

Prof. dr hab. Jacek Jemielity  
Laboratorium Chemii Bioorganicznej  
Centrum Nowych Technologii  
Uniwersytet Warszawski  
e-mail: [j.jemielity@cent.uw.edu.pl](mailto:j.jemielity@cent.uw.edu.pl)  
tel. 22 5543774

Warszawa 17.01.2021

#### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Groborz**

#### **p.t. „Narzędzia chemiczne do badań enzymów proteolitycznych przy użyciu cytometrii masowej”**

Enzymy proteolityczne odpowiedzialne za specyficzną hydrolizę łańcuchów peptydowych pełnią kluczowe funkcje w najważniejszych dla funkcjonowania organizmów procesach życiowych. Dysfunkcje tych enzymów mogą prowadzić do bardzo poważnych nieprawidłowości w metabolizmie komórkowym, a w konsekwencji być przyczynami poważnych chorób takich jak nowotwory, choroby układu krwionośnego, choroby neurodegeneracyjne, czy autoimmunologiczne. Fascynujące jest to, że proteazy są w stanie precyzyjnie rozpoznawać sekwencje aminokwasowe swoich substratów, dokonując cięcia ściśle określonych łańcuchów peptydowych, aktywując ich aktywność biologiczną, lub degradować tylko wybrane białka, niszcząc je. Tysiące publikacji na temat tej grupy enzymów pozwala nam na coraz lepsze rozumienie funkcjonowania proteaz w złożonych układach jakimi są bez wątpienia komórki, tkanki czy wręcz całe organizmy. Śledzenie aktywności poszczególnych enzymów, a tym bardziej możliwość śledzenia wielu enzymów o podobnej aktywności jednocześnie w pojedynczej komórce to nie lada wyzwanie, ale nagroda za to jest również wysoka: zrozumienie współzależności pomiędzy różnymi aktywnościami proteolitycznymi. Jest to jeden z powodów dla których powstała i intensywnie rozwijana jest przez ostatnie lata cytometria masowa, stanowiąca swego rodzaju hybrydę spektrometrii mas z cytometrią przepływową. Jednak aby móc w danym kontekście skorzystać z tego potężnego narzędzia diagnostycznego (choć nie tylko) niezbędne są odpowiednie narzędzia molekularne. O tworzeniu takich narzędzi do zastosowań w cytometrii masowej w kontekście enzymów proteolitycznych jest właśnie rozprawa doktorska Pani magister

Katarzyny Groborz, którą wykonała pod kierunkiem Profesora Marcina Drąga i doktora habilitowanego Marcina Poręby w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazaowania, Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, a częściowo również w SBP Medical Discovery Institut, San Diego, USA.

Praca doktorska ma układ klasyczny, typowy dla prac eksperymentalnych z pogranicza chemii i biologii. Rozprawa jest napisana w sposób zwięzły, co docenią zajęci recenzenci, ale za to merytoryczna. Na 173 stronach tej rozprawy opisano wstęp teoretyczny, badania własne oraz część eksperymentalną. Dodatkowo wyodrębniono, cele pracy, a na końcu podsumowanie oraz listę prac wchodzących do dorobku autorki oraz osiągnięć związanych z realizacją doktoratu. W pracy zamieszczono 43 rysunki oraz 14 tabel, starannie przygotowanych pod względem edytorskim. Elementy te są bardzo pomocne w rozumieniu tematów poruszanych rozprawie. W pracy zacytowano 216 pozycji literaturowych, które w znakomitej większości stanowią prace oryginalne oraz przeglądowe opublikowane w wiodących czasopismach naukowych z chemii, biochemii, biologii molekularnej i komórkowej oraz dziedzin pokrewnych.

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było zaprojektowanie, otrzymanie oraz pokazanie „proof of concept” zastosowań nowego typu sond molekularnych do badań aktywności proteaz przy użyciu cytometrii masowej. Projektowane sondy składały się z części peptydowej odpowiadającej za specyficzne wiązanie się do poszczególnych proteaz, części analitycznej, którą stanowiły czyste izotopowo jony lantanowca, odpowiednio skompleksowane i przyłączone kowalencyjnie do części peptydowej, oraz reaktywne ugrupowanie zapewniające kowalencyjne wiązanie się z enzymem w jego miejscu aktywnym. Weryfikacja użyteczności tak skonstruowanych sond miała zostać przeprowadzona na nowotworowych liniach komórkowych oraz komórkach wyizolowanych z krwi ludzkiej.

W części literaturowej Autorka opisuje metodę cytometrii masowej prezentując podstawy fizykochemiczne oraz walory tej metody i pokazując przewagę nad aktualnie stosowanymi technikami badawczymi stosowanymi w tym kontekście. Przedstawia udoskonalenia technologiczne, które pozwalają na coraz bardziej zaawansowane zastosowania związane z obrazowaniem komórek pod kątem aktywności enzymatycznej. Znaczna część przeglądu literaturowego poświęcona jest obiektom badań mgr Groborz, czyli enzymom proteolitycznym, w szczególności proteazom cysteinowym i serynowym. Autorka przedstawia poszczególne klasy tych enzymów, jak choćby kaspazy, katepsyny czy neutrofilowe proteazy serynowe dyskutując ich funkcje komórkowe oraz wskazując procesy fizjologiczne i patologiczne, w których biorą udział. Dobór treści w części literaturowej jest kwestią autorską, jednak powinien pomagać czytelnikowi w zrozumieniu osiągnięć opisanych w badaniach własnych, a dobrze jest jeśli jednocześnie tworzy pewną spójną i ciekawą historię. Nie mam wątpliwości, że tak właśnie jest w recenzowanej pracy.

