



Politechnika Łódzka

Instytut Chemii Organicznej

Prof. dr hab. Aleksandra Olma

Łódź, 19-07-2016

## **OCENA**

**całokształtu dorobku naukowego, dydaktycznego, organizacyjnego oraz pracy**

**habilitacyjnej dr Magdaleny Wysockiej pt**

**„PEPTYDY I PEPTYDOMIMETYKI JAKO NARZĘDZIA DO BADANIA ENZYMÓW  
PROTEOLITYCZNYCH”**

**w związku z wnioskiem o nadanie stopnia doktora habilitowanego**

Dr Magdalena Wysocka ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie w roku 2003 obroniła pracę magisterską zatytułowaną „Chemiczna synteza fragmentu 91-120 ludzkiego białka prionu”, wykonaną pod kierunkiem dr H. Miecznikowskiej. Praca była fragmentem badań prowadzonych przez prof. dr hab. K. Rolkę we współpracy z prof. dr hab. H. Kozłowskim z Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. W tym samym roku podjęła studia doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Stopień doktora nauk chemicznych w zakresie chemii uzyskała w 2008 roku, na podstawie rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Zastosowanie metod chemii kombinatorycznej w syntezie substratów chromogenicznych wybranych proteinaz”. Promotorem pracy był prof. dr hab. Krzysztof Rolka. Rozprawa doktorska obejmowała projektowanie i syntezę bibliotek zawierających resztę kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego w C-terminalnej pozycji oraz charakterystykę czterech proteinaz serynowych (bydłęcej  $\alpha$ -chymotrypsyny, oraz trzech proteinaz nukleofilnych). We wrześniu 2008 roku została zatrudniona jako asystent w Katedrze Chemii Bioorganicznej (obecnie Biochemii Molekularnej) kierowanej przez prof. dr hab. Krzysztofa Rolkę. Od 2009 roku do chwili obecnej pracuje jako adiunkt na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

**Ocena dorobku naukowego i dydaktycznego**

Na całkowity dorobek dr Wysockiej składa się 37 publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR. Sumaryczny współczynnik oddziaływania wynosi 107,75 (1008 punktów ministerialnych), a indeks Hirsha 10. Liczba cytowań w latach 2008-2016 według bazy Web of Science wynosi 162 (bez autocytowań). Ponadto kandydatka jest współautorką 4 monografii, 14 publikacji w recenzowanych materiałach pokonferencyjnych, jednego zgłoszenia patentowego, 60 posterów na konferencjach zagranicznych i krajowych oraz ma jedynie jedno ustne wystąpienie na 45 Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w 2010 roku. Dorobek zgromadzony przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje 5 publikacji z tzw listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku oddziaływania 12,44. Analiza bibliometryczna publikacji Habilitantki wskazuje na znaczący wzrost aktywności naukowej po doktoracie. Jej tematyka badawcza od początku pracy skupia się wokół poszukiwania selektywnych substratów i inhibitorów proteinaz serynowych, ich syntezie w roztworze i na nośniku polimerowym, również z wykorzystaniem metod chemii kombinatorycznej oraz badaniu ich oddziaływania z wybranymi proteinazami. Dr Wysocka wykazała dużą skuteczność w zdobywaniu funduszy na badania. Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora była beneficjentką grantu promotorskiego. Prace naukowo-badawcze, po doktoracie były finansowane w ramach kierowanych przez nią trzech projektów badawczych w ramach programu Juventus Plus (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego) i 4 grantów wewnętrznych (Uniwersytet Gdański). Bierze również udział w dwóch konsorcjach naukowych: trójstronnym pomiędzy wydziałami Chemii UG. (prof. dr hab. A. Lesner), Wydziałem Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ (prof. dr hab. J. Potempa) i Małopolskim Centrum Biotechnologii UJ (dr G. Dubin) oraz dwustronnym pomiędzy Wydziałem Chemii UG (prof. dr hab. A. Lesner) a Wydziałem Chemicznym PWr (dr hab. M. Sieńczyk). Za dotychczasową działalność naukową była wielokrotnie nagradzana (stypendium Fundacji Rozwoju UG, trzy nagrody zespołowe Rektora UG (I, II i III stopnia).

W działalności naukowej dr Wysockiej zabrakło stażu podoktorskiego w dobrym ośrodku naukowym zagranicznym lub krajowym, który moim zdaniem stanowi ważny element rozwoju młodego pracownika naukowego. Poszerza jego wiedzę, horyzonty myślowe oraz pozwala na zdobycie nowych umiejętności. Brakuje także wygłoszenia referatów na międzynarodowych konferencjach. Jest to, moim zdaniem, słaba strona wniosku.

