



prof. dr hab. Grzegorz Dubin

ul. Gronostajowa 7a, 30-387 Kraków

Telefon: (+48) 664-143-130

e-mail: grzegorz.dubin@uj.edu.pl

## **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Tomasza Janiszewskiego, pt. „Monitorowanie Aktywności granzymu B w układach biologicznych przy zastosowaniu nowych narzędzi chemicznych”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje analizę specyficzności substratowej ludzkiego granzymu B (GrB), wykorzystanie pozyskanej informacji do otrzymania markerów aktywności GrB oraz wskazanie przykładowego zastosowania tych markerów do monitorowania aktywności GrB podczas rozpoznania komórek nowotworowych przez komórki o fenotypie komórek NK. Nowatorski charakter nadaje pracy zastosowanie do konstrukcji substratów i markerów aminokwasów nie kodowanych w kodzie genetycznym, co pozwoliło na uzyskanie markerów o specyficzności przewyższającej specyficzność markerów zawierających jedynie aminokwasy białkowe.

Praca została przygotowana w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania, Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. Marcina Drąga i promotora pomocniczego dr inż. Pauliny Kasperkiewicz-Wasilewskiej.

Przedstawione badania stanowią kontynuację tematyki analizowanej w grupie badawczej promotora rozprawy jeśli chodzi o warsztat z zakresu chemii kombinatorycznej peptydów, selekcji substratów i przekształcania ich w sondy chemiczne. Są one jednocześnie twórczym rozwinięciem zarówno w zakresie badań nowego enzymu jak i metodologii stosowanej przez autora pracy w analizie interesującego układu biologicznego.

Komórki NK (ang. Natural Killer cells) stanowią istotny komponent układu odpornościowego. Zabijanie komórek docelowych przez komórki NK jest mediowane m.in. przez sekrecyjne białka: granzymy we współdziałaniu z perforynami. Mechanizmy te, choć szeroko badane, wciąż kryją wiele pytań i niewiadomych. Stąd zapotrzebowanie na nowe metody badawcze, w tym na sposoby śledzenia aktywności granzymów w czasie rzeczywistym. Niniejsza praca odpowiada na powyższą potrzebę poprzez dostarczenie selektywnych sond molekularnych umożliwiających wykrywanie aktywności proteolitycznej granzymu B. Kluczową kwestią jest tutaj selektywność, gdyż inne enzymy proteolityczne, obecne w komórkach docelowych w stężeniach często większych od granzymu B nie mogą wchodzić w reakcję z sondami chemicznymi jeśli wykorzystanie tych ostatnich ma prowadzić do uzyskania istotnych naukowo danych. Klasyczne substraty peptydowe oparte o aminokwasy białkowe i pozyskane na ich podstawie sondy nie zapewniają odpowiedniej specyficzności. Autor przyjmuje założenie, iż rozszerzenie spektrum aminokwasów wykorzystywanych do profilowania specyficzności substratowej pozwoli na selekcję bardziej selektywnych substratów, a następnie, stworzenie na ich podstawie bardziej selektywnych sond. W dużej mierze, założenia te są zweryfikowane w przedstawionych badaniach. Autor uzyskuje sondy na tyle aktywne i specyficzne, że umożliwiają one śledzenie aktywności proteolitycznej granzymu B w układzie biologicznym modelującym atak komórki NK na komórkę nowotworową, przynajmniej przy zastosowaniu wybranych modeli komórek NK.

Jako mocne strony niniejszej rozprawy uważam przede wszystkim następujące aspekty:

- (i) Klarowny opis, zarówno w zakresie wstępu teoretycznego jak i opisu większej części wyników, ich interpretacji oraz części metodologicznej. Opisy zawierają esencję stanu wiedzy i przeprowadzonych prac, bez nadmiernych szczegółów i skrótów (poza wyjątkami opisanymi poniżej). Praca napisana jest lekkim językiem i ilustrowana starannym, czytelnym materiałem graficznym.
- (ii) bardzo ciekawe i elegancko przeprowadzone badania w zakresie specyficzności substratowej GrB na obszernych bibliotekach substratów zawierających aminokwasy niebiałkowe
- (iii) jasno przeprowadzone i przedstawione wybory w zakresie przekształcenia optymalnych substratów w sondy molekularne
- (iv) co najciekawsze z całej pracy – wykazanie, iż otrzymane sondy molekularne w rzeczywistości nadają się do monitorowania aktywności GrB w skomplikowanym układzie biologicznym (w komórce zawierającej dziesiątki innych enzymów proteolitycznych).

Za słabe strony pracy uważam:

- (i) Praca zawiera znaczącą liczbę różnorodnych drobnych błędów i niedociągnięć a nawet pewne nieprawdziwe stwierdzenia i interpretacje. Nie wpływa to wprawdzie znacząco na ogólny przekaz merytoryczny, jest jednak irytujące i niepotrzebnie odrywa uwagę czytelnika od istotnych kwestii opisanych w pracy. Wielka szkoda, że autor nie poświęcił jeszcze kilku dni na skorygowanie tych błędów co w sposób znaczący poprawiłoby odbiór pracy.
- (ii) O ile pierwsza część pracy związana z profilowaniem jest przeprowadzona bardzo szeroko, dalsze części nie wykorzystują w pełni potencjału stworzonego na etapie profilowania. Do konstrukcji inhibitorów i sond autor wykorzystuje jedynie wybrane reszty określone podczas profilowania, podczas gdy szereg innych reszt, zapewniających wprawdzie trochę niższą aktywność, mogłoby jednak potencjalnie zapewnić jeszcze większą specyficzność. W pracy są one jednak arbitralnie odrzucone. Co ważniejsze, pomimo szeroko opisywanej i w rzeczywistości niezwykle istotnej kwestii specyficzności – w schemacie selekcji szkieletu inhibitora nie uwzględniono tej istotnej kwestii. Selekcja szkieletu bazuje jedynie na aktywności względem GrB, nie jest w nią jednak włączona negatywna selekcja względem innych enzymów proteolitycznych w szczególności kaspaz. Autor prześlizguje się nad tym tematem zarówno w warstwie opisowej jak i eksperymentalnej. Ostatecznie wyselekcjonowany szkielet jest wprawdzie stosunkowo selektywny względem GrB, jednak jest to wynikiem bardziej przypadku niż systematycznej selekcji odpowiednich reszt zarówno w kierunku maksymalizacji aktywności w kierunku GrB i jednoczesnej minimalizacji aktywności względem innych enzymów.
- (iii) W rozdziale 3.8.3, kluczowym rozdziale dotyczącym wyników znajduje się życzeniowe stwierdzenie dotyczące selektywności sondy qTJ71 które nie jest poparte danymi eksperymentalnymi. Autor stwierdza „Wyniki badań ukazały, że marker chemiczny qTJ71 jest hydrolizowany wyłącznie przez GrB...” i dalej „... w próbkach inkubowanych z kaspazami, nie zanotowano żadnego sygnału fluorescencyjnego...” co jest w sprzeczności z danymi przedstawionym na rysunku 35B, gdzie kaspaza 6 wykazuje wyraźną aktywność względem qTJ71, czego zresztą należało się spodziewać po wynikach przedstawionych wcześniej na rysunku 32. Sukces w badaniach biologicznych jest bardzo rzadko zero-jedynkowy. Pokusa takiej interpretacji nie powinna stać w sprzeczności z danymi eksperymentalnymi.
- (iv) Ostatni rozdział pracy, choć najciekawszy pod względem merytorycznym jest niestety najslabiej opracowanym edytorsko rozdziałem pracy. Opis jest zdawkowy, implikuje sukces eksperymentu, jednak przesłanki do takiego stwierdzenia są słabo opisane i zilustrowane grafiką. Nie wiadomo co oznaczają strzałki na kluczowym rysunku 38, które komórki są komórkami YT a które MDA, na części rysunku brak oznaczenia czasów inkubacji, nie jest jasne dlaczego

niektóre komórki barwią się barwnikiem Hoechst a inne nie. Czy barwienie SytoxBlue już w czasie 0 oznacza że część komórek jest już martwych? – jak to miałyby się jednak do barwienia SytoxGreen. Prosiłbym by podczas obrony pracy autor ponownie przedstawił te kwestie opisując szczegółowo przeprowadzony eksperyment i ilustrując go szczegółowym materiałem graficznym potwierdzającym tezę o transferze GrB od komórek YT do komórek MDA.

Odnosząc się do uwagi (ii) słabych stron pracy w szerszym kontekście, chciałbym by autor poddał podczas obrony pod dyskusję następujące zagadnienie – czy dziedzina sond molekularnych umożliwiających śledzenie aktywności enzymów proteolitycznych dojrzała już do zastosowania pełnego wachlarza osiągnięć chemii medycznej stosowanego z powodzeniem do selekcji specyficznych inhibitorów/sond dla innych klas enzymów? Nakładanie się specyficzności homologicznych enzymów względem syntetycznych substratów / inhibitorów jest problemem znanym (m.in. kinazy) i po części rozwiązywalnym przez szerokie testowanie i równoległą selekcję pozytywną i negatywną podczas opracowywania narzędzi chemicznych. Od lat wiadomo iż w przypadku enzymów proteolitycznych elementem ograniczającym badania jest brak specyficzności sond peptydowych związany z nakładającą się specyficznością substratową. Dla proteinaz nie są jednak dostępne (a przynajmniej nie są szeroko stosowane) panele analogiczne do paneli kinazowych. Każdy liczący się inhibitor kinaz przechodzi profilowanie względem panelu setek tych enzymów i jest to działanie w zasadzie rutynowe. Metodologia stosowana w pracy w połączeniu z negatywną selekcją dla panelu proteinaz byłaby idealnym rozwiązaniem problemu specyficzności które to rozwiązanie nie jest jednak stosowane ani w tej pracy ani innych badaniach (przynajmniej na szeroką skalę). Jakie są tego powody? Poza oczywiście komplikacją eksperymentalno-organizacyjną, która jednak powinna już znaleźć swoje rozwiązanie podczas szeregu lat prac wielu laboratoriów nad charakterystyką tej klasy enzymów. A może właśnie czeka na implementację w przyszłych pracach autora lub grupy badawczej?

Podsumowując, pomimo kilku krytycznych uwag, pracę uważam za bardzo dobrą, zarówno pod względem oceny wartości uzyskanych wyników jak i ich przedstawienia, choć zupełnie niepotrzebnie praca jest pełna różnorodnych drobnych błędów, które można byłoby łatwo wyeliminować, tym samym znacząco polepszając odbiór pracy.

**Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Tomasza Janiszewskiego spełnia wszelkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa i normami zwyczajowymi. Według mojej oceny dorobek naukowy kandydata oraz przedstawiona rozprawa uzasadniają nadanie mu stopnia naukowego doktora. Dlatego wnoszę o dopuszczenie pana mgr inż. Tomasza Janiszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



prof. dr hab. Grzegorz Dubin  
Kierownik Grupy Badawczej  
Krystalografii Białek MCB UJ