

Poznań, 2 listopada 2016

Prof. dr hab. Wojciech T. MARKIEWICZ
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
61-704 Poznań, ul. Noskowskiego 12/14

**Ocena dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej
dr Katarzyny Magdaleny Błażewskiej
pt. „Kwasy α -fosfonokarboksyłowe jako inhibitory i narzędzia do badania
Rab geranylogeranylotransferazy”**

I. Ocena dorobku naukowego i dydaktycznego

Na całkowity dorobek naukowy habilitantki, od uzyskania stopnia magistra inżyniera w 2001 r. do chwili obecnej, składa się 21 artykułów naukowych w czasopismach znajdujących się na liście filadelfijskiej (w tym po doktoracie 17) oraz 1 jeden rozdział w angielskojęzycznej monografii książkowej. Jej prace były cytowane dotychczas 300 razy (bez autocytowań) - zgodnie z bazą danych Web of Science, a indeks Hirscha wynosi 10. O jakości czasopism, w których publikuje dr Katarzyna M. BŁAŻEWSKA świadczy sumaryczny Impact Factor ponad 81, prac wchodzących w skład rozprawy ponad 39,5. Wszystkie prace opublikowane zostały w anglojęzycznych, międzynarodowych czasopismach naukowych, a te wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej opublikowane zostały w *Synthesis*, *Bioconjugate Chemistry*, *Organic & Biomolecular Chemistry*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, *Journal of Organic Chemistry*, *Chemical Communications*, *Journal of Medicinal Chemistry*, oraz *Journal of Biological Chemistry*.

Do rozprawy habilitacyjnej dr BŁAŻEWSKA wybrała 10 (IF 0,56 – 6,17) z 17 opublikowanych po doktoracie publikacji. W 2 z nich jest pierwszym autorem, w 4 jest autorem korespondującym, a w jednej jedynym autorem. Cykl składa się z 9 prac oryginalnych i jednej przeglądowej.

Udział Habilitantki w przygotowaniu publikacji współautorskich był albo zasadniczy albo tam, gdzie nie jest ona autorem korespondującym, był znaczący. W przedstawionym do oceny materiale został precyzyjnie określony i potwierdzony oświadczeniami współautorów. Reasumując, nie mam wątpliwości, co do pozycji pani dr BŁAŻEWSKIEJ w przedstawionym dla uzyskania stopnia doktora habilitowanego monotematycznym cyklu prac.

Habilitantka studiowała chemię na Politechnice Łódzkiej. Stopień doktora nauk chemicznych, z wyróżnieniem, uzyskała w 2006 roku na podstawie rozprawy doktorskiej p.t. „*Nowe zastosowania preparatywne estrów kwasów 1-(izotiocyjaniano)alkilofosfonowych*” wykonanej pod kierunkiem pana prof. dr. hab. Tadeusza GAJDY, na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Zaraz po obronie pracy doktorskiej wyjechała na trzyletni staż podoktorski na Uniwersytet Południowej Kalifornii, do laboratorium prof. Charlesa McKenny).

Dr inż. Katarzyna M. BŁAŻEWSKA była kierownikiem czterech projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, projektu finansowanego przez Polsko-Amerykańską Komisję Fulbrighta, wykonawcą bądź głównym wykonawcą projektów finansowanych także przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, National Institute of Health, oraz Procter & Gamble Pharmaceuticals.

