



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wrocław, 20.02.2026

Prof. dr hab. inż. Julita Kulbacka
Kierownik Katedry i Zakładu Biologii
Molekularnej i Komórkowej
Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
ul. Borowska 211a, 50-556 Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Małgorzaty Kalinki
pt. „Dissecting the role of lysosomal proteases in programmed cell death.”

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Kalinki została wykonana na Politechnice Wrocławskiej, Wydziale Chemicznym, w dyscyplinie nauki chemiczne, pod kierunkiem dr hab. inż. Marcina Poręby, prof. PWr. Praca

Struktura pracy, tematyka badawcza i cele rozprawy

Tematyka rozprawy jest oryginalna i aktualna, dotyczy interdyscyplinarnej problematyki na styku biologii molekularnej, biologii komórki, biochemii proteaz, chemii biologicznej oraz immunologii komórkowej. W ostatnich latach intensywnie rozwija się obszar badań nad inflammasomami, gasderminami, proteolitycznym przetwarzaniem mediatorów zapalnych oraz nad znaczeniem lizosomów jako organelli uczestniczących nie tylko w degradacji, ale również w przełączaniu szlaków komórkowych. Nadal jednak pozostaje wiele pytań dotyczących działania poszczególnych katepsyn. W tym miejscu lokuje się rozprawa Pani mgr Małgorzaty Kalinki, która podjęła się analizy roli lizosomalnych proteaz cysteinowych, głównie katepsyn, w regulowanej śmierci komórki, ze szczególnym uwzględnieniem pyroptozy

oraz zależności pomiędzy destabilizacją lizosomów, aktywacją proteaz i programowaną śmiercią komórkową.

Rozprawa ma klasyczną formę monografii, w układzie typowym dla prac doświadczalnych. Praca rozpoczyna się obszernym wstępem teoretycznym, w którym Autorka przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący mechanizmów programowanej śmierci komórki, ze szczególnym uwzględnieniem pyroptozy, roli inflammasomów, gasdermin oraz znaczenia lizosomów i proteaz lizosomalnych w regulacji losów komórki. We wstępie omówiono również biologiczne i biochemiczne właściwości katepsyn, ich aktywację, specyficzność substratową oraz potencjalny udział w procesach zapalnych i degeneracyjnych. Ta część pracy stanowi dobre merytoryczne wprowadzenie do dalszych badań i uzasadnia podjęcie przedstawionej problematyki. Tu chciałabym podkreślić bardzo dobre przygotowanie schematów graficznych, które są doskonałym dopełnieniem wstępu literaturowego.

W dalszej kolejności Autorka formułuje cele pracy i założenia badawcze, które wynikają logicznie z przedstawionego przeglądu literatury. Pani Kalinka skupia się na czterech głównych zagadnieniach, a mianowicie (i) ustaleniu, czy wybrane katepsyny mogą bezpośrednio przecinać substraty związane z pyroptozą, w tym GSDMD oraz pro-IL-1 β , (ii) ocenie znaczenia katepsyn w klasycznej pyroptozie oraz w śmierci komórkowej indukowanej uszkodzeniem lizosomów, (iii) wykorzystaniu selektywnych narzędzi chemii biologicznej do badania proteaz cysteinowych w komórkach, oraz (iv) zastosowaniu cytometrii masowej do systemowego profilowania szlaków śmierci komórkowej. Cele zostały zdefiniowane jasno i odnoszą się zarówno do aspektów mechanistycznych, jak i metodologicznych, obejmując analizę udziału katepsyn w regulowanej śmierci komórki oraz ocenę przydatności nowoczesnych narzędzi chemii biologicznej do badania tych procesów. Cele zostały właściwie osadzone w aktualnym stanie badań i dobrze uzasadnione przeglądem literatury i wskazują na istniejące luki poznawcze – w szczególności niejednoznaczność danych dotyczących roli katepsyn w aktywacji kompleksu NLRP3, ograniczoną dostępność selektywnych sond analitycznych oraz niejasności związane z ich bezpośrednim udziałem w cięciu GSDMD i pro-interleukin. Przedstawione przez Doktorantkę wyniki jednoznacznie potwierdzają realizację wszystkich głównych celów badawczych.

