



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



Warszawa, 10.08.2022 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

misicka@chem.uw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Sylwii Modrzyckiej pt. *Opracowanie selektywnych markerów chemicznych do badania aktywności wybranych proteaz serynowych zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi*

Enzymy proteolityczne pełnią w organizmie różnorodne funkcje a ich aktywność jest regulowana przez endogenne inhibitory. Zaburzenia równowagi pomiędzy aktywnością proteaz, a ich inhibitorami są przyczyną wielu chorób, dlatego też poszukiwanie nowych, selektywnych markerów i inhibitorów tej grupy enzymów jest celem badawczym wielu grup naukowych. Opracowane związki mogą pozwolić zarówno na lepsze zrozumienie mechanizmów działania poszczególnych typów enzymów, jak i na opracowanie nowych leków. Stanowi to przedmiot zainteresowania wielu ośrodków badawczych, a jedną z grup z sukcesem badającą te możliwości jest zespół prof. dr hab. Marcina Drąga - promotora recenzowanej pracy.

Praca doktorska mgr inż. Sylwii Modrzyckiej została wykonana w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Część badań obejmująca otrzymanie oczyszczonych czynników krzepnięcia oraz krwi pełnej została wykonana we współpracy z prof. Jamesem Huntingtonem z University of Cambridge i dr. n. med. Stanisławem Potoczkiem z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Promotorem pomocniczym recenzowanej pracy była dr inż. Paulina Kasperkiewicz-Wasilewicz.

Celem pracy doktorskiej mgr inż. Sylwii Modrzyckiej było:

1. Określenie specyficzności substratowej wybranych proteaz serynowych kaskady krzepnięcia krwi (APC, trombiny, czynnika Xa i XIa) w pozycjach P4-P1 wykorzystując metody chemii kombinatoryjnej;
2. Projektowanie i synteza tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych;
3. Opracowanie zestawu inhibitorów i markerów chemicznych oraz badanie ich selektywności za pomocą kinetyki enzymatycznej oraz analizy SDS-PAGE i Western blot;
4. Optymalizacja metody i wizualizacja czynników krzepnięcia krwi w ludzkim osoczu.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska (155 stron) składa się ze wstępu teoretycznego (38 stron), celu pracy (2 strony), opisu badań własnych wraz z opisem procedur syntetycznych (42 stron), podsumowania i wniosków (5 stron) oraz części eksperymentalnej (30 stron). Rozprawa zawiera również wykaz stosowanych skrótów, struktury aminokwasów użytych w syntezie bibliotek, jak również spis literatury cytowanej (284 pozycje) i spis dorobku naukowego doktorantki, który obejmuje 3 publikacje, 1 zgłoszenie patentowe i 4 wystąpienia konferencyjne.

Wstęp teoretyczny składa się z kilku zasadniczych części omawiających doniesienia literaturowe w zakresie zagadnień związanych z rozprawą. W części pierwszej doktorantka przedstawiła ogólne zagadnienia związane z proteazami, następnie omówiła szczegółowo proteazy serynowe, metody określania specyficzności substratowej proteaz i markery chemiczne. Osobny paragraf dotyczy zagadnień związanych z kaskadą krzepnięcia krwi w którym doktorantka dokładnie omówiła niektóre czynniki krzepliwości, a mianowicie białko C, trombinę i czynniki Xa i XIa.

Głównym celem badań mgr inż. Sylwii Modrzyckiej było opracowanie zestawu selektywnych narzędzi chemicznych umożliwiających szybkie i proste wykrywanie aktywności i znakowanie wybranych enzymów (APC, trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa) aktywnych w procesie krzepnięcia i oznaczenie ich w próbkach osocza krwi ludzkiej.

W pierwszej fazie swoich badań, po potwierdzeniu specyficzności L-argininy w pozycji P1 we wszystkich badanych enzymach, doktorantka przebadła preferencje substratowe badanych czynników krzepnięcia w pozycjach P4-P2 poprzez przebadanie bibliotek w technologii *Hybrid Combinatorial Substrate Library* (HyCoSuL).