Rezultatem współpracy habilitantki z ośrodkiem amerykańskim (laboratorium prof. Charlesa McKenny) było opracowanie inhibitorów Rab geranylogeranylotransferazy (Rab GGT-aza, RGGT), która odpowiada za post-translacyjną modyfikację białek Rab. GTP-azy Rab oddziałują z GTP (lub GDP, zależnie od formy aktywnej lub nieaktywnej), regulując aktywność ścieżki sygnałowej w wewnątrzkomórkowym transporcie pęcherzykowym. Poznanie nowych inhibitorów białek klasy Rab stwarza możliwość opracowania nowych leków dla chorób związanych z transportem pęcherzykowym, m.in. chorób neurologicznych, immunologicznych czy nowotworowych. Dr BŁAŻEWSKA w trakcie swojego stażu podoktorskiego znalazła się, jako chemik, w zespole zaangażowanym w opracowanie nowych inhibitorów białek odpowiedzialnych za modyfikację GTP-az Rab za pomocą łańcuchów geranylogeranylowych. Mogła zdyskontować swoje doświadczenie w chemii kwasów fosfonowych zdobyte podczas przygotowywania swojej rozprawy doktorskiej na Politechnice Łódzkiej pod kierunkiem prof. dr. hab. Tadeusza GAJDY. Uzyskane w czasie stażu wyniki, pogłębione oraz istotnie uzupełnione o dalsze badania po powrocie z USA do Polski, stanowią trzon ocenianego osiągnięcia habilitacyjnego.

Jej działalność naukowa po powrocie ze stażu podoktorskiego nie traci impetu. I znów, znajduje to odzwierciedlenie w jej zaangażowaniu w organizację konferencji krajowych i międzynarodowych. Była przewodniczącą komitetu organizacyjnego międzynarodowej konferencji „*Chemical Probes: Exploring Avenues for Protein Investigation*”, a także jest zaangażowana w programie COST związanym m.in. z opracowaniem narzędzi chemicznych dla proteomiki i poszukiwania celów terapeutycznych dla nowych leków. Dr BŁAŻEWSKA prowadzi rozległą współpracę krajową i zagraniczną.

Dr Katarzyna M. BŁAŻEWSKA brała udział w licznych konferencjach naukowych, krajowych i zagranicznych. Jej dorobek jest w tym zakresie godny zauważenia, ponieważ obejmuje aż 28 pozycji. Jest współautorką 11 publikowanych doniesień konferencyjnych. Ponadto Habilitantka wygłosiła 7 referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych oraz seminariach na zaproszenie.

Działalność dydaktyczna Habilitantki obejmuje przygotowanie programu wykładów, ćwiczeń audytoryjnych i zajęć laboratoryjnych, oraz prowadzenie prac dyplomowych i opiekę nad doktorantami. Opracowała program zajęć i wykłady pt.: „*Chemia organiczna*” dla studentów 1 stopnia studiów Wydziału Chemicznego na kierunku Chemia budowlana Politechniki Łódzkiej, a także pt.: „*Organiczna chemia techniczna*” dla studentów 1 stopnia studiów na kierunku Towaroznawstwo. Opracowała także wykład „*Prodrugs - are they to become „magic bullet” of XXI century medicine?*” dla studentów 3 stopnia studiów na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej w ramach zajęć prowadzonych w języku angielskim.

Pani dr inż. Katarzyna M. BŁAŻEWSKA opracowała programy ćwiczeń laboratoryjnych: dla studentów 1 stopnia z zakresu „*Chemia medyczna*”, oraz dla studentów 2 stopnia studiów z obszarów: „*Identyfikacja związków naturalnych*” i „*Organic and Polymer Chemistry*”.

Dr BŁAŻEWSKA była w latach 2010-2015 opiekunem 6 magisterskich, 9 inżynierskich latach 2010-2016, a także opiekowała się dwojgiem studentów, w ramach programu National

Science Foundation na Uniwersytecie Południowej Kalifornii, w latach 2007-2008. Dr BŁAŻEWSKA jest także opiekunem naukowym czworga doktorantów, przy czym pełni rolę promotora pomocniczego w jednym przewodzie doktorskim.