W trakcie studiów doktoranckich Habilitantka prowadziła ćwiczenia laboratoryjne z Biochemii dla studentów Chemii i Ochrony Środowiska Wydziału Chemii UG, oraz ćwiczenia

laboratoryjne z Chemii Organicznej dla studentów Wydziału Biologii UG. Po uzyskaniu stopnia doktora prowadziła zajęcia dla studentów Wydziału Chemii UG z Biochemii (ćwiczenia laboratoryjne oraz audytoryjne). W dorobku dydaktycznym ma również opiekę nad dyplomantami (zakończonych 7 prac licencjackich i 10 prac magisterskich). Dr Wysocka została powołana przez Radę Wydziału na promotora pomocniczego w dwóch przewodach doktorskich, w których promotorem jest prof. dr hab. Adam Lesner.

Dorobek organizacyjny obejmuje udział w promowaniu Wydziału Chemii UG (współorganizacja dni otwartych w 2013 roku). Habilitantka pełniła funkcję sekretarza XX Polskiego Sympozjum Peptydowego oraz brała Jest też członkiem European Peptide Society oraz Polish Peptide Community.

### **Ocena jednotematycznego cyklu publikacji „Peptydy i peptydomimetyki jako narzędzia do badania enzymów proteolitycznych”**

Rozprawę habilitacyjną dr Wysockiej stanowi cykl dwunastu powiązanych tematycznie prac opublikowanych w latach 2010-2016 w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Ocena bibliometryczna prac wchodzących w skład rozprawy wypada bardzo dobrze, sumaryczny IF wynosi 40.569, co w przeliczeniu na jedną pracę daje współczynnik oddziaływania 3.38. Wszystkie publikacje mają charakter opracowań zespołowych, gdzie w 9 pracach kandydatka jest pierwszym autorem, a tylko w jednej autorem do korespondencji, choć i w tej pracy, jak wynika z oświadczenia, prof. dr hab. A. Lesner również współuczestniczył w korespondencji z redakcją. W dorobku naukowym dr Wysockiej nie ma żadnego artykułu monoautorskiego (np. pracy przeglądowej), jak również żadnego wykładu na zaproszenie.

Materiały złożone przez Habilitantkę zawierają oświadczenia współautorów, określające ich wkład w poszczególne publikacje. Jednakże w wielonazwiskowych pracach, w których jest 11 autorów, udział określony przez dr Wysocką na 60% (H.10) lub 55% (H.12) wydaje się mocno zawyżony. Zwłaszcza, że w autoreferacie używa głównie pierwszej osoby liczby mnogiej, co nie podkreśla jej roli wiodącej w badaniach.

Zbiór 12 publikacji został opatrzony komentarzem w 38 stronicowym autoreferacie, zawierającym krótki wstęp na temat enzymów proteolitycznych (proteinaz), ich podziału pod względem mechanizmu działania i budowy miejsca katalitycznego. Podała również przykłady enzymów proteolitycznych, które potencjalnie mogą być markerami w różnych stanach chorobowych. Dobór prac został dokonany logicznie i konsekwentnie. Badania obejmują,

projektowanie, syntezę substratów, analizę ich aktywności oraz specyficzności substratowej dla wybranych enzymów proteolitycznych takich jak neutrofilna proteinaza 3 (H.1, H.2, H.7), ludzka trypsynopodobna proteaza dróg oddechowych (H.3, H.4), ludzka elastaza neutrofilna (H.4, H.7), katepsyna G (H.4), neutrofilna proteaza serynowa (H.5), ludzka matryptaza-2 (H.8), ludzka katepsyna L (H.9), ludzka HtrA2 proteaza (H.10), NPS4 proteazy (H.12) oraz ludzkiego proteosomu 20S, wieloenzymatycznego kompleksu (H.11). Większość prowadzonych badań była możliwa dzięki szeroko prowadzonej współpracy z zagranicznymi jak i polskimi ośrodkami (Uniwersytety w Tours, Okayamie, Bonn, Ulm, Utrechcie, Białymstoku, Politechnika Wrocławska, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku).

Habilitantka wraz ze współpracownikami otrzymała 67 substratów fluorogenicznych o wysokiej specyficzności w stosunku do wybranych enzymów proteolitycznych (9 proteinaz serynowych i 1 cysteinowej). W swoich badaniach, dla oznaczenia oddziaływań enzym-substrat wykorzystywała kwas 2-aminobenzoowy (ABZ) jako donor fluorescencji oraz amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego (ANB-NH<sub>2</sub>) (H.1, H.2, H.3, H.4), lub dla dłuższych łańcuchów peptydowych amid 3-nitro-tyrozyny jako akceptor fluorescencji (H.7, H.8, H.9, H.10, H.11).

Modyfikacje substratów neutrofilnych proteinaz serynowych (elastazy, proteinazy 3 i katepsyny G) obejmowały również fragment donor-akceptor fluorescencji (H.5). Polegały na wbudowaniu pochodnych Lys, Orn oraz Ala, posiadających w łańcuchach bocznych odpowiednio zaprojektowane grupy fluorescencyjne, dla których obserwowano wygaszenie fluorescencji donora w wyniku bezpromiennistego transferu energii wzbudzenia elektronowego (FRET). Ich właściwości spektralne zostały dobrane tak, aby po wzbudzeniu donora emitował on promieniowanie w charakterystycznym obszarze widma, różnym dla każdego z badanych enzymów. Otrzymane zostały trzy nieopublikowane wówczas kombinacje par donor – akceptor, zawierające pary fluorescencyjnych aminokwasów. Pokazano, że stosując odpowiednio zaprojektowane substraty, można badać jednocześnie trzy neutrofilne proteinazy serynowe, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, co pozwalało mierzyć aktywność tych enzymów w surowicy. Wyniki te mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w diagnostyce (ziarniniak Wegenera, mikroskopowe zapalenie naczyń).

Dr Wysocka jest współautorką nowatorskiej metody badania specyficzności substratowej enzymów: ludzkiej neutrofilnej elastazy (HNE) oraz proteinazy 3 (PR3) w obszarze C-terminalnym (H.7). Wyselekcjonowana sekwencja ABZ-Tyr-Tyr-Abu-Asn-Glu-Pro-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-

NH<sub>2</sub>, o stałej specyficzności wynosiła  $k_{cat}/K_M = 1596 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ , może być narzędziem w oznaczaniu nadprodukcji HNE lub diagnostyce PR3 w obecności wysokiego stężenia HNE.

W ostatnim okresie czasu Habilitantka skoncentrowała swoje zainteresowania na badaniu właściwości fizykochemicznych oraz aktywności nowej klasy peptydomimetyków DAPEG (hybrydy kwasu L-2,3-diaminopropionowego oraz pochodnej glikolu etylenowego PEG). Posiadają one ogromny potencjał z uwagi na ich strukturę i niezwykle elastyczność cząsteczki, co daje możliwość dopasowywania się do cząsteczki docelowej liganda. Zsyntetyzowano bibliotekę fluorogenicznych substratów i w wyniku dekonwolucji wyselekcjonowany został niezwykle wydajny substrat ABZ-Dap(O2(Cbz))-Dap(Cbz)-Dap(GO1)-Arg-ANB-NH<sub>2</sub> (stała specyficzności  $k_{cat}/K_M$  ponad  $10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ) oraz selektywny substrat wobec nowoodkrytej proteiny ludzkich neutrofilii (H.12). Przeprowadzone modelowanie molekularne wykazało, że ten peptydomimetyk oddziałuje z miejscem aktywnym enzymu i wiąże się z drugorzędowymi miejscami wiążącymi, oddalonymi od miejsca aktywnego.

Dr Wysocka miała również znaczny udział w zaprojektowaniu i syntezie fluorogenicznych substratów ludzkiego proteosomu 20S i 26S, (H.11) charakteryzującymi się wysokimi wartościami stałej specyficzności. Ich zastosowanie pozwoliło oznaczyć aktywność proteosomu wybranym materiale biologicznym. Badania nad wykorzystaniem substratu proteosomu 20S (ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>) u pacjentów chorych na raka pęcherza w diagnostyce zostały objęte zgłoszeniem patentowym.

Wiele badań przeprowadzonych przez dr Wysocką może być wykorzystanych w diagnostyce chorób związanych z nadmierną i niekontrolowaną aktywnością enzymów proteolitycznych. Aktywne substraty dla ludzkiej trypsynopochodnej proteazy dróg oddechowych, należącej do nowej klasy proteolitycznych enzymów związanych błoną komórkową (TTSP) były strukturami wiodącymi dla zaprojektowania inhibitorów proteazy HAT (H.3).

Uzyskanie selektywnego substratu pozwalającego określić aktywność katepsyny L w materiale biologicznym (komórki nowotworowe) może być podstawą szybkiego testu diagnostycznego (H.9)

Pomimo kilku krytycznych uwag, wybór tematu, uzyskane wyniki oraz kompetentna prezentacja przeprowadzonych badań sprawiają, że przedstawiony materiał spełnia w mojej opinii wymogi formalne rozprawy habilitacyjnej.

## WNIOSEK KOŃCOWY

Konkludując, mimo, że przedstawione badania są kontynuacją rozprawy doktorskiej, to jednak Habilitantka wniosła istotne uzupełnienia i znaczny wkład w badanie wybranych enzymów. Uważam, że przedstawiona rozprawa habilitacyjna dr Magdaleny Wysockiej zawiera wiele wartościowych wyników, które w istotny sposób poszerzają wiedzę na temat poznania specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych oraz projektowanie i syntezę ich selektywnych substratów oraz inhibitorów.

Dr Wysocka wykazała w swoich badaniach dojrzałość naukową, zdolność do rozwiązywania problemów badawczych i co jest bardzo ważne, umiejętność zdobywania środków finansowych na badania naukowe i kierowania projektami badawczymi, współpracy naukowej z innymi ośrodkami. Posiada również doświadczenie w pracy dydaktycznej na wszystkich poziomach studiów.

Osiągnięcia Habilitantki spełniają wymóg Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku wraz z późniejszymi zmianami, „oryginalnego wkładu autora w rozwój dyscypliny naukowej” stawiany w postępowaniu habilitacyjnym. Dlatego wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie dr Magdalenie Wysockiej stopnia naukowego doktora habilitowanego.

*Alexandre Olma*