

Cytometria masowa stanowi jedną z najnowocześniejszych technik analizy złożonych systemów biologicznych na poziomie pojedynczej komórki. Początkowo badania z wykorzystaniem cytometru masowego dotyczyły głównie analizy ekspresji antygenów różnicowania komórkowego. Wraz z rozwojem tej technologii zaczęto ją również stosować do badania proteomu, co pozwoliło na dogłębne zbadanie wielu skomplikowanych systemów biologicznych, takich jak np. tkanki nowotworowe. Dzięki temu, że cytometria masowa opiera się na wykorzystywaniu stabilnych izotopów metali jako znaczników poszczególnych indywidualnych biologicznych, na dzień dzisiejszy możliwa jest jednoczesna analiza ponad 40-stu parametrów na poziomie pojedynczej komórki. W ciągu ostatnich kilkunastu lat na całym świecie prowadzone są intensywne badania mające na celu pełne wykorzystanie potencjału badawczego oferowanego przez cytometrię masową, co skutkuje nowymi, nieszablonowymi podejściami eksperymentalnymi opierającymi się na wykorzystaniu czystych izotopów metali. Wykorzystywanie przeciwciał w cytometrii (przepływowej czy masowej) ogranicza analizę do badania ogólnej puli białek w badanej próbce. W przedstawionej rozprawie doktorskiej podjęto próbę opracowania technologii do identyfikacji aktywnych form białek, które biorą czynny udział w szlakach sygnalizacji komórkowej. W związku z powyższym, opracowano małowcząsteczkowe markery chemiczne znakowane stabilnymi izotopami metali do oznaczania aktywności indywidualnych enzymów. Markery chemiczne stanowią niezbędne narzędzia do badania aktywności białek i od lat znajdują się w centrum jednej z dziedzin proteomiki, a mianowicie ABPP (ang. *Activity-Based Protein Profiling*). Tradycyjne markery chemiczne składają się z trzech części, czyli grupy wiążącej miejsce aktywne enzymu, linkera oraz znacznika fluorescencyjnego pozwalającego na detekcję związku w komórce. Dzięki zastosowaniu fluoroforów o różnych długościach fali wzbudzenia i emisji możliwa jest analiza kilku parametrów jednocześnie za pomocą technik takich jak mikroskopia fluorescencyjna czy cytometria przepływowa. W celu zwiększenia ilości badanych parametrów, w niniejszej rozprawie doktorskiej opracowano markery chemiczne, które zamiast znacznika fluorescencyjnego posiadają ugrupowanie chelatujące cząsteczkę metalu. Połączenie cytometrii masowej z selektywnymi markerami chemicznymi pozwoliło na stworzenie nowej technologii umożliwiającej multiparametryczną analizę próbek biologicznych. W przedstawionej pracy skupiono się na analizie proteaz zaangażowanych w procesy nowotworzenia, tj. katepsyn cysteinowych, kaspaz oraz neutrofilowych proteaz serynowych. W pracy wykorzystano inhibitory, które zostały opracowane na podstawie technologii HyCoSuL (ang. *Hybrid Combinatorial Substrate Libraries*) i zawierają w swojej strukturze nienaturalne aminokwasy, co znacząco zwiększa ich selektywność wobec celowanego enzymu

proteolitycznego. Inhibitory oznakowano stabilnymi izotopami metali, tworząc tym samym zestaw markerów TOF (ang. *Time Of Flight*) do analizy aktywności poszczególnych enzymów w komórkach. Dodatkowo, przy użyciu nowoczesnego systemu do wizualizacji komórek oraz tkanek (system Hyperion), ukazano dystrybucję przestrzenną katepsyn cysteinowych, używając opracowanych związków chemicznych. Równolegle z markerami TOF, do analizy wykorzystano przeciwciała znakowane metalami, celem identyfikacji subpopulacji komórkowych oraz określenia całkowitej ilości badanych proteaz (w formie nieaktywnej oraz aktywnej) w badanych próbkach. Opracowana technologia znakowania enzymów proteolitycznych przy użyciu markerów TOF została poddana dokładnej walidacji. Wykonano pełną gamę niezależnych eksperymentów, poczynając od analizy kinetycznej na czystych, rekombinowanych enzymach, poprzez porównanie uzyskanych związków z fluorescencyjnie znakowanymi markerami (analiza biochemiczna- Western Blotting), aż do badań biologicznych, gdzie za pomocą przeciwciał oraz markerów TOF skorelowano poziom ekspresji białka z występowaniem jego formy aktywnej. Uzyskane wyniki pozwoliły określić poziom ekspresji (przeciwciała) i aktywności (markery) poszczególnych enzymów proteolitycznych w wybranych populacjach komórkowych. Okazało się, iż rozkład aktywności poszczególnych enzymów jest nierównomierny i, co więcej, aktywność enzymu nie zawsze koreluje z jego poziomem ekspresji. Badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiają pierwsze zastosowanie niskocząsteczkowych markerów chemicznych w analizie stanu funkcjonalnego białek za pomocą cytometrii masowej. Co więcej, opracowana technologia może zostać wykorzystana do zbadania innych medycznie ważnych enzymów, takich jak kinazy czy fosfatazy. Proces aktywacji poszczególnych białek komórkowych w odpowiedzi na bodźce pochodzące z zewnątrz bądź wewnątrz komórki, pozwala na uzyskanie informacji dotyczących zależności pomiędzy poszczególnymi białkami. To z kolei jest niezbędne w celu określenia kaskad aktywacji szlaków komórkowych, które prowadzić mogą zarówno do zdarzeń prozdrowotnych jak i powodować powstawanie stanów patofizjologicznych. Dzięki protokołom opracowanym w przedstawionej dysertacji możliwe jest dogłębne zbadanie stanu funkcjonalnego badanych populacji komórkowych, a zastosowanie w tym celu cytometrii masowej umożliwia wielowymiarową analizę poszczególnych zjawisk.