Kolejny rozdział stanowią „Materiały i Metody”, w którym Autorka rozprawy opisuje zastosowane modele komórkowe, warunki hodowli, sposób indukcji badanych form śmierci komórkowej, wykorzystane odczynniki, przeciwciała, sondy aktywnościowe, inhibitory oraz

procedury analityczne i biochemiczne. W tej części przedstawiono również metody obrazowania, analizy proteolizy białek, Western blotting, testy żywotności komórek, analizy z użyciem białek rekombinowanych, spektrometrię mas oraz cytometrię masową CyTOF. Rozdział metodologiczny jest rozbudowany i obejmuje szeroki zestaw technik badawczych adekwatnych do realizacji przyjętych celów. Jednocześnie należy zaznaczyć, że z punktu widzenia powtarzalności doświadczeń korzystne byłoby bardziej systematyczne uporządkowanie tej części, zwłaszcza przez wyraźniejsze rozdzielenie opisu linii komórkowych, podania źródeł ich pochodzenia, numerów katalogowych, uzupełnienie informacji o statusie mykoplazmy i autentykacji linii. W części metodologicznej pojawia się niespójność dotycząca stężenia PMA. W jednym miejscu podano 40 ng/mL, a w innym 40 nM. W przypadku THP-1 nie są to wartości równoważne i taka rozbieżność powinna zostać skorygowana. Ta uwaga wymaga wyjaśnienia, ponieważ dotyczy kluczowego etapu przygotowania modelu komórkowego do dalszych badań. Tu warto doprecyzować warunki różnicowania komórek.

Najważniejszą, obszerną część rozprawy stanowi rozdział „Wyniki”, w którym Autorka prezentuje rezultaty badań własnych w logicznej i konsekwentnej sekwencji. W pierwszym etapie analizowane są zależności dotyczące proteolitycznego przetwarzania substratów związanych z pyroptozą przez wybrane katepsyny, następnie przedstawione zostają wyniki eksperymentów komórkowych dotyczących klasycznej pyroptozy i śmierci komórkowej indukowanej destabilizacją lizosomów, a dalej badania wykorzystujące selektywne inhibitory oraz sondy aktywnościowe. Na szczególne podkreślenie zasługują wyniki dotyczące bezpośredniego proteolitycznego przetwarzania substratów związanych z pyroptozą przez katepsyny. Autorka wykazała, że katepsyny B, L, V, a zwłaszcza katepsyna S, są zdolne do bezpośredniego cięcia pro-IL-1 β , pro-IL-18 oraz gasderminy D, prowadząc do powstawania fragmentów o masach zbliżonych do produktów generowanych przez kaspazę 1. Jednocześnie Doktorantka wskazuje, że charakter tego procesu zależy od warunków środowiskowych, przede wszystkim od pH oraz stężenia enzymu. W warunkach niższego stężenia obserwowano bardziej ograniczone i selektywne cięcie, natomiast przy wyższych stężeniach dominowały procesy o charakterze degradacyjnym. Istotnym osiągnięciem było również wskazanie preferencyjnych miejsc cięcia GSDMD przez katepsynę S, zlokalizowanych w pobliżu motywu FLTD, co zostało potwierdzone z wykorzystaniem analiz LC-MS/MS oraz testów IQF (Internally Quenched Fluorescence).

Rozprawa dostarcza również przekonujących danych dotyczących udziału katepsyny B oraz innych proteaz w śmierci komórkowej indukowanej przez LLOMe, mającej charakter lizosomozależny. Autorka wykazała, że LLOMe indukuje śmierć komórek o profilu pośrednim pomiędzy apoptozą a nekrozą, w znacznym stopniu zależną od aktywności katepsyny B i kalpain, z dodatkowym udziałem legumainy. Wnioski te zostały poparte wynikami uzyskanymi z użyciem selektywnych inhibitorów oraz analizą aktywności kaspazy 3/7.

