regulacji ekspresji genu *TP53* może pomóc w dalszych badaniach dotyczących zależnej od białka p53 odpowiedzi komórek na stres. Spośród białek reprezentowanych przez najwyższą liczbę widm MS, Habilitantka jak dotychczas wyróżniła tylko białko hnRNP K, ale te wyniki nie zamykają drogi do identyfikacji innych białek obecnych w lizatach komórkowych i zaangażowanych w regulację ekspresji genu *TP53* na poziomie transkrypcji lub translacji.

Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe dr Agaty Świątkowskiej zostały dotychczas zacytowane 20-krotnie (baza Web of Science, Core collection, bez autocytowań). Ta niezbyt wysoka liczba cytowań wynika m.in. z faktu, iż 3 z 7 publikacji cyklu ukazały się w latach 2019-2020 i siłą rzeczy trudno w tej sytuacji o liczne cytowania. Pozostałe cztery publikacje uzyskały dotychczas 19 cytowań. Zapewne trzeba się uzbroić w cierpliwość oczekując na znaczący wzrost liczby cytowań, choćby dlatego, że rola izoform białka p53 w komórkowej odpowiedzi na stres jest zagadnieniem słabo poznanym, docenianym jak dotychczas przez wąskie grono badaczy.

W mojej opinii tematyka realizowana przez dr Agatę Świątkowską jest bardzo ważna, bo dotyczy mechanizmów odpowiedzialnych za syntezę izoform jednego z najważniejszych regulatorów funkcji życiowych komórek, jakim jest białko p53. Zapewne te izoformy są elementem bardzo ważnego i precyzyjnego mechanizmu regulującego oddziaływanie białka p53 (może lepiej: białek p53?) z partnerami. W bazie PubMed pod hasłem „p53 isoforms” można znaleźć blisko 2,5 tys. publikacji. Jednak z drugiej strony jest to tematyka trudna i trochę niszowa; liczba znanych obecnie wariantów czy izoform białka p53 jest olbrzymia (biorąc pod uwagę także produkty modyfikacji potranslacyjnych), a ich funkcje bardzo zróżnicowane i ciągle słabo poznane. W najbliższej przyszłości dr Agata Świątkowska zamierza wykorzystać chromatografię powinowactwa i analizę metodą spektrometrii mas do poszukiwania innych niż hnRNP K białek regulujących ekspresję genu *TP53* w

warunkach stresu komórkowego. Chciałaby także badać zależności pomiędzy różnymi izoformami białka p53, w tym izoformami $\Delta 40p53$ oraz $\Delta 133p53$.

Podsumowując: efektem badań prowadzonych przez dr Agatę Świątkowską jest monotematyczny cykl siedmiu publikacji, w których przedstawiono wyniki potwierdzające udział 5'-terminalnego regionu mRNA kodującego białko p53 w regulacji translacji izoformy $\Delta 40p53$ oraz klasycznej formy tego białka. Ponadto Habilitantka zaproponowała rozszerzony model oddziaływań pomiędzy białkami p53 i hnRNP K: p53 stymuluje transkrypcję genu *hnRNP K*, a z kolei białko hnRNP K działa jako czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję genu *TP53*. Niezależnie od tego mechanizmu działającego na poziomie transkrypcji ich genów, oba białka (p53 i hnRNP K) aktywują ekspresję wielu innych genów, których białkowe produkty modulują odpowiedź komórki na stres.

Ocena aktywności naukowej

Aktywność naukowa dr Agaty Świątkowskiej była i jest związana z biogenezą, strukturą i funkcją kwasów rybonukleinowych. Przed uzyskaniem stopnia doktora Habilitantka opublikowała 2 publikacje dotyczące RNA wirusa żółtaczkowego typu C oraz rybozomu delta, natomiast po uzyskaniu stopnia doktora wyniki badań innych niż te dotyczące 5'-końcowego regionu mRNA p53 ukazały się w 7 publikacjach o sumarycznej wartości współczynnika IF= 33,176. Trzy z nich zostały zrealizowane podczas stażu podoktorskiego w laboratorium prof. Davida Tollerveya i dotyczą struktury drożdżowego rRNA oraz jej rearanżacji w oddziaływaniach z białkami, co ma kluczowe znaczenie dla procesu dojrzewania rRNA i składania rybosomu. W macierzystym Instytucie Habilitantka brała także udział w badaniach dotyczących analizy struktury regionów niekodujących wirusowych RNA (RNA enterowirusów oraz RNA wirusa Coxsackievirus B3). Sumaryczna liczba cytowań dla tego zbioru publikacji wynosi wg bazy Web of Science 243.