Habilitantka angażuje się również w działalność popularyzująca naukę. Przygotowała wykłady na temat wysokoprzepustowych technik analitycznych opartych o analizę w mikrokroplach i przedstawiła to nowoczesne podejście analityczne, zarówno pracownikom naukowym Instytutu Chemii Politechniki Łódzkiej, jak i członkom Studenckiego Koła Chemików PŁ, oraz uczestnikom łódzkiego Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki. Takie szerokie i zróżnicowane grupy słuchaczy wymagają od prezentującego rzeczywiście znacznych umiejętności i talentów popularyzatorskich. Za działalność popularyzującą naukę w jej dzisiejszym interdyscyplinarnym zakresie można też uznać wygłoszenie wykładu w ramach seminarium Instytutu Chemii PŁ „Z pogranicza chemii i biologii - wybrane strategie poznawania białek“. Swoje umiejętności organizacyjne zaprezentowała biorąc udział w pracach Komitetu Organizacyjnego VII Sesji Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików w bieżącym roku. Wymienione wystąpienia nie wyczerpują dorobku dr BŁAŻEWSKIEJ jako wykładowcy i organizatora życia naukowego, ale stanowią dobry prognostyk dla przyszłego zaangażowania Habilitantki w życiu naukowo-dydaktycznym uczelni i środowiska naukowego.

A zatem również na polu dydaktyczno-organizacyjnym Habilitantka legitymuje się dobrym dorobkiem i jest przygotowana do prowadzenia samodzielnej działalności.

Dr BŁAŻEWSKA bierze udział w recenzowaniu publikacji w renomowanych czasopismach naukowych, a także uczestniczyła w pracach zespołów eksperckich i konkursowych. Dowodzi to, że jest dostrzegana w środowisku naukowym zarówno krajowym, jak i międzynarodowym. Świadczy o tym również jej zaangażowanie w liczne współprace krajowe i zagraniczne.

Za swoją działalność dr BŁAŻEWSKA była nagradzana, od wyróżnienia jej rozprawy doktorskiej, poprzez nagrody Rektora Politechniki Łódzkiej (trzykrotnie), czy liczne nagrody stypendialne, Ministra Edukacji, Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, czy stypendia konferencyjne.

II. Ocena pracy habilitacyjnej

II.1. Ocena zgodności z wymogami formalnymi

Przedstawiony do oceny materiał spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane pracom habilitacyjnym.

II.2. Zakres i wartość merytoryczna rozprawy

Tematyka badań syntezy i chemii kwasów fosfonowych jest realizowana w Instytucie Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej od wielu lat. Ma ona bardzo duże znaczenia zarówno dla rozwoju metodologii syntezy chemicznej związków fosforu, jak również ze względu na potencjalne zastosowania związków fosforoorganicznych w medycynie.

Poszukiwania i badania inhibitorów Rab geranylogeranylotransferazy znajdują swój szczęśliwy początek w rozpoznaniu podobieństwa procesów biochemicznych syntezy i transferu reszt izoprenoidowych (prenylacji) – geranylowych i farnesylowych. Inhibitory

syntazy pirofosforanu farnezyli (FPPS), badane są od szeregu lat ze względu na ich znaczenie dla poznania procesów tworzenia, czy degradacji kości, np. w procesach chorobowych takich, jak osteoporoza. Wśród znanych inhibitorów syntazy difosforanu farnezyli (FPPS) znajdują się pochodne metylenobisfosfonowe (bisfosfonianowe). Postawiona została hipoteza, podczas badań zależności struktura-aktywność (SAR), że zastąpienie w bisfosfonianach jednej grupy fosfonowej grupą karboksylową może zmienić cel enzymatyczny takiej nowej klasy związków i inhibicji ulegnie inny enzym, transferaza geranylogeranylowa dla białka Rab (RGGT), zamiast enzymu FPPS. Okazała się ona słuszna.

Celem badań Habilitantki stało się projektowanie i synteza nowych kwasów fosfonokarboksylowych jako potencjalnych inhibitorów RGGT. Cykl tych prac rozpoczyna publikacja nt. inhibicji etapu dołączenia drugiej reszty geranylowej przez transferazę geranylogeranylową do białka Rab przez pochodne fosfonokarboksylowe (*załącznik H10*, Baron, R.A., Tavare, R., Figueiredo, A.C., **Błażewska, K.M.**, Kashemirov, B.A., McKenna, C.E., Ebetino, F.H., Taylor, A., Rogers, Mi.J., Coxon, F.P., et al. (2009) Phosphonocarboxylates Inhibit the Second Geranylgeranyl Addition by Rab Geranylgeranyl Transferase. *J. Biol. Chem.*, 284, 6861–6868). Szczegóły dotyczące syntezy pochodnych nowych kwasów fosfonokarboksylowych zostały zawarte w publikacji w *J. Med. Chem.* w 2010 roku (*załącznik H9*).