Następnie, w oparciu o szczegółowy obraz preferencji substratowej miejsc aktywnych poszczególnych czynników krzepnięcia, dla każdego badanego enzymu wybrała reszty aminokwasowe nienaturalnych aminokwasów preferowane przez ten enzym i zsyntezowała, przy wykorzystaniu techniki na podłożu stałym, serię fluorogenicznych tetrapeptydów (znacznikiem był kwas 7-amino-4-kumarynooctowy ACC, N-koniec był zacetylowany), które przebadła pod kątem ich selektywności.

Doktorantka otrzymała 25 fluorogenicznych substratów peptydowych dla APC, 22 dla trombiny, 20 dla czynnika Xa i 23 dla czynnika XIa. Dokładne badania kinetyczne wykazały, że wśród otrzymanych przez nią związków był najlepszy z dotąd opisanych w literaturze substrat APC (SMA5) i co ważniejsze substrat, który wykazywał bardzo wysoki stosunek selektywności k_{kat}/K_M (SMA17). Również w stosunku do pozostałych enzymów doktorantka uzyskała selektywne substraty, dla trombiny było to SMII22, dla czynnika Xa SMX15, a dla czynnika XIa SMX15. To duże osiągnięcie doktorantki, bo do tej pory nie było opracowanych tak selektywnych substratów dla czynników krzepnięcia.

W kolejnym etapie swoich badań mgr inż. Sylwia Modrzycka przekształciła otrzymane substraty w serię 10 markerów chemicznych pierwszej generacji. Wszystkie markery zawierały

na C-końcu grupę wiążącą - fosfonian difenyłu, który tworzy wiązanie kowalencyjne z resztą seryny w miejscu aktywnym proteaz serynowych. Część centralną stanowiły fragmenty peptydowe zaprojektowane dla poszczególnych enzymów indywidualnie, co warunkowało ich rozpoznanie. Markery na N-końcu zawierały biotynę, którą oddzielono od sekwencji peptydowej linkerem bądź Ahx (APC, trombina i czynnik Xa lub PEG(4) w przypadku czynnika XIa.

Wymagało to od doktorantki przeprowadzenia wieloetapowej syntezy reaktywnej grupy wiążącej (wg. metody opisanej w literaturze), syntezy fragmentów peptydowych zawierających również linker i biotynę (na żywicy 2-chlorotrytylowej), a następnie połączenie tych fragmentów metodą syntezy w roztworze (HATU, 2,4,6-kolidyna). Przeprowadzone badania selektywności biotynylowanych markerów chemicznych przy użyciu metody SDS-PAGE pozwoliły na wybranie do dalszych badań markerów poszczególnych enzymów. Były to P-SMA171 dla APC, P-SMII321 dla trombiny, P-SMX151 dla czynnika Xa i P-SMXI151 dla czynnika XIa.

Kolejnym etapem badań mgr inż. Modrzyckiej było zaprojektowanie i otrzymanie fluorescencyjnych markerów chemicznych, jak również inhibitorów, które następnie miały być wykorzystane do bezpośredniego oznaczenia badanych enzymów w ludzkim osoczu. W tym celu otrzymała po jednym markerze chemicznym dla każdego czynnika krzepnięcia, które zamiast biotyny miały różne znaczniki fluorescencyjne (cyjaniny 3, 5, 7 i BODIPY FL), charakteryzujące się minimalnym nakładaniem widm emisji fluorescencji. Niezależnie przeprowadziła syntezę inhibitorów, które zamiast znacznika fluorescencyjnego miały grupę acetylową.

W następnym etapie badań doktorantka przebadła pod kątem selektywności otrzymane markery, potwierdzając ich wysoką selektywność i możliwość zastosowania w próbkach biologicznych zawierających wiele czynników krzepnięcia krwi. Eleganckim zakończeniem badań była optymalizacja warunków oznaczania czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu i przeprowadzenie właściwych badań jednoczesnego znakowania APC, trombiny i czynnika Xa.

Otrzymane w pracy doktorskiej mgr inż. Sylwii Modrzyckiej markery fluorescencyjne mogą znaleźć zastosowanie w badaniach diagnostycznych oznaczania aktywności czynników krzepliwości i pomóc w leczeniu zaburzeń krzepliwości, coraz częściej obserwowanych w medycynie. Z powodu tak szerokiej możliwości aplikacyjnych zostało w tym zakresie dokonane również zgłoszenie patentowe. Pokazuje to jak ważne były badania prowadzone przez doktorantkę i z jakim sukcesem badania te zostały zakończone.

