

POLITECHNIKA ŁÓDZKA
INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska,

tel: 42-631-32-61; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Sylwii Modrzyckiej

Magister inżynier Sylwia Modrzycka swoją pracę doktorską zatytułowaną „Opracowanie selektywnych markerów chemicznych do badania aktywności wybranych proteaz serynowych zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi” wykonała na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania, pod prof. dr hab. Marcina Dąga oraz dr inż. Pauliny Kasperkiewicz-Wasilewskiej pełniącej funkcję promotora pomocniczego.

Tematyka badawcza podjęta w rozprawie dotyczy wybranych proteaz serynowych (APC, trombiny, czynnika Xa i XIa) zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi. Hemostaza to złożone zjawisko, gdyż odpowiada za utrzymanie krwi w płynnej postaci a z drugiej strony za powstrzymywanie krwawień. Podstawowym zadaniem hemostazy jest utrzymanie równowagi między procesem krzepnięcia a fibrynolizą. Brak równowagi może skutkować patologicznymi krwawieniami, a także chorobami o podłożu zakrzepowozatorowym.

Praca posiada wielopoziomą strukturę, konsekwentnie dostosowaną do osiągnięcia nadrzędnego celu badań realizowanych w grupie badawczej profesora Marcina Dąga gdzie wykorzystuje się platformę technologiczną opartą o szeroką gamę nienaturalnych aminokwasów do monitorowania aktywności enzymów proteolitycznych. Proteazy mają ogromne znaczenie w badaniach biomedycznych. Monitorowanie aktywności proteaz jest możliwe przy użyciu markerów molekularnych (znaczników) oraz inhibitorów, czyli związków hamujących aktywność poszczególnych proteaz. Projektowanie i synteza tych związków służących selektywnemu wykrywaniu oraz blokowaniu aktywności proteaz jest głównym obszarem, nad którym pracuje zespół profesora Marcina Dąga. Opracowana technologia (Hybrydowa Kombinatoryczna Biblioteka Substratów, HyCoSuL) umożliwia zaprojektowanie i otrzymanie wysoce aktywnych i selektywnych narzędzi chemicznych w postaci substratów, inhibitorów i markerów chemicznych. Platforma ta z powodzeniem zastosowana była w poszukiwaniu markerów wielu enzymów proteolitycznych: elastazy

neutrofilowej, ważnej w rozwoju nowotworów oraz zwalczaniu patogenów; kaspaz, enzymów pełniących kluczową rolę w procesie apoptozy; proteaz serynowych w neutrofilach oraz proteaz wirusa ZIKA, Dengue czy SARS. Platforma ta może służyć do opracowywania nowych terapii, leków czy metod diagnostycznych.

Opracowanie selektywnych markerów chemicznych do badania aktywności APC, trombiny, czynnika Xa i XIa zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi wymagało realizacji badań wielopoziomowych, dlatego też główny cel pracy obejmował: 1) badanie specyficzności substratowej APC, trombiny, czynnika Xa i XIa w pozycjach P4-P1 z wykorzystaniem technologii HyCoSu; 2) zaprojektowanie i syntezę tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych; 3) opracowanie zestawu inhibitorów i markerów chemicznych APC, trombiny, czynnika Xa i XIa i zbadanie ich selektywności; 4) wykorzystanie opracowanych związków do jednoczesnego śledzenia czynników krzepnięcia krwi w ludzkim osoczu.

Recenzowana praca liczy 155 stron. Układ pracy jest klasyczny i obejmuje wstęp teoretyczny, cel pracy, badania własne, podsumowanie i wnioski końcowe, część eksperymentalną oraz wykaz stosowanych skrótów, struktury aminokwasów użytych w syntezie bibliotek, dorobek naukowy Doktorantki oraz spis cytowanej literatury.

