



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Mikrobiologii

Dr hab. Joanna Koziel, prof. UJ

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sonii Kołt “Opracowanie nowych markerów chemicznych do badania aktywności wybranych granzymów w komórkach”

Promotor: prof. dr hab. Marcin Drąg

Promotor pomocniczy: dr inż. Paulina Kasperkiewicz-Wasilewska

Enzymy, jako kluczowe komponenty organizmu żywego warunkujące prawidłowy przebieg reakcji metabolicznych, stanowią istotne zagadnienie badawcze. Zwiększenie interdyscyplinarności badań naukowych otworło nowe możliwości analiz reakcji enzymatycznych, a tym samym biologicznych konsekwencji tych procesów. Odkrycia te przyczyniają się do aplikacji klinicznych, w tym wprowadzania nowych leków, czy zmian schematów terapeutycznych. W nurt tych nowoczesnych badań doskonale wpisuje się rozprawa doktorska pani Sonii Kołt, która koncentruje się na proteazach, a konkretnie granzymach. Enzymy te zostały odkryte pod koniec ubiegłego stulecia i wówczas zdefiniowano ich lokalizację określając ją jako specyficzną dla komórek cytotoksycznych. Tym samym przypisano im rolę biologiczną polegającą na uszkodzaniu komórek zainfekowanych lub zmienionych nowotworowo. Najnowsze dane naukowe wskazują, że granzymy mogą pełnić znacznie szerszą niż pierwotnie szacowano rolę, w tym immunomodulacyjną, regulując liczne szlaki procesów śmierci komórkowej, wpływając na przekaz sygnału komórkowego, czy przebudowę tkanek, a tym samym ogrywają rolę w wielu chorobach o podłożu zapalnym. Przedstawiona do oceny praca doktorska prezentuje nowe możliwości identyfikacji granzymów, a zwłaszcza precyzyjnej oceny ich aktywności oraz lokalizacji subkomórkowej, co z pewnością znajdzie niebawem zastosowanie w badaniach nad rolą tych enzymów w fizjologii organizmu ludzkiego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma 151 stron i zawiera wszystkie elementy wymagane dla tego typu prac. Została ona podzielona na dziewięć rozdziałów. Poza wstępem, celem pracy, opisem badań własnych oraz opisem części eksperymentalnej, praca zawiera podsumowanie i wnioski końcowe, rozdział przedstawiający struktury użytych w badaniach aminokwasów, opis dorobku naukowego Doktorantki, informacje o nagrodach i

projektach oraz spis literatury, który obejmuje 217 pozycji literaturowych.

Obszerny wstęp szczegółowo wprowadza czytelnika w tematykę pracy badawczej. Doktorantka zadbała o interdyscyplinarny charakter tego rozdziału opisując wszystkie zagadnienia konieczne do dalszej lektury pracy. Na uwagę zasługuje bardzo dobra konstrukcja tego rozdziału oraz przystępna forma okraszona rysunkami i tabelami, które ułatwiają zrozumienie tekstu i systematyzują przyswajane informacje. Opracowanie tego rozdziału nie było więc łatwym zadaniem, bowiem wymagało od Doktorantki głębokiej wiedzy z różnych dziedzin. Większość wstępu poświęcona została zilustrowaniu klasyfikacji, budowy, mechanizmowi działania i funkcji granzymów, w tym granzymu A (GrA), na tle innych enzymów, ale spora jego część prezentuje przegląd metod, w tym takich, które stosuje się do poszukiwań substratów specyficznych dla reakcji enzymatycznych.

Głównym celem pracy doktorskiej była identyfikacja specyficznych dla GrA sekwencji peptydowych, które mogłyby znaleźć zastosowanie, jako markery aktywności tego enzymu w układach biologicznych. Założenie to zostało zrealizowane w kilku etapach prac polegających na ekspresji rekombinowanego enzymu GrA, precyzyjnym zdefiniowaniu specyficzności substratowej tego enzymu z zastosowaniem m.in. biblioteki substratów fluorogenicznych, zaprojektowaniu substratu i inhibitora dla GrA oraz weryfikację działania tych narzędzi w systemach biologicznych.

W rozdziale „Badania własne” pani Kołt przedstawiła wyniki swoich badań, które są bardzo wartościowe i znalazły uznanie specjalistycznych recenzentów, czego dowodem jest ich opublikowanie w prestiżowym czasopiśmie *Journal of Medicinal Chemistry*. Kolejność przedstawiania wyników przeprowadzanych doświadczeń w ocenianej rozprawie jest logiczna. Czytelnik swobodnie podąża tokiem realizacji prac badawczych. Uzyskane wyniki zostały bardzo dobrze opisane, właściwie zinterpretowane, a miejscami dodatkowo przedyskutowano je w oparciu o dane literaturowe. Należy podkreślić, że w swojej pracy Doktorantka bazowała nie tylko na doskonale jej bliskim warsztacie metod chemicznych, ale również biologicznych, stosując modele badawcze z zakresu m.in. biologii molekularnej, biochemii i biologii komórki. Zastosowanie tak szerokiego wachlarza metod dowodzi nie tylko dobrej wiedzy teoretycznej Doktorantki, ale także jej bogatych umiejętnościach praktycznych. Znajduje to odzwierciedlenie w części eksperymentalnej, w której zamieszczono szczegółowy opis metodyki prowadzonych badań. Bardzo cennym rozdziałem

ocenianej rozprawy jest „Podsumowanie i wnioski końcowe”, w którym Doktorantka przedstawiła syntetycznie najistotniejsze osiągnięcia swojej rozprawy doktorskiej. Rozdział ten rekompensuje czytelnikowi brak streszczenia pracy.