Z obowiązku recenzenta poniżej przedstawię kilka uwag i pytań, które nasunęły mi się podczas czytania tej rozprawy doktorskiej i które mogą stanowić podstawę do dyskusji z doktorantką.

1. Rys. 5 chyba nie do końca dobrze opisuje procedurę metody Furki;

2. Str. 19 cytowana publikacja w Biopolimers z 1994 r. pochodzi z laboratorium Houghtena RA., który zainicjował i opracował tworzenie tego rodzaju bibliotek, więc dobrze byłoby raczej używać jego nazwisko przy omawianiu tej metody;
3. Str. 51 opisane wyniki dla oznaczenia specyficzności substratowej czynnika X1a są trochę niezrozumiałe, bo nie do końca wiadomo, czy jest to opis badań własnych doktorantki czy opis danych literaturowych. W opisie doktorantka rozważa trzy proteazy, na rys. 16 są przedstawione wyniki dla 4 proteaz, a dodatkowy opis dotyczy czynnika X1a. Mam nadzieję, że zostanie to wyjaśnione na prezentacji podczas obrony;
4. Z ciekawości zapytam kiedy była podjęta decyzja o innym linkerze w syntezie markerów czynnika X1a? Czy próby syntezy z Ahx prowadziły do związku trudnego do izolacji i małej rozpuszczalności w wodzie i wtedy została podjęta decyzja, czy od początku spodziewano się tych trudności?
5. Doktorantka nie uniknęła żargonowych wyrażeń, np. str. 20 - „fluorescencja nie jest detektowana”, str. 79 – „markery chemiczne detektowano”, str. 87” markery wiążą się i detektują APC”.

Podsumowując, pracę doktorską mgr inż. Sylwii Modrzyckiej przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Badania są bardzo starannie zaplanowane i wykonane, a rozprawa doktorska jest napisana dobrą polszczyzną, zwięźle i zawiera wszystkie niezbędne opisy wykonanych doświadczeń, zarówno opisy syntez, jak i badań znakowania białek i badań kinetycznych. Dodatkowo praca jest bardzo przejrzysto ilustrowana graficznie. Struktury otrzymanych fluorescencyjnych markerów, jak i wyniki znakowania są elegancko i czytelnie przedstawione na kolorowych rysunkach. Zakres pracy doktorskiej był niezwykle szeroki, począwszy od wieloetapowych syntez ok. 100 substratów, 14 markerów i 4 inhibitorów badanych czynników krzepliwości, poprzez badania znakowania poszczególnych enzymów, badania kinetyczne pozwalające na określenie selektywności otrzymanych związków, na optymalizacji warunków i przeprowadzeniu właściwych badań jednoczesnego znakowania czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu, skończywszy. Myślę, że satysfakcja doktorantki z osiągniętych wyników jest na pewno bardzo duża!

Wszystkie umiejętności nabyte przez doktorantkę podczas wykonywania pracy świadczą o tym, że jest ona obecnie świetnie wyszkoloną chemiką w zakresie projektowania i syntezy substratów, markerów i inhibitorów różnorodnych enzymów proteolitycznych, jak również w zakresie szeroko pojętej chemii medycznej, przygotowanym do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych.

Wyniki pracy mgr inż. Sylwii Modrzyckiej zostały już opublikowane w 3 publikacjach w bardzo dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej: Chemical Science (IF=9,8), J. Med Chem. (IF=7,4), Antiviral Research (IF=5,9). Doktorantka prezentowała również swoje wyniki na kilku konferencjach, na jednej z nich dostała wyróżnienie za najlepszą ustną prezentację. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że doktorantka otrzymywała stypendium Rektora dla najlepszych doktorantów Politechniki Wrocławskiej (2017, 2020) i stypendium doktoranckie z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych (2017, 2020).

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona rozprawa mgr inż. Sylwii Modrzyckiej zatytułowana „*Opracowanie selektywnych markerów chemicznych do badania aktywności wybranych proteaz serynowych zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi*” spełnia wszelkie wymagania stawiane ustawą o stopniach i tytule naukowym i zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Sylwii Modrzyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na rozległość przeprowadzonych badań, osiągnięte wyniki zarówno naukowe, jak i aplikacyjne, opublikowanie już części wyników w doskonałych czasopismach, wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

D. Muszko