Część poświęcona badaniom własnym to bardzo bogaty materiał badawczy, w którym Autorka podjęła się trudnego zadania jakim było zaprojektowanie, otrzymanie i weryfikacja specyficznych sond molekularnych pozwalających śledzić aktywność wybranych proteaz przy użyciu cytometrii mas. Technika ta pozwala na wielowymiarową analizę różnych parametrów na poziomie pojedynczych komórek, dzięki czemu znajduje zastosowanie w wielu obszarach badawczych, a w szczególności w diagnostyce.

W recenzowanej pracy Doktorantka opisała nowy typ markerów chemicznych, które zamiast znaczników fluorescencyjnych posiadają stabilne izotopy wybranych metali. W pierwszej kolejności jako cele molekularne wybrano proteazy cysteinowe: legumainę, katepsynę L oraz katepsynę B. Kluczem do powodzenia projektu były już istniejące selektywne inhibitory tych enzymów, które zidentyfikowano wcześniej stosując opracowane w Laboratorium kierowanym przez Prof. Drąga metody profilowania specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych za pomocą bibliotek substratów zawierających nienaturalne aminokwasy. Tetrapeptydowe sondy zawierały na N-końcu ugrupowanie chelatujące DOTA, które jest bardzo dobrym środkiem kompleksującym, szczególnie dla jonów lantanowców. Do wyznakowania markerów chemicznych użyto terbu ( $^{159}\text{Tb}$ ), lutet ( $^{175}\text{Lu}$ ) oraz gadolin (mieszanka izotopów, Gd). Sondy na C-końcu zawierały reaktywną grupę łączącą się kowalencyjnie z enzymem w jego miejscu aktywnym. W przypadku proteaz serynowych zastosowano estry difenylowe kwasów  $\alpha$ -aminoalkanofosfonowych, a w przypadku proteaz cysteinowych acyloksymetyloketony.

Tak skonstruowane sondy były najpierw testowane względem rekombinowanych enzymów pod względem aktywności i selektywności, a następnie w liniach komórkowych pod względem selektywności, aby sprawdzić czy zmiana znacznika wpływa na funkcjonalność sondy. Badania te pokazały, że nowo otrzymane związki zachowują się bardzo podobnie jak ich fluorescencyjne analogi. Pozostają selektywne i wiążą się do enzymów w żywych komórkach. Finalna weryfikacja polegała na wizualizacji aktywności proteaz za pomocą otrzymanych sond z wykorzystaniem cytometrii masowej, pokazując, że możliwe jest badanie tą metodą aktywności enzymów proteolitycznych w różnych typach komórek. Jednocześnie zestawienie wyników uzyskanych dzięki nowym sondom oraz dzięki znakowanym, handlowo dostępnym przeciwciałom umożliwia porównanie ekspresji danej proteazy z jej aktywnością komórkową. Pomimo, że nowe sondy wykazują się niższą czułością w stosunku do sond opartych na przeciwciałach to udało się je zastosować z powodzeniem do obrazowania aktywności wybranych proteaz w komórkach linii THP-1 (komórki ostrej białaczki monocytowej).

Kolejna część pracy poświęcona jest otrzymywaniu i weryfikacji drugiej generacji sond do podobnych zastosowań. W drugiej generacji sond do detekcji proteaz metodą cytometrii masowej zastosowano pewne modyfikacje, dotyczyły one w szczególności zmiany ugrupowania chelatującego na DOTA-GA, które silniej koordynuje jon metalu oraz zwiększono również długość linkera łączącego chelator z

częścią peptydową. Dla związków drugiej generacji otrzymano dodatkowo analogi nie zawierające grupy reaktywnej na C końcu, a zamiast tego wprowadzono tam ugrupowanie amidowe (a nie jak błędnie określiła to Doktorantka w pracy wolną grupą aminową). Te zmiany w strukturze sond TOF drugiej generacji odpowiednio umotywowano, choć nie mogłem odszukać krytycznego komentarza na temat właściwości sond pierwszej generacji. Bardzo proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się podczas publicznej obrony, czy obserwowała pośrednio lub bezpośrednio utratę jonu metalu przez sondę w eksperymentach biochemicznych lub biologicznych. Czy badana była trwałość takich kompleksów, czy możliwa jest wymiana metalu na jony obecne w komórkach? Podsumowanie sond drugiej generacji można odnaleźć w Tabelach 3 oraz 4, gdzie przedstawiono łącznie 20 struktur związków chemicznych. Sondy drugiej generacji poddano również weryfikacji pod względem potencjalnych zastosowań do cytometrii przepływowej. Podobnie jak poprzednio uzyskano bardzo interesujące wyniki tym razem śledząc aktywność wybranych proteaz cysteinowych w makrofagach. Dane uzyskane z tych eksperymentów dobrze korelowały z danymi literaturowymi. Biorąc pod uwagę nowatorski charakter przeprowadzonych badań oraz ich efekty naukowe, a przede wszystkim olbrzymi potencjał aplikacyjny wynikający wprost z badań podstawowych, pracę jako całość oceniam bardzo wysoko.