Rozdział pierwszy „Wstęp literaturowy” przedstawia podstawowe dane na temat proteaz serynowych, metod wyznaczania specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych, markerów chemicznych enzymów proteolitycznych, kaskady krzepnięcia oraz ostatnie dwa podrozdziały przedstawiają budowę i funkcję APC, trombiny, czynnika Xa i XIa, profile specyficzności, substraty i inhibitory tych białek. Rozdział ten liczy 39 stron i zawiera aż 249 odnośników literaturowych. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymana jest spójność narracji dzięki starannemu doborowi referowanych publikacji i konsekwentnemu podporządkowaniu wszystkich części składowych nadrzędnemu celowi pracy. Generalnie, pozwala więc to na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy. W sposób bardzo ogólnikowy i pobieżny został przedstawiony podrozdział 1.3.1 „Chemiczne metody określania specyficzności substratowej proteaz”, dlatego chciałabym prosić o omówienie tych metod w trakcie obrony pracy doktorskiej.

Rozdział drugi przedstawia cel pracy, pierwsza część jest powtórzeniem informacji o funkcji APC, trombiny, czynnika Xa i XIa, w moim odczuciu jest ona zbędna. Właściwy cel pracy zawarty jest w punktach 1-4 oraz został przedstawiony klarownie w sposób graficzny.

Rozdział trzeci „Badania własne” Doktorantka rozpoczęła od zastosowania zdefiniowanej biblioteki do określenia specyficzności substratowej APC, trombiny, czynnika Xa i XIa w pozycji S1. Do tego celu zastosowała zdefiniowaną bibliotekę peptydową o strukturze Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC. Biblioteka ta została zsyntezowana w ramach wcześniejszych badań zespołu. W przypadku APC, trombiny, czynnika Xa Doktorantka stwierdziła, że wszystkie proteazy rozpoznawały jedynie dodatnio naładowaną resztę L-Arg. W przypadku białka XIa Doktorantka stwierdziła, że oprócz L-Arg, rozpoznawana jest też reszta guanidynowanej pochodnej Phe (para L-Phe(guan), oraz L-Asp(Bzl), D-Phe(2-Cl), D-Phe(3-Cl). Niestety w oparciu o dane na Rysunku 16 można jedynie stwierdzić rozpoznawanie reszty L-Arg. Do badań specyficzności substratowej względem kieszeni S2-S4 Doktorantka zastosowała metodę HYCoSuL. Biblioteka składała się z trzech podbibliotek: Ac-P4-X-X-Arg-ACC, Ac-X-P3-X-Arg-ACC oraz Ac-X-X-P2-Arg-ACC. W pozycjach P4, P3, P2 znajdowały się aminokwasy nienaturalne oraz równomolowa mieszanina 18 naturalnych aminokwasów. Przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie, że w przypadku APC najlepiej rozpoznawanym substratem jest peptyd zawierający resztę L-Lys w pozycji P2 oraz L-Igl. W przypadku trombiny, w celu uzyskania zwiększenia selektywności i obniżenia zdolności oddziaływań krzyżowych Doktorantka zastosowała L-Aze i L-Pip. Najlepiej rozpoznawanymi substratami przez czynnik XIa były peptydy zawierające w pozycji P2 reszty L-His(Bzl) oraz L-Glu(Bzl). Badania nad poszukiwaniem substratów o zmiennej w pozycji P3 wykazały, że APC, trombina i czynnik Xa posiadają podobne preferencje substratowe względem naturalnych aminokwasów. Doktorantce udało się rozróżnić APC od trombiny i czynnika Xa poprzez wbudowanie w pozycję P3 reszty L-Dab(Z). Dla trombiny wyselekcjonowana została pochodna zawierająca resztę L-Cys(MeBzl). W przypadku czynnika Xa Doktorantka wyselekcjonowała pochodną zawierającą w pozycji P3 resztę L-hArg, która umożliwiała odróżnienie tego białka od APC i trombiny. Kieszeń S3 czynnika XIa znacząco różni się od kieszeni APC, trombiny oraz Xa, dzięki czemu Doktorantka stwierdziła, że najlepszymi substratami są peptydy zawierające w pozycji P3 reszty L-Nle oraz L-Dht. Doktorantka stwierdziła, że w pozycji P4 w przypadku substratu dla APC najlepsze wyniki uzyskano dla peptydu zawierającego resztę L-Lys, z kolei największą selektywność względem trombiny dla substratu zawierającego resztę L-hCha. Dla czynnika Xa najwyższą selektywność uzyskano dla peptydu zawierającego resztę D-Pro w pozycji P4. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że w przypadku czynnika XIa najbardziej selektywnym substratem była pochodna zawierająca resztę L-Tyr(2,6-Cl₂-Z) w pozycji P4.