Kolejno, istotną wartość ma doprecyzowanie modelu aktywacji inflammasomu NLRP3 przez nigerycynę. Autorka wykazała, że przy niższych stężeniach nigericyny dominuje klasyczna oś NLRP3, kaspaza 1, gazdermina D, w której katepsyny pełnią funkcję wzmacniającą i modulującą odpowiedź. Z kolei w wyższych stężeniach nigericyny zaczynają przeważać mechanizmy o charakterze bardziej niespecyficznym, związane z gwałtownym stresem osmotycznym i uszkodzeniem komórki, w mniejszym stopniu zależne od klasycznej aktywacji inflammasomu. Cennym elementem pracy jest też profilowanie odpowiedzi komórkowej na poziomie pojedynczej komórki. Zastosowanie cytometrii masowej z szerokim panelem markerów, obejmującym między innymi kaspazy 1, 3/7, 8 i 9, GSDMD, IL-1 β , IL-18, NINJ1, TNF- α , LDH, GSDME oraz sondy TOF ABP, pozwoliło uzyskać unikalny wgląd w dynamikę wczesnych zdarzeń molekularnych towarzyszących pyroptozie oraz śmierci indukowanej przez LLOMe. Analizy te wykazały między innymi dominującą rolę kaspazy 1 w pyroptozie indukowanej nigerycyną oraz wyraźną aktywację kaspaz 3/7 w odpowiedzi na uszkodzenie lizosomów wywołane przez LLOMe.

Układ tej części rozprawy jest logiczny, a kolejność prezentowanych doświadczeń jest dobrze podporządkowana głównej hipotezie badawczej.

Ostatnią zasadniczą część pracy stanowi „Dyskusja”, w której Autorka odnosi uzyskane wyniki do danych literaturowych i podejmuje próbę ich interpretacji w szerszym kontekście biologii śmierci komórki. Dyskusja wskazuje na dobrą znajomość literatury przedmiotu oraz umiejętność krytycznego zestawiania wyników własnych z obserwacjami innych autorów. Tu warto podkreślić, że do opracowania rozprawy Autorka wykorzystwała aż 468 pozycji literaturowych, co świadczy o dobrym zgłębieniu podejmowanego problemu naukowego. Pani mgr M. Kalinka trafnie podkreśla złożoność relacji pomiędzy aktywacją katepsyn, destabilizacją lizosomów a aktywacją klasycznych osi pyroptotycznych. W kilku miejscach możliwe byłoby jeszcze oddzielenie obserwacji bezpośrednio wynikających z danych

eksperymentalnych od interpretacji modelowych, jednak nie zmienia to faktu, że ta część dysertacji została opracowana dojrzałe i na bardzo dobrym poziomie naukowym.

Całość rozprawy kończy podsumowanie i wnioski, które są zgodne z przedstawionymi wynikami i w sposób syntetyczny odpowiadają na postawione pytania badawcze. Praca wnosi istotny i oryginalny wkład do aktualnego stanu wiedzy na temat mechanizmów regulowanej śmierci komórkowej oraz roli proteaz lizosomalnych w modulacji pyroptozy. Autorka zaprezentowała przekonujące dowody biochemiczne (LC-MS/MS, IQF) i komórkowe (Western blot, IncuCyte, MTS/LDH, ABP, CyTOF), które wspólnie potwierdzają postawione hipotezy oraz stanowią solidną podstawę do sformułowania spójnych i dobrze uzasadnionych wniosków końcowych.

Walory naukowe i wnioski końcowe

Uzyskane wyniki mają nie tylko wysoką wartość poznawczą, lecz również wyraźny potencjał aplikacyjny. Mogą one stanowić podstawę do opracowania precyzyjnych strategii farmakologicznej modulacji tzw. „zapalnej” śmierci komórkowej, uwzględniających dobór odpowiednich inhibitorów katepsyn albo inhibitorów kaspazy 1 i inflammasomu w zależności od kontekstu biologicznego i patologicznego. Ponadto wyniki te mogą znaleźć zastosowanie w projektowaniu nowych sond i inhibitorów przeznaczonych do obrazowania oraz modulowania aktywności katepsyn *in vivo*, zwłaszcza w chorobach zapalnych, neurodegeneracyjnych i nowotworowych. W części Dyskusji, Autorka formułuje spójny model koncepcyjny, zgodnie z którym pyroptoza nie jest wynikiem działania pojedynczego, liniowego szlaku, lecz efektem konwergencji wielu dróg proteolitycznych. W modelu tym kaspaza 1 i GSDMD stanowią główną oś wykonawczą, natomiast katepsyny pełnią rolę istotnych modulatorów, szczególnie w warunkach zaburzonej integralności lizosomów oraz w sytuacjach, w których klasyczny szlak pyroptotyczny ulega osłabieniu lub częściowemu obejściu.

Podsumowując, wartość naukową przedstawionych wyników oceniam bardzo wysoko. Przedstawione mi do recenzji opracowanie zawiera oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a mianowicie pokazuje, w jaki sposób proteazy cysteinowe wchodzą w interakcje z klasycznym szlakiem inflammasomowym i jak mogą bezpośrednio modyfikować kluczowe substraty pyroptozy. Uzyskane wyniki mogą być podstawą do sformułowania nowego modelu

konwergencji pyroptozy i LDCD (śmierci komórki zależnej od lizosomów). Dodatkowo praca została opracowana starannie pod względem graficznym i edytorskim.

Dodatkowo, w części końcowej pracy Autora umieszcza zestawienia swojego dorobku naukowego w postaci listy publikacji, wystąpień konferencyjnych oraz udziału w projektach badawczych. Dorobek publikacyjny i projektowy doktorantki jest istotny i tematycznie spójny z rozprawą, co wskazuje na aktywne uczestnictwo w życiu naukowym.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam pytania, uwagi i komentarze, które mają charakter głównie doprecyzowujący i nie podważają zasadniczej wartości pracy:

- Zastosowanie dużej liczby inhibitorów (własnych oraz komercyjnych) jest mocną stroną pracy, przydałoby się syntetyczne, graficzne lub w postaci tabeli podsumowanie, np. „który inhibitor – jaka proteaza – plus wniosek biologiczny w danym modelu”. Tę rolę częściowo spełniają tabele kinetyczne, jednak takie podsumowanie uzupełniłoby ostateczne wnioski.
- Autorka podkreśla redundancję i kontekstowość działania katepsyn; byłoby jednak korzystne jednoznacznie wskazać, które obserwacje uważa za hipotezy wymagające dalszej weryfikacji (np. znaczenie CatS w fizjologicznej pyroptozie makrofagów), oraz czy i jak można te hipotezy zweryfikować, w kontekście dalszego rozwoju prowadzonych przez Doktorantkę badań.
- W części metodologicznej warto dodać źródło pochodzenia linii komórkowych oraz podać dokładne warunki różnicowania komórek i wyjaśnić rozbieżności stężeń PMA.

Podsumowując, rozprawa mgr inż. Małgorzaty Kalinki stanowi oryginalny, spójny i wartościowy wkład w dziedzinę nauk chemicznych, prezentując nowatorskie podejście do projektowania selektywnych łączników proteazowych w prolekach i ADC. Autorka zweryfikowała swoje tezy bardzo solidnym warsztatem metodologicznym oraz dokonała oceny biologicznej. Cele dotyczące katepsyn B oraz L zostały w pełni zrealizowane zarówno na poziomie chemicznym, jak i funkcjonalnym, natomiast tematyka dotycząca katepsyny S jest otwarta do dalszych badań. Pomimo drobnych uwag i wątpliwości, które mają charakter wyłącznie uzupełniający, nie podważają one wartości merytorycznej pracy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr inż. Małgorzaty Kalinki pt.: *”Dissecting the role of lysosomal proteases in programmed cell death”*, spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2022 poz. 574 ze zm.). W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej

Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o **przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie Pani Małgorzaty Kalinki do dalszych etapów postępowania dotyczącego nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne**. Mając na uwadze znaczenie uzyskanych wyników, szeroki zakres przeprowadzonych badań oraz nowatorskie podejście Doktorantki w ich realizacji, wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne o przyznanie Autorce dysertacji **wyróżnienia**.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII
MOLEKULARNEJ I KOMÓRKOWEJ

kerownik:

prof. dr hab. inż. Julita Kulbacka

Prof. dr hab. inż. Julita Kulbacka