Do otrzymania pochodnych fosfonokarboksylowych wykorzystano aż sześć różnych szlaków syntetycznych. W syntezie kwasów fosfonokarboksylowych zastosowano wiele strategii opartych na tworzeniu wiązania z centralnym atomem C- α . Zastosowana została reakcja α -ketoestrów z fosfonianem dietylu, reakcja alkilowania, fluorowania, reakcja Arbuzowa, karboksylowania oraz reakcja Michaela. Tak więc bardzo dobre opanowanie metod chemii fosforu pozwoliło optymalizować drogę syntezy indywidualnie, w zależności od struktury docelowego inhibitora fosfonokarboksylowego (*załącznik H7*).

Było to szczególnie ważne ze względu na różny charakter podstawników przy atomie C- α , który stanowi, w przypadku badanych pochodnych fosfonokarboksylowych, centrum chiralne. O znaczeniu tego aspektu świadczy np. stwierdzenie ponad 50-krotnie wyższej aktywności enancjomeru (*S*) niż (*R*) kwasu 2-hydroksy-3-imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-ylo-2-fosfonopropionowego, będącego analogiem karboksylowym kwasu minodronowego, ważnego inhibitora FPPS (*załącznik H9*).

Inną ciekawą kwestią związaną z chiralnością pochodnych fosfonokarboksylowych jest zaobserwowana łatwość tworzenia, przez czysty enancjomer kwasu 2-hydroksy-3-imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-ylo-2-fosfonopropionowego, trwałego kompleksu z borem. Źródłem boru okazało się borokrzemowe szkło laboratoryjne! Te nieoczekiwane obserwacje zostały potwierdzone za pomocą wnikliwej analizy HPLC, widm NMR, analiz za pomocą spektrometrii mas i krystalograficznych (*załącznik H8*).

Bardzo interesująca jest publikacja dr BŁAŻEWSKIEJ poświęcona ustaleniu mechanizmu tzw. reakcji McKenny. Reakcja ta, znana od ponad 25 lat (1977), umożliwia hydrolizę estrów kwasów fosfonowych, wykorzystując bromek trimetylosililu do utworzenia pośrednich estrów trimetylosililowych. Habilitantka, w elegancki sposób, wykorzystwała substraty selektywnie znakowane izotopami tlenu ^{17}O i ^{18}O i jednoznacznie potwierdziła poprawność mechanizmu reakcji postulowanego przez McKennę. Dr BŁAŻEWSKA wykorzystwała do tego celu spektroskopię ^{17}O i ^{31}P NMR (*załącznik H6*).

Pochodne α -fluorofosfonokarboksyłowe zostały otrzymane, już po powrocie do Polski (załączniki H4 i H5) i opisane w publikacjach, w których dr BŁAŻEWSKA jest autorem korespondującym. W drugiej z tych prac (załącznik H4) zawarta jest pogłębiona analiza widm ^{19}F NMR i obserwacja drugorzędowych wzorów sprzęgania dla badanych trialkilowych estrów kwasów α -fluorofosfonokarboksyłowych.

Kolejnym ważnym aspektem syntezy fosfonokarboksyłowych inhibitorów RGGT było podjęcie badań syntetycznych dla otrzymania form pro-leków tych inhibitorów. Badania pro-leków są szczególnie istotne dla zastosowania inhibitorów w terapii. W tym przypadku mowa o potencjalnych zastosowaniach w leczeniu osteoporozy. Pro-leki mogą m.in. ułatwiać przyswajanie leków, czy też poprawiać ich biokompatybilność, czy trwałość *in vivo*. Zespół dr BŁAŻEWSKIEJ na Politechnice Łódzkiej podjął ambitne zadanie syntezy pro-leków w postaci fosfonowych estrów bisacyloksyalkilowych. Badano m.in. estry bis(piwaloksymetylowe) (POM) i bis(izopropyloksykarbonyloksymetylowe) (POC) (załącznik H3). Publikacja dotycząca strategii pro-leków jest bardzo interesująca i dobrze ilustruje umiejętności Habilitantki skutecznego podejmowania ważnych problemów chemii medycznej.

Jeszcze jedno zagadnienie, istotne dla poznania biologicznych właściwości inhibitorów RGGT, dotyczy opracowana syntezy znakowanych fluorescencyjnie pochodnych inhibitorów fosfonokarboksyłowych. Tym razem, w tej interesującej i ważnej publikacji, Habilitantka legitymuje się swoją polską afiliacją, oprócz amerykańskiej. Odzwierciedla to dobrze pozycję naukową, jaką dr BŁAŻEWSKA osiągnęła w zespole badaczy fosfonokarboksyłowych inhibitorów RGGT (załącznik H2, praca opublikowana w 2016 roku). W publikacji opisano opracowane syntezy kilku wariantów fluorescencyjnych badanych inhibitorów i zastosowanie uzyskanych biokoniuugatów o właściwościach fluorescencyjnych w badaniach *in vivo*. Wyniki badań na zwierzętach doświadczalnych mogą stanowić część wstępną dla badań przedklinicznych tych potencjalnych leków antyosteoporotycznych.

Na zakończenie przywołam pracę przeglądową dotyczącą wariantu azotowego reakcji addycji Michaela, którą dr BŁAŻEWSKA, wraz współpracownikami z Politechniki Łódzkiej obublikowała w *Synthesis* (załącznik H1). Ta ciekawa i obszerna praca dotyczy ważnej reakcji chemicznej o bardzo szerokim spektrum zastosowań. Podjęcie tej kwestii wynika z dotychczasowych zainteresowań Habilitantki. Z pewnością sam przegląd zyska zainteresowanie chemików organików, a jednocześnie będzie dobrym punktem wyjścia dla dalszych badań dr BŁAŻEWSKIEJ i jej zespołu.

W świetle przedstawionej analizy dorobku naukowego i zawodowego oraz oceny rozprawy habilitacyjnej można stwierdzić, że dr inż. Katarzyna M. BŁAŻEWSKA jest dojrzałym badaczem legitymującym się znaczącym dorobkiem naukowym i uznanym specjalistą w zakresie chemii kwasów fosfonowych.

Podsumowując, omówione wyżej prace dr inż. Katarzyny M. BŁAŻEWSKIEJ wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej wniosły oryginalny i znaczący wkład w rozwój metod chemii kwasów fosfonowych i poznanie właściwości fosfonowych inhibitorów Rab geranylogeranylotransferazy. Pod względem merytorycznym spełniają wymogi stawiane rozprawom habilitacyjnym.

III. Ocena formy prac

Praca przedstawiona została w postaci zestawu dokumentów, 10 oryginalnych publikacji doświadczalnych. Ponadto dokumentacja obejmuje wniosek, dane kontaktowe, autoreferat w języku polskim i angielskim, kopię dyplomu doktorskiego, oświadczenie Habilitantki o udziale w pracach stanowiących podstawę habilitacji, oświadczenia współautorów oraz wyciąg z bazy *Web of Knowledge* cytowań Habilitantki na dzień 24.06.2016.

Przedstawiona dokumentacja jest prawidłowa i w pełni wystarczająca do przeprowadzenia oceny przedłożonej rozprawy habilitacyjnej.

IV. Wniosek końcowy

Na podstawie dokonanej oceny dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej, mam zaszczyt przedstawić Radzie Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej mój wniosek o dopuszczenie dr inż. Katarzyna M. BŁAŻEWSKIEJ do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego zgodnie z trybem przewidzianym w art. 18a ustawy z dnia 18 marca 2011 r. (Dziennik Ustaw Nr 84, poz. 455) o zmianie ustawy „*Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz o zmianie niektórych innych ustaw*”.



Prof. dr hab. Wojciech T. Markiewicz

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polska Akademia Nauk

Noskowskiego 12, 61704 Poznań

T 61 8528503 wew. 180, F 61 8520532

e-mail: Wojciech.Markiewicz@ibch.poznan.pl