Mgr inż. Sylwia Modrzycka dysponując informacjami o specyficzności substratowej dla białek APC, trombiny Xa i XIa otrzymała pulę fluorogenicznych tetrapeptydów, które zbadała pod kątem ich selektywności. Zastosowała klasyczną metodę na fazie stałej z użyciem żywicy typu Rink Amide RA do której przyłączyła pochodną ACC oraz resztę L-Arg. W przypadku białka APC otrzymana została pula dwudziestu pięciu znakowanych fluoroformami substratów peptydowych. Stwierdziła, że najbardziej obiecujące są peptydy SMA5 (Ac-Lys-Dab(Z)-Igl-Arg-ACC) oraz SMA17 (Ac-Lys-Dab(Z)-Lys-Arg-ACC). Otrzymane zostały dwadzieścia dwa znakowane fluoroformem peptydy, które przetestowano pod kątem selektywności oddziaływania z trombiną. Przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie, że najbardziej selektywnym substratem był peptyd SMII22 (Ac-hCha-Cys-(MeBzl)-Pip-Arg-ACC). Poszukując selektywnych substratów czynnika Xa Doktorantka otrzymała dwadzieścia tetrapeptydów zawierających zarówno naturalne jak i nienaturalne aminokwasy. Dla czynnika Xa najbardziej selektywnym substratem był tetrapeptyd SMX15 (Ac-DPro-hArg-1-Nal-Arg-ACC). W końcowym etapie badań, Doktorantka otrzymała pulę dwudziestu trzech znakowanych fluorescencyjnie peptydów będących substratami czynnika XIa. Stwierdzono, że dla tego białka najlepszymi substratami są peptydy: SMXI5 (Ac-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Nle-Glu(Bzl)-Arg-ACC) oraz SMXI19 (Ac-Tyr(2,6-Cl₂-Z)-Dht-His(Bzl)-Arg-ACC). W oparciu o uzyskane wyniki badań nad poszukiwaniem selektywnych substratów dla ACP, trombiny, Xa i XIa Doktorantka otrzymała dziesięć markerów chemicznych pierwszej generacji, które wykorzystwała do wizualizacji aktywnych enzymów stosując technikę SDS-PAGE i Western blot. Zaprojektowane markery chemiczne zawierały reaktywną grupę wiążącą (reszta fosfonianu difenyłu tworzącą wiązanie estrowe z resztą seryny w centrum aktywnym proteaz serynowych), fragment peptydowy, łącznik oraz reszta biotyny umożliwiające detekcję docelowego białka. Doktorantka do otrzymania zaprojektowanych substratów ACP, trombiny, Xa i XIa zastosowała podejście syntetyczne łączące klasyczną syntezę na fazie stałej z syntezą w roztworze. Jednym z elementów syntezy była synteza reaktywnej grupy wiążącej, czyli estru difenyłowego kwasu benzyloksykarbonylamino-[3-di-t-Boc-guanidyno)propylo]metanofosfonowego. Związek ten po usunięciu grupy ochronnej Z został użyty do syntezy koniugatu z peptydem. Tu nasuwa się pytanie, czy Doktorantka nie obawiała się epimeryzacji na C-terminalnym aminokwasie koniugatu? Czy tworzyła się mieszanina diastereomerów, która była rozdzielana? Obecność reszty biotyny pozwoliła na wykonanie badań selektywności reakcji z ACP, trombiną, Xa i XIa. Dla uzyskanych substratów ACP (P-SMA-61, P-SMA171 i P-SMA261), Doktorantka stwierdziła, że wszystkie te związki znakują ACP, jednak P-SMA-61 reaguje również z