Dr Agata Świątkowska zamierza wykorzystać w przyszłości wiedzę i doświadczenia zdobyte w trakcie badań nad rybosomalnym RNA. Niewątpliwie, na tym etapie rozwoju naukowego i zdobywania samodzielności bardzo przydatne będzie posiadane już doświadczenie w pozyskiwaniu środków na badania. W latach 2013-2014 Habilitantka była kierownikiem projektu Homing Plus (FNP), a także wykonawcą w dwóch projektach OPUS (NCN) (2014-2017 oraz 2016-2019), wykonawcą w projekcie Pomost-Powroty (2014-2015), a także wykonawcą w projekcie badawczym „Nuclear RNA processing and surveillance” (2011-2017, Wellcome Trust).

Plany badawcze Kandydatki dotyczą nie tylko różnorodności struktury mRNA kodującego izoformy białka p53, ale także roli białka p53 w rybosomopatiach. Nazwą tą określa się choroby związane z zaburzeniami dojrzewania rRNA i składania rybosomu. Zakłócenia w funkcjonowaniu rybosomów mogą prowadzić do nowotworów układu krwiotwórczego, np. białaczek. Najnowsze prace sugerują związek białka p53 z rybosomopatiami. Dr Świątkowska zamierza więc połączyć swoje

dotychczasowe zainteresowania naukowe i doświadczenia zdobyte podczas stażu u prof. Tollerveya i włączyć się w badania nad molekularnym podłożem rybosomopatii. Stosowny projekt złożyła do NCN na konkurs OPUS 19.

Ocena aktywności dydaktycznej

W racji zatrudnienia w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, dr Agata Świątkowska nie ma dorobku dydaktycznego, jakim zazwyczaj legitymują się pracownicy naukowo-dydaktyczni uczelni akademickich, ale lista jej formalnych i nieformalnych aktywności dydaktycznych jest dość długa: była promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim dr Pauliny Zydowicz-Machtel nt. „Rola elementów strukturalnych w regionie terminalnym 5' transkryptów mRNA genu *TP53* w procesie inicjacji translacji”. W 2014 roku sprawowała jako promotor opiekę nad studentką Uniwersytetu Przyrodniczego realizującą w IChB PAN swoją pracę magisterską.

W latach 2002-2005 współprowadziła laboratoria dla studentów IV roku Chemii UAM. Począwszy od 2007 roku sprawuje nieformalną opiekę nad magistrantami, doktorantami oraz praktykantami, którzy w Zakładzie Biochemii RNA IChB PAN realizują swoje prace dyplomowe lub odbywają praktyki. Była także opiekunem studentów i magistrantów Uniwersytetu Edynburskiego, którzy zdobywali doświadczenie w zakresie biochemii RNA w grupie prof. Davida Tollerveya.

Wniosek końcowy

W mojej opinii monotematyczne osiągnięcia naukowe oraz inne dokonania dr Agaty Świątkowskiej świadczą o Jej znaczącym i oryginalnym wkładzie w rozwój badań naukowych w zakresie biochemii RNA. Dorobek publikacyjny Habilitantki (poza pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego) spełnia kryteria dotyczące aktywności naukowej określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) oraz Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Pozytywnie oceniam także dorobek dydaktyczny i organizacyjny Kandydatki.

Uważam, że dorobek naukowy dr Agaty Igi Świątkowskiej i Jej aktywność naukowa w pełni uzasadniają nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie *nauki ścisłe i przyrodnicze*, dyscyplina *nauki biologiczne*.