Przykry obowiązek recenzenta to również wykazanie słabości rozprawy przedstawionej do oceny, tych na szczęście w recenzowanej pracy jest nie wiele. Badania własne kończą się rozdziałem 3.3.5 zatytułowanym „Podsumowanie i dyskusja wyników”. Takie rozdziały należą do ulubionych wśród recenzentów, tu niestety z pewnym rozczarowaniem muszę stwierdzić, że rozdział ten został potraktowany po macoszemu. Podsumowanie sprawia wrażenie bardzo ogólnikowego, zabrakło mi ilościowego podsumowania efektów pracy Doktorantki w ramach projektu doktorskiego. Zabrakło również pewnego zarysowania jak ta opracowana technologia może być wykorzystana w przyszłości. Może podczas publicznej obrony uda mi się namówić Doktorantkę na popuszczenie wodzy fantazji w tym zakresie.

Dysertacja przygotowana została z należytą satarannością, z zastosowaniem wysokich standardów również jeśli chodzi o stronę edytorską. Niemniej jednak zauważyłem kilka braków lub pomyłek. Niektóre z nich pozwolę sobie tutaj wymienić.

Przykładowo na stronie 26 w zdaniu: „Tak zaprojektowane cząsteczki mogą być kolejno stosowane do znakowania komórek lub w celu strojenia kalibracji masowego.” zabrakło słowa, przypuszczam, że chodzi o kalibrację cytometru masowego.

W tabeli 1 w strukturze fragmentu peptydowego markera TOF dla kaspazy-1 wkraść się błąd w strukturze jednego z naturalnych aminokwasów i bardzo proszę o jego skorygowanie podczas publicznej obrony.

Na rysunku 20 panel C zabezpieczające grupy tertbutylowe w grupie chelatującej powinny być już usunięte po zastosowaniu w poprzednim etapie TFA, a na schemacie ciągle są obecne sprawiając wrażenie, że zostały usunięte dopiero pod wpływem chlorku lantanowca.

Te drobne defekty nie obniżają oczywiście wysokiego poziomu pracy zarówno pod względem edytorskim, a tym bardziej pod względem merytorycznym.

Bogaty materiał doświadczalny, uzyskany podczas realizacji pracy jest cenny ze względów poznawczych, diagnostycznych a być może również teranostycznych. Rozprawa wnosi bardzo istotny wkład w metodologię badań nad aktywnością komórkową proteaz, w tym jednoczesnym badaniu wielu z nich. Jestem przekonany, że opracowane podczas realizacji pracy narzędzia molekularne znajdują szerokie zastosowanie w profilowaniu aktywności komórkowej. Na odrębny komentarz zasługuje dorobek publikacyjny Doktorantki. Pani magister Katarzyna Groborz jest współautorką 16 prac opublikowanych w wiodących w dziedzinie czasopismach z listy filadelfijskiej. Prace ze współautorstwem Doktorantki publikowane były w takich czasopismach jak JACS, Angewandte Chemie Int. Ed., Nature Chemical Biology, Chemical Science, czy Cell Deaths and Differentiation, a sumaryczny IF tych prac wynosi ponad 117, czyli jest zbliżony do bardzo dobrych prac habilitacyjnych. W czterech z tych prac Doktorantka jest pierwszą współautorką. Jest to więc dorobek imponujący jak na ten etap kariery. Tym niemniej z pewnym zdziwieniem zauważyłem, że wyniki w dysertacji są związane przede wszystkim z jedną pracą opublikowaną w JACS. Będę wdzięczny za krótki komentarz w tej sprawie. Doktorantka za swe osiągnięcia naukowe była nagradzana, co odzwierciedlają liczne nagrody i wyróżnienia, kierowała dwoma projektami badawczymi Preludium NCN oraz Diamentowy Grant z MNiSW. Warto podkreślić również staż odbyty w SBP Medical Discovery Institut, San Diego, USA, który z pewnością bardzo istotnie wpłynął na zainteresowania badawcze Doktorantki.

W konkluzji z całym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska spełnia wszelkie warunki określone w Ustawie i wnioskuje do Komisji do Spraw Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr Katarzyny Groborz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę nowatorski charakter przedstawionych badań objawiający się opracowaniem zupełnie nowych i niezwykle cennych narzędzi pozwalających na badanie aktywności wybranych proteaz w pojedynczych komórkach, a co za tym idzie olbrzymi potencjał aplikacyjny tych narzędzi wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani magister Katarzyny Groborz.