trombiną i czynnikiem Xa. Z kolei P-SMA261 ulegał reakcji z trombiną. To co istotne to koniugat P-SMA171 okazał się być selektywny względem ACP. Analogiczne badania zostały przeprowadzone ze związkami, które były projektowane jako selektywne substraty dla trombiny, czynników Xa i XIa. W kolejnym etapie badań Doktorantka otrzymała cztery fluorescencyjne markery chemiczne i inhibitory (po jednym dla każdego białka) dla ACP, trombiny, Xa i XIa. Znakowane fluorescencyjnie markery chemiczne, znakowane Cy3, Cy5, Cy7 i BODIPY mogą być wykorzystane do bezpośredniej detekcji czynników krzepnięcia w żelu. Stosując te same fragmenty peptydowe, Doktorantka otrzymała zestaw kowalencyjnych inhibitorów. Selektywność fluorescencyjnych markerów i inhibitorów testowana była w badaniach kinetycznych i analizie SDS-PAGE z użyciem ACP, trombiny, Xa i XIa. Najbardziej spektakularnym dowodem wskazującym na selektywność oddziaływania (otrzymanych ABPs: P-SMA172, P-SMII222, PSMX152 i P-SMXI52) i tym samym znakowania wybranych czynników krzepnięcia krwi był eksperyment z zastosowaniem osocza w miejsce izolowanych i oczyszczonych białek.

Rozdział czwarty „Podsumowanie i wnioski końcowe” w moim odczuciu jest zbyt długi. Nie potrzebnie przedstawiono ponownie problem hemostazy i czynników kaskady krzepnięcia w kontekście ich wpływu na rozwój różnorodnych chorób. Również ponownie przedstawiony cel badań nie powinien znaleźć się w tym rozdziale. Dużo lepsze byłoby przedstawienie wyselekcjonowanych struktur pierwszego etapu badań nad badaniem specyficzności substratowej w postaci tabel.

Rozdział piąty „Część eksperymentalna” opisany jest poprawnie. Procedury i protokoły przedstawione zostały w sposób umożliwiający ich odtworzenie. W kilku miejscach pojawiają się niedociągnięcia, które jednak nie umniejszają pozytywnej oceny pracy.

Bez wątpienia imponujący jest zbiór cytowanych odnośników literaturowych obejmujący 284 pozycje.

Od strony edytorskiej, praca jest przygotowana bardzo starannie. Jednak Doktorantce nie udało się uniknąć błędów i drobnych uchybień merytorycznych. W pracy jest znacząca ilość żargonowych i mało precyzyjnych określeń: codzienna hemostaza, autopociesowanie proteazy, „Reakcję rozpoczęto od przyłączenia pierwszego aminokwasu (Fmoc-P2-OH), numerowanie aminokwasów w peptydach zaczyna się od N-końca a nie C-końca, CuCl_2 , MgSO_4 , NaCl , P_2O_5 są wzorami sumarycznymi tych związków a nie skrótami. W całej pracy brak jest wyjaśnień dotyczących zróżnicowanego stężenia stosowanych proteaz.

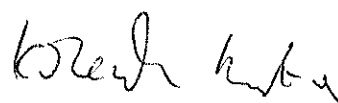
Podsumowując, wysoko oceniam wybór ambitnego tematu badań, w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami prac o charakterze podstawowym jak i potencjale

aplikacyjnym. Wysoce pozytywnie oceniam zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, oraz trudny i interdyscyplinarny charakter wykonanych prac eksperymentalnych. Na szczególne uznanie zasługuje nie tak często spotykana biegłość zarówno w wykorzystywaniu szerokiego arsenału metod syntetycznych oraz sprawność w posługiwaniu się złożonymi, współczesnymi technikami analitycznymi, które to Doktorantka potrafiła zaimplementować w badaniach biologicznych. Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki.

Na dorobek publikacyjny mgr inż. Sylwii Modrzyckiej składa się 3 publikacje w czasopiśmie z listy JCR, z czego jednej publikacji Doktorantka jest pierwszym współautorem. Pani Sylwia Modrzycka jest również współautorem zgłoszenia patentowego. Wyniki prac badawczych Doktorantka prezentowała na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym (4 komunikaty). Doktorantka brała również udział w realizacji projektu TEAM FMN (2017-4/32). Doktorantka była również Laureatką I miejsca za najlepszą prezentację ustną na konferencji XVII Ogólnopolskie Seminarium dla Doktorantów i Studentów „Na pograniczu chemii i biologii” w 2019 r.

Podsumowując, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską mgr inż. Sylwii Modrzyckiej. Wyniki badań są wartościowe i wnoszą znaczący wkład w rozwój nauki.

Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane zwyczajowo pracom doktorskim oraz obowiązujące wymagania ustawowe. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Sylwii Modrzyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska

Łódź, 26 08 2022