Podsumowując, recenzowana praca doktorska przedstawiła proces identyfikacji specyficznych dla granzymu A sekwencji peptydowych, które zostały z powodzeniem wykorzystane jako podstawa do syntezy substratów, inhibitorów a ostatecznie markerów GrA. Badania pani Kołt dowiodły również, że narzędzia te są skuteczne w prostych, komórkowych układach biologicznych, co dobrze rokuje na dalsze możliwości ich wykorzystania w warunkach *in vivo*.

Lektura niniejszej pracy nasuwa kilka pytań i uwag do Autorki a Recenzent prosi o dodatkowe ustosunkowanie się do nich:

- We wstępie (str. 15) opisane zostały mechanizmy sterujące aktywnością proteaz z zaznaczeniem, że regulacja ta odbywa się już na etapie ekspresji białka. Biorąc pod uwagę specyficzność komórkową ekspresji badanych enzymów ciekawym byłoby wspomnieć na temat mechanizmów regulacji poziomu transkryptów dla tych proteaz. Czy w przypadku granzymów znane są mechanizmy specyficznie regulujące poziom odpowiadającego im mRNA?
- Doktorantka opisuje we wstępie (str. 17), że w arsenale odpowiedzi komórkowej, główną rolę pełnią cytotoksyczne limfocyty T i komórki NK, podczas gdy dominującą rolę odgrywają fagocyty, w tym: neutrofile, makrofagi i monocyty.
- Rysunek 21 przedstawia selektywność substratu SK15 wobec wybranych proteaz serynowych. Dlaczego w przypadku granzymu K zastosowano inny sposób przedstawienia wyników w porównaniu do pozostałych enzymów, dla których aktywność mierzona z wykorzystaniem odpowiadających im substratów przyjęto za równą 100%? Przy tej okazji chciałam spytać o wybór stężeń enzymów. Celem tego badania była weryfikacja specyficzności wypracowanego dla GrA substratu i wykluczenie możliwości jego modyfikacji przez inne proteazy neutrofilowe. Stężenia enzymów stosowane w przedstawionym teście nie odzwierciedlają proporcji stężenia enzymów realnie obecnych w neutrofilach. Zatem, czy uzyskane wyniki eliminują potencjalną proteolizę zaprojektowanego dla GrA substratu we wnętrzu komórek?

- Na Rysunku 32 zaprezentowano skuteczność działania markera SK15.5 wskazując obecność GrA w trzech badanych liniach komórkowych. Czy potwierdzono ten wynik stosując inną metodę celem ilościowego porównania poziomu i/lub aktywności GrA w tych liniach komórkowych?
- Jak można zinterpretować obserwację na Rysunku 33, która sugeruje, że pojawienie się dimerycznej formy GrA rozpoznawanej przez przeciwciała pojawia się po zastosowaniu markera SK15.5 i wzrasta wraz z jego stężeniem?
- Na stronie 79 pracy autorka opisuje, że do wykonania lizatów wykorzystywała komórki będące w fazie wzrostu logarytmicznego. W jaki sposób oceniano ten wzrost?
- Wyniki testu LDH zastosowanego do oceny żywotności neutrofilii po ich ekspozycji na SK15I/SK15.5 wskazują na wysoki poziom spontanicznie uwalnianej dehydrogenazy, co może być związane z osobniczo zależną, nadmierną aktywacją i perforacją błony komórkowej neutrofilii izolowanych od badanego dawcy krwi. Czy oceniano całkowity poziom LDH w lizacie komórkowym?
- Strona 95 - Czy badany inhibitor GrA hamuje proces NETozy? Rysunek 42 - Czy wykonane obrazowanie konfokalne uwidocznilo „dekorację” włókien chromatyny przez GrA podobnie jak ma to miejsce w przypadku elastazy neutrofilowej, histonów, czy peptydów antybakteryjnych?
- Czy na potwierdzenie przebiegu procesu pyroptozy (strona 98, Rysunek 43) oceniony został poziom uwolnionej z komórek IL-1 β w pożywce hodowlanej?
- Moje wątpliwości budzi interpretacja wyniku zamieszczonego na Rysunku 44. Przedstawione w pracy reprezentatywne zdjęcia wskazują na największą ko-lokalizację GrA z MMP9 (intensywność i rozmieszczenie żółtego sygnału), podczas gdy współczynnik korelacji Pearson'a wskazuje na elastazę neutrofilową.
- W pracy pojawiają się drobne nieścisłości językowe, nieliczne błędy literowe i redakcyjne.

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam wartość naukową przeprowadzonych badań oraz staranność opracowania ich wyników. Bezsprzecznie stanowią one ogromny wkład w metodologię badań granzymów, która może znaleźć kliniczne zastosowanie. Ponadto, pogłębiają one naszą, wciąż bardzo daleką od ideału, wiedzę na temat funkcji biologicznych granzymów. Pragnę również podkreślić ogromny wkład pracy Doktorantki w realizację tego tematu, co uważam za tym cenniejsze, że praca ma charakter interdyscyplinarny. Niniejsza rozprawa pod względem naukowym całkowicie spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r., z późniejszymi zmianami. Przedstawione dane doświadczalne, sposób realizacji badań, ale także dogłębna analiza wyników plasują tę rozprawę na bardzo wysokim poziomie, stąd wnoszę do Komisji ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr Sonii Kołt do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową prezentowanych wyników z pełnym przekonaniem wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Sonii Kołt stosowną nagrodą.

Joanna Koziół

