



UNIVERSITY
OF WARSAW

Faculty of Physics
Institute of Experimental Physics

Warszawa, 08.01.2021

Dr hab. Joanna Kowalska
Uniwersytet Warszawski
Wydział Fizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej, Zakład Biofizyki
Ul. Pasteura 5, 02-093 Warszawa
Tel.: +48 22 55 43 774
e-mail: jkowalska@fuw.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. TOMASZA JANISZEWSKIEGO PT. „MONITOROWANIE AKTYWNOŚCI GRANZYMU B W UKŁADACH BIOLOGICZNYCH PRZY UŻYCIU NOWYCH NARZĘDZI CHEMICZNYCH”

Proteazy to bardzo liczna grupa enzymów hydrolitycznych odpowiadająca za regulację aktywności oraz degradację białek w organizmie. Enzymy te odgrywają kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych takich jak odżywianie organizmu, regulacja hormonalna, generowanie stanów zapalnych i odpowiedzi immunologicznej, programowana śmierć komórki i wiele innych. Nieprawidłowe działanie proteaz może mieć bardzo poważne konsekwencje dla organizmu, czego potwierdzeniem jest wiele doniesień wiążących zaburzenia aktywności proteaz z nowotworzeniem, chorobami neurologicznymi, czy chorobami związanymi z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu immunologicznego. Badania enzymów z grupy proteaz są więc niezwykle ważne z punktu widzenia zrozumienia wymienionych procesów na poziomie molekularnym i komórkowym, a co więcej, mogą przyczynić się do identyfikacji nowych celów molekularnych i opracowywania nowych strategii terapeutycznych w leczeniu nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych oraz innych schorzeń. Tradycyjne podejście do badania białek o aktywności enzymatycznej metodami chemii medycznej i bioorganicznej obejmuje przede wszystkim charakteryzację białek rekombinowanych, otrzymywanych w wyniku ekspresji i oczyszczania w systemach bakterii lub komórkowych. Oczyszczone białka wykorzystuje się w funkcjonalnych i strukturalnych badaniach *in vitro* (czyli prowadzonych „w probówce”) nakierowanych na ustalenie struktury przestrzennej, specyficzności substratowej, poszukiwaniu partnerów białkowych oraz naturalnych lub syntetycznych inhibitorów. Coraz częściej zwraca się jednak uwagę na to, że takie podejście nie zawsze umożliwia uwzględnienie bardzo ważnych aspektów badanych procesów takich jak dynamika i regulacja procesów komórkowych w czasie i przestrzeni, zatłoczenie molekularne, występowanie różnych wariantów modyfikacji post-translacyjnych danego białka w różnych typach komórek, czy – w kontekście poszukiwań inhibitorów o potencjale terapeutycznym – specyficzność względem innych białek obecnych w danym typie komórek. Dlatego też coraz większym zainteresowaniem cieszą się metody i narzędzia chemii biologicznej, które umożliwiają selektywne monitorowanie w żywych komórkach procesów będących obiektem zainteresowania badacza. Badania opisane w przedstawionej mi do recenzji rozprawie Pana mgr inż. Tomasza Janiszewskiego, wykonanej pod kierunkiem prof. Marcina Drąga oraz dr Pauliny Kasperkiewicz, doskonale wpisują się w ten niezwykle aktualny nurt badań. Celem rozprawy było opracowanie peptydowych narzędzi molekularnych

umożliwiających selektywną inhibicję, detekcję oraz monitorowanie aktywności granzymu B w żywych komórkach. Granzym B (GrB) jest proteazą serynową występującą przede wszystkim w komórkach NK (Natural Killer cells), które są komórkami immunologicznymi odpowiedzialnymi za nieswoistą odpowiedź immunologiczną przeciw komórkom nowotworowym. GrB jako proteaza „wysyłana” przez komórki NK do komórek docelowych i aktywująca w nich kaspazy (proteazy indukujące apoptozę), jest istotnym czynnikiem bezpośrednio odpowiedzialnym za cytotoksyczność komórek NK. Mimo wielu opublikowanych w literaturze badań nad aktywnością GrB, w momencie rozpoczęcia badań przedstawionych w rozprawie, nie istniały narzędzia molekularne umożliwiające selektywne śledzenie i modulowanie aktywności GrB w żywych komórkach.

