

**FACULTY OF BIOTECHNOLOGY**

DEPARTMENT OF PROTEIN ENGINEERING

ul. Joliot-Curie 14a  
50-383 Wrocław | Poland

Tel. +48 71 375 28 89

[www.biotech.uni.wroc.pl](http://www.biotech.uni.wroc.pl)

dr hab. Małgorzata Zakrzewska, prof. UWr

Wrocław, 30 kwietnia 2026 r.

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Kalinki, została wykonana w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem Pana dr hab. Marcina Poręby, prