



Wrocław, 2022-08-31

Prof. dr hab. Piotr Stefanowicz

tel. 71 375 7213

piotr.stefanowicz@chem.uni.wroc.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr Sylwi Modrzyckiej

pt. „Opracowanie selektywnych markerów chemicznych do badania wybranych proteaz serynowych zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi”

Pani mgr Sylwia Modrzycka wykonała pracę doktorską zatytułowaną: „**Opracowanie selektywnych markerów chemicznych do badania wybranych proteaz serynowych zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi**” pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Marcina Drąga oraz dr inż. Pauliny Kasperkiewicz-Wasleskiej w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania Politechniki Wrocławskiej .

Praca doktorska będąca przedmiotem tej recenzji dotyczy poszukiwania narzędzi, które umożliwiłyby selektywne obrazowanie czynników krzepnięcia w próbkach pochodzenia biologicznego. Realizacja tego zadania badawczego wymagała określenia specyficzności substratowej proteaz serynowych, które biorą udział w krzepnięciu krwi. Badania te przeprowadzono metodami chemii kombinatorycznej, wykorzystując zarówno aminokwasy białkowe jak i nienaturalne. Przebieg reakcji proteolizy był monitorowany z wykorzystaniem substratów fluorogennych zawierających na N-końcu pochodną 7-aminokumaryny. Na tym etapie badań wykorzystana została określona specyficzność substratowa czynników krzepnięcia w pozycjach P4-P1. Badania te umożliwiły precyzyjne ustalenie specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych zaangażowanych w proces krzepnięcia (APC, Trombiny oraz czynników Xa i XIa). Dzięki temu stało się możliwe zaprojektowanie wysoce selektywnych substratów dla wymienionych enzymów. Dane te umożliwiły także uzyskanie selektywnych inhibitorów i znaczników chemicznych czynników krzepnięcia. Wykorzystując informacje uzyskane podczas pierwszej fazy badań zsyntezowano sekwencje peptydowe o dużym powinowactwie do wykrywanego białka, w których reszta argininy została zastąpiona przez resztę estru difenylowego

kwasy amino-(3-guanidylpropylo) metanofosfonowe. Doprowadziło to do powstania nieodwracalnych, kowalencyjnych inhibitorów badanych proteaz. W celu detekcji czynników krzepnięcia zastosowano dwa alternatywne podejścia: otrzymany inhibitor został skoniugowany z biotyną lub bezpośrednio z odpowiednim fluoroforem. Koniugat zawierający biotynę mógł być następnie poddany wizualizacji z wykorzystaniem streptawidyny znakowanej fluorescencyjnie, natomiast w przypadku zastosowania koniugatu z fluoroforem możliwa jest bezpośrednia detekcja czynników krzepnięcia na żelu poliakrylamidowym.

Otrzymane odczynniki zostały przetestowane zarówno z wykorzystaniem oczyszczonych czynników krzepnięcia jak i na osoczu. Badania wykazały że otrzymane markery są efektywne i umożliwiają selektywną detekcję czynników krzepnięcia w materiale biologicznym.

Niewątpliwie realizowany w pracy doktorskiej temat badawczy jest aktualny i ma potencjalne zastosowania.

Praca liczy 155 stron i napisana jest jasno i zwięźle. Przegląd literaturowy (49 stron) kolejno omawia mechanizm działania proteaz serynowych, metody badawcze stosowane do wyznaczania specyficzności substratowej enzymów i chemiczne markery enzymów proteolitycznych. Doktorantka omówiła także mechanizmy prowadzące to krzepnięcia krwi ze szczególnym uwzględnieniem czynników krzepnięcia (APC, trombina, czynniki Xa i XIa), których detekcja i wizualizacja stanowiła główny cel pracy. Wszystkie informacje zawarte tej części są celowe i przyczyniają się do lepszego zrozumienia rozprawy. Ta część pracy oddaje aktualny stan wiedzy i jest interesująco napisana.

Część eksperymentalna zawiera wszystkie informacje niezbędne do odtworzenia wykonanych syntez i badań enzymatycznych. Dla związków o niskich masach cząsteczkowych potwierdzenie struktury zostało przeprowadzone z wykorzystaniem ^1H NMR, HRMS. Przytoczone dane jednoznacznie potwierdzają struktury otrzymanych substancji. Peptydy zostały scharakteryzowane z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej i HRMS. Zmierzone masy cząsteczkowe pozostają w bardzo dobrej zbieżności ze składem obliczonym na podstawie wzorów sumarycznych, a badania przeprowadzone techniką HPLC potwierdzają czystość i jednorodność otrzymanych produktów. Taki rodzaj charakterystyki produktów peptydowych i innych biocząstek o złożonych strukturach jest powszechnie stosowany w piśmiennictwie naukowym. Pewne zastrzeżenia w opisie eksperymentu może budzić brak informacji dotyczącej otrzymanych chromatogramów. Z jednej strony można się zgodzić, że jest to rutynowa metoda badawcza, która obecnie nie stanowi wyzwania. Jednak ocena czystości produktów byłaby łatwiejsza gdyby podać warunki pomiaru, takie jak gradient, szybkość przepływu rozpuszczalnika, skład fazy ruchomej, typ i średnica kolumny a także długość fali, przy której była prowadzona detekcja. Ten ostatni parametr jest szczególnie istotny, ponieważ jeżeli detekcja jest prowadzona w zakresie

pochłaniana fluoroforu, analiza nie wykaże części zanieczyszczeń (tych cząsteczek w których brakuje części zawierającej fluorofor)

Bibliografia (284 pozycje) jest bardzo obszerna a także przygotowana w sposób jednolity i staranny. Uwzględnia najnowsze publikacje aż do roku 2020. Duże cześć prac uwzględnionych w bibliografii powstała po roku 2000 co świadczy że tematyka pracy doktorskiej jest aktualna i budzi zainteresowanie w środowisku naukowym. Przeglądając cytowane prace znalazłem jedną nieścisłość dotyczącą pozycji 270. Na stronie 71 pracy doktorskiej Autorka odsyła do pozycji 270, która ma opisywać syntezę reaktywnej grupy wiążącej. W cytowanej publikacji znajdują się jedna dane dotyczące syntezy serii sulfonamidów.

Praca jest bardzo starannie zredagowana i profesjonalnie przygotowana pod względem graficznym. Wśród nielicznych nieścisłości, występujących w tekście moją uwagę zwrócił fragment ze strony 79 „Fluorescencyjne markery są doskonałym narzędziem do obrazowania aktywności w próbkach biologicznych ze względu na ich wysoki molowy współczynnik ekstynkcji...” Jest to skrót myślowy, ponieważ w tym fragmencie zabrakło informacji o wydajności kwantowej markera, która jest kluczowa dla wysokiej czułości detekcji. Problem ten został jednak całkowicie wyjaśniony w części teoretycznej pracy (strona 27).

Podczas lektury pracy nasunęło mi się kilka pytań do Autorki:

1. Otrzymana synteza reaktywnej grupy wiążącej prowadzi do produktu racemicznego (tworzy się nowe centrum chiralności) – jak to wpływa na przydatność otrzymanego odczynnika?
2. Układ, który powstaje po przyłączeniu reaktywnej grupy wiążącej do reszt peptydu powinien być mieszanina dwóch diastereoizomerów. Jednak na chromatogramie widoczny jest tylko jeden, wąski pik – czy jest to wynik rozdziału na preparatywnym HPLC czy też mieszanina diastereoizomerów nie daje się rozdzielić w zastosowanych warunkach.
3. W jaki sposób można otrzymać produkt o zdefiniowanej chiralności i czy miałyby to wpływ na detekcję enzymów
4. Na elektroferogramach dotyczących wizualizacji ACP w prawie wszystkich przypadkach widoczne są 3 prążki (nawet, kiedy wykorzystano czyste białko). Zjawisko to występuje niezależnie od zastosowanej metody detekcji. W przypadku pozostałych czynników krzepnięcia zjawisko to nie zostało zaobserwowane dla pozostałych czynników krzepnięcia. Jaka jest przyczyna tej niejednorodności.

Kilka krytycznych uwag zgłoszonych powyżej nie wpływa na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej. Proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami pracy są dobrze wyważone a całość napisana jest przejrzystie i przeważnie dobrym, poprawnym językiem. Dotychczasowy dorobek naukowy Doktoranta obejmuje łącznie 3 prace o łącznym współczynniku wpływu 23,2 opublikowane w prestiżowych czasopismach. Dalsze publikacje Doktorantki są obecnie

recenzowane. Doktorantka jest też współautorką patentu i licznych wystąpień na konferencjach naukowych

Podsumowując, stwierdzam, że badania przeprowadzone przez Panią Sylwię Modrzycką odpowiadają na pytania postawione w celu pracy zaś eksperymenty zostały zaprojektowane i wykonane starannie oraz przedstawione w przejrzysty sposób. Literatura obejmuje najnowsze prace i cytowana jest w sposób jednolity i konsekwentny. Wykonywane badania mają dużą wartość naukową i potencjał aplikacyjny. Wykonana przez Panią Sylwię Modrzycką i przedłożona mi do recenzji praca pt. **„Opracowanie selektywnych markerów chemicznych do badania wybranych proteaz serynowych zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi”** spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim określone przez przepisy aktualnie obowiązującej Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym jak również wymogi zwyczajowe. Dlatego wnoszę o jej przyjęcie oraz dopuszczenie Autorki do publicznej obrony pracy doktorskiej. Jednocześnie ze względu na duży dorobek naukowy autorki oraz wysoki poziom naukowych zaprezentowanych badań zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Sylwii Modrzyckiej

Prof. dr hab. Piotr Stefanowicz