Praca doktorska liczy 152 strony i ma klasyczny dla prac eksperymentalnych układ, obejmujący wstęp teoretyczny, badania własne, część eksperymentalną oraz spis literatury. Dodatkowo w pracy wyodrębniono następujące krótkie rozdziały: założenia i cele pracy, wnioski i dyskusja, najważniejsze osiągnięcia w pracy, a na końcu wykaz skrótów, załącznik ze strukturami wykorzystanych w badaniach aminokwasów oraz listę publikacji i prezentacji konferencyjnych wchodzących w skład dorobku autora. W pracy znalazło się 41 rysunków oraz 9 tabel, starannie wykonanych pod względem edytorskim, które są bardzo pomocne w zrozumieniu przedstawianych zagadnień i opisywanych eksperymentów. W pracy zacytowano 142 referencji, w tym najbardziej aktualnych prac odnoszących się do realizowanej w pracy tematyki badawczej. Reasumując, praca jest odpowiednio skonstruowana i dobrze dopracowana pod względem edytorskim. Przedmiotem mojej oceny są następujące elementy Rozprawy: a) ogólna wiedza Kandydata w uprawianej dziedzinie naukowej, b) umiejętność prowadzenia badań naukowych, c) oryginalność rozwiązanego problemu naukowego.

Ogólną wiedzę Autora można ocenić na podstawie informacji zawartych we wstępie teoretycznym. W części tej, liczącej 42 strony, Autor rozprawy w sposób zwięzły przekazuje aktualny stan wiedzy na temat proteaz, w szczególności granzymów, a następnie różnych metod i typów narzędzi molekularnych wykorzystywanych do ich badania. W rozdziałach tych Autor w bardzo przystępny sposób naświetla aktualny stan wiedzy w dziedzinie, a także przybliży wszystkie zagadnienia niezbędne do zrozumienia założeń, celów i sposobu realizacji pracy. W szczególności niezwykle pomocny w zrozumieniu mechanizmu działania projektowanych przez Autora pracy narzędzi, był rozdział 1.3. (Markery chemiczne dla proteaz), w którym to Autor precyzyjnie wyjaśnia zasady działania różnego rodzaju narzędzi molekularnych (w pracy często nazywanych markerami) stosowanych w badaniu proteaz, wskazując zarówno na ich zalety jak i ograniczenia. Ogólny poziom merytoryczny części teoretycznej rozprawy oceniam wysoko.

Część poświęcona badaniom własnym poprzedzona jest krótko i jasno sformułowanymi założeniami pracy. W części tej dowiadujemy się, że Autor pracy zaplanował szereg kompleksowych badań w celu osiągnięcia założonego celu – począwszy od charakteryzacji specyficzności substratowej granzymu, poprzez syntezę inhibitorów, a na ich bazie elektrofilowych markerów fluorescencyjnych i nienaturalnych substratów

fluorogenicznych, poprzez weryfikację działania tych związków *in vitro*, w lizatach komórkowych, a wreszcie w żywych komórkach. Jest to niezwykle ambitny program, z którym Autor poradził sobie jednak znakomicie. Unikatowym podejściem stosowanym od dawna w badaniach prof. Drąga i dr Kasperkiewicz jest profilowanie specyficzności proteaz z użyciem hybrydowych bibliotek fluorogenicznych peptydów zbudowanych zarówno z naturalnych jak i nienaturalnych aminokwasów. Umożliwia to identyfikację nienaturalnych substratów o znacząco lepszych parametrach kinetycznych w porównaniu do sekwencji naturalnych oraz charakteryzujących się większą selektywnością. Stosując cztery syntetyczne hybrydowe biblioteki peptydów (HyCoSuL) otrzymane wcześniej w zespole Promotorów oraz jedną bibliotekę zsyntezowaną samodzielnie i rekombinowany GrB, Autor pracy ustalił bardzo szczegółowy profil specyficzności substratowej GrB dla tzw. kieszeni S1-S5, czyli wiążących aminokwasy w pozycjach P1-P5 (5 pierwszych reszt licząc od miejsca hydrolizy w kierunku N-końca substratu). Stosując modelowe peptydy Autor ustalił również, że optymalna długość peptydowego substratu dla granzymu B to pentapeptyd, przy czym tetrapeptyd charakteryzował się około dwukrotnie mniejszą aktywnością, natomiast heksapeptyd miały właściwości zbliżone do pentapeptydu. Na podstawie tych badań Autor wytypował kilkanaście sekwencji tetra- i pentapeptydowych złożonych z różnych kombinacji aminokwasów zidentyfikowanych jako optymalne dla danej kieszeni, dokonał ich syntezy, a następnie scharakteryzował ich względną podatność na hydrolizę katalizowaną przez granzym B. Dla najlepszych substratów Autor wyznaczył następnie parametry kinetyczne K_M , k_{cat} oraz k_{cat} / K_M (im większy ten ostatni tym lepiej zoptymalizowany został substrat). Optymalny substrat tetrapeptydowy miał parametr k_{cat} / K_M niż 8-krotnie wyższy niż substrat odniesienia (Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-ACC), a optymalny substrat pentapeptydowy - aż 60-krotnie. Na podstawie tych badań oraz biorąc pod uwagę specyficzność substratową kaspaz (reakcji krzyżowych z którymi Autor chciał uniknąć) jako peptyd wiodący do dalszych badań został wyselekcjonowany pentapeptyd TJ55 (Nva-Ile-Glu-Oic-Asp). W oparciu o tę strukturę wiodącą i zaawansowane metody syntezy organicznej autor zaprojektował trzy rodzaje narzędzi molekularnych do badania GrB:

-inhibitor kowalencyjny z reaktywną resztą elektrofilową (warhead) na C-końcu w postaci reszty difenylofosfonianowej (TJ55i)

-klasyczne markery chemiczne, oparte na strukturze inhibitora kowalencyjnego dodatkowo wyposażonego na N-końcu w znacznik fluorescencyjny (Cy5; TJ55.5) lub znacznik powinowactwa (biotyna, TJ55.Bt). Markery tego typu po związaniu do GrB mają nieodwracalnie tworzyć z wiązanie kowalencyjne z katalityczną resztą seryny znakując w ten sposób białko

-wygaszony marker chemiczny (substrat fluorogeniczny), którego sekwencja została wydłużona o dodatkowe 3 aminokwasy (pozycje P1'-P3'), N-koniec został wyznakowany fluorescencyjnie, a C-koniec zmodyfikowany za pomocą cząsteczki wygaszacza (w tym przypadku oprócz peptydu TJ55 wykorzystano jako alternatywną strukturę wiodącą TJ 49 – Autor w sumie otrzymał 11 peptydów). Markery tego typu mają ulegać hydrolizie przez GrB z uwolnieniem cząsteczki wygaszacza, czemu towarzyszyć ma wzrost fluorescencji umożliwiający monitorowanie aktywności GrB w czasie rzeczywistym.

Otrzymane narzędzia Autor scharakteryzował metodami biochemicznymi stosując białka rekombinowane oraz lizaty komórkowe, wykazując m.in., że związki te działają zasadniczo w oczekiwany sposób, z wysokim

powinowactwem i selektywnie oddziałują z GrB, a przy tym wykazują znikomą lub żadną aktywność wobec kaspaz. W przypadku klasycznych markerów chemicznych Autor zademonstrował również możliwość selektywnego znakowania GrB w lizatach komórek NK. Dla substratów fluorogenicznych Autor wyznaczył natomiast parametry kinetyczne oraz wykazał ich aktywację w komórkach NK metodą cytometrii przepływowej oraz mikroskopii konfokalnej. Zwieńczeniem badań własnych pracy jest eksperyment z zastosowaniem mieszaniny dwóch linii komórkowych (NK oraz MDA-MB – ta ostatnia nie zawiera granzymu B), którego celem była próba monitorowania aktywności enzymu podczas procesu „naturalnego zabijania” komórek. Praca stanowi piękną spójną całość, a końcowe eksperymenty (mimo pewnych niżej wyrażonych zastrzeżeń) doskonale okazują ogromny potencjał opracowanych przez Autora pracy narzędzi i możliwości rozwijania na ich bazie nowych metod badawczych, a dalej metod terapeutycznych i diagnostycznych. Rozprawa wnosi więc istotny wkład w badania nad specyficznością substratową proteaz, a także otwiera nowe horyzonty w badaniach nieswoistej komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Większość wyników będących rezultatem realizacji pracy doktorskiej została już opublikowana w *Journal of Biological Chemistry* (w pracy tej Autor rozprawy jest pierwszym współautorem). Mgr inż. Tomasz Janiszewski uczestniczył również w innych projektach badawczych, co zaowocowało współautorstwem w trzech innych publikacjach, dając bardzo dobry dorobek na tym etapie kariery naukowej.

Obowiązek recenzenta to również wykazanie słabości rozprawy przedstawionej do oceny. Kilka stwierdzeń/wniosków zamieszczonych w rozprawie wzbudziło moje wątpliwości i chciałabym prosić Autora o wyjaśnienie ich podczas publicznej obrony:

- 1) W części literaturowej na str. 16 opis mechanizmu reakcji katalizowanej przez proteazę serynową jest miejscami niejasny. Autor używa m.in. sformułowania „kompleks stanu przejściowego (produkt pośredni)”, co sugeruje, że te pojęcia są synonimiczne, a co nie jest zgodne z prawdą. Proszę przedstawić na obronie ten mechanizm używając poprawnych sformułowań.
- 2) W części badania własne na str. 47 Autor pisze, że do konstrukcji syntetycznej biblioteki modyfikowanej w pozycji P1 zastosował optymalną sekwencję substratu, czyli Ile-Ser-Pro-P1, podczas gdy w części literaturowej (Tabela 2) oraz na późniejszym etapie badań własnych Autor przytacza, że optymalna sekwencja tetrapeptydu złożonego z aminokwasów naturalnych to Ile-Glu-Pro-Asp. Proszę o wyjaśnienie tej rozbieżności.
- 3) Do oceny specyficzności substratowej w miejscu P1 autor wykorzystał bibliotekę, w której tylko pozycja P1 była zmieniana natomiast pozostałe aminokwasy były zdefiniowane (Ile-Ser-Pro-P1), natomiast przy optymalizacji pozostałych miejsc (P2-P5), autor wykorzystał biblioteki hybrydowe, w których niektóre pozycje nieoptymalizowane były podstawione równomolową mieszaniną naturalnych aminokwasów X (np. X-X-P2-Asp). Proszę wyjaśnić, jakie są ogólne wady i zalety tych dwóch podejść do konstruowania bibliotek i czym konkretnie podyktowany był wybór odpowiednich wariantów dla pozycji P1 oraz P2-P5 w przypadku badań przedstawionych w rozprawie.
- 4) W wielu miejscach pracy Autor podkreśla, że przy optymalizacji sekwencji peptydów przywiązywał szczególną uwagę do minimalizacji oddziaływań krzyżowych z kaspazami. W przypadku klasycznych markerów chemicznych Autor postuluje, że zostało to osiągnięte zarówno dzięki doborowi odpowiedniej

sekwencji jak i zastosowaniu grupy difenylofosfoniowej jako warhead, która jest niereaktywna względem proteinaz cysteinowych. Jednakże, analiza przedstawiona na Rys. 35D pokazuje, że klasyczny marker chemiczny TJ55.5 niespecyficycznie wiąże się do wszystkich kaspaz z efektywnością zbliżoną do granzymu B. Proszę wyjaśnić tę (być może pozorną) sprzeczność. Proszę również o komentarz, czy podejmowane były próby zastosowania tego markera w badaniach na liniach komórkowych.

5) Autor w ramach rozprawy wykonał wiele pomiarów kinetycznych dla syntezowanych substratów i inhibitorów enzymatycznych. W każdym przypadku przytoczone są jedynie liczbowe wartości wyznaczonych parametrów, natomiast nie pokazano danych źródłowych (wykresów Michaelisa-Menten), co uniemożliwia ocenę jakości danych i poprawności dopasowania modelu. Bardzo proszę o przedstawienie na obronie dwóch reprezentatywnych wykresów M-M.

6) Eksperyment z użyciem substratu fluorogenicznego qTJ71 komórek NK i MDA-MB przedstawiony na Rys. 38. Po pierwsze, wydaje mi się, że w części B zostały zamienione miejscami panele Hoest z SyntoxBlue, proszę o weryfikację. Ponadto, Autor wielokrotnie używa sformułowania, że GrB został w tym eksperymencie „wyznakowany przez wygaszony marker chemiczny”, podczas gdy związek ten jest substratem enzymu, który nie ma zdolności kowalencyjnego znakowania go, a jedynie umożliwia monitorowanie jego aktywności. Sformułowanie to uważam więc za nie do końca poprawne, tym bardziej, że nie wykonano (a może tylko nie pokazano?) kontrolnego eksperymentu immunohistochemicznego świadczącego o kolokalizacji czerwonej fluorescencji z GrB (marker vs przeciwciała anti-GrB). Wreszcie, Autor postuluje, że obserwowana po ok. 2 h czerwona fluorescencja w komórkach MDA-MB, świadczy o obecności aktywnego GrB w tych komórkach. Mam wątpliwości, czy przedstawiona interpretacja eksperymentu jest jedyną możliwą. Czy możliwe jest np. że fluorescencyjne fragmenty sondy zhydrolizowanej w komórkach NK przedostają się do komórek MDA-MB w wyniku perforacji błony komórek, a nie powstają w wyniku hydrolizy enzymatycznej w komórkach MDA? Czy Autor mógłby zaproponować przykładowy eksperyment, z zastosowaniem swoich narzędzi lub przeciwciał, umożliwiający jednoczesną weryfikację obu hipotez?

7) Część eksperymentalna generalnie nie budzi moich zastrzeżeń. Jedyna uwaga odnosi się do zamieszczonych w pracy widm masowych. Czystość syntezowanych związków została potwierdzona za pomocą analitycznego HPLC, a masa cząsteczkowa została wyznaczona przy użyciu ESI-MS. Autor zamieścił przykładowe widma mas i profile HPLC na końcu pracy. W przypadku widm MS masa obliczona i teoretyczna w każdym przypadku różni się o jedną jednostkę, co zdecydowanie przekracza dopuszczalną rozbieżność w przypadku pomiarów HRMS (5 ppm). Przypuszczam, że może to wynikać z (i) nieprawidłowo obliczonej masy monoizotopowej jonu $[M+H]^+$ lub (ii) nieprawidłowo zinterpretowanego widma MS (źle odczytana masa monoizotopowa). Proszę o wyjaśnienie.

Autor sporadycznie popełnia również drobne błędy stylistyczne, typograficzne oraz stosuje żargon (np. „pozycja primowana/nieprimowana”), co momentami utrudnia zrozumienie przekazu. W niektórych miejscach zrozumienie przekazu utrudnia również brak odpowiednich pomocy graficznych – szczególnie trudno czyta się szczegółowe opisy syntez, którym nie towarzyszy schemat oraz rozważania na temat oddziaływań reszt aminokwasowych w strukturze kompleksów proteaz z peptydami, którym nie towarzyszy

odpowiedni rysunek ukazujący te oddziaływania. Niedociągnięcia te jednak nie wpływają na moją wysoką ocenę wartości merytorycznej pracy.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji praca zawiera bogaty materiał eksperymentalny, opisujący kompleksowe i zakończone sukcesem podejście do opracowania peptydowych narzędzi molekularnych służących do badania granzymu B. Jestem przekonana, że niezwykle precyzyjne narzędzia opracowane w niniejszej pracy, przyczynią się lepszemu zrozumieniu roli proteaz w generowaniu komórkowej odpowiedzi immunologicznej oraz umożliwią na bazie tej wiedzy opracowanie testów diagnostycznych lub narzędzi terapeutycznych. Z całym przekonaniem stwierdzam więc, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska spełnia wszelkie warunki określone w Ustawie i wnioskuje do Komisji ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Tomasza Janiszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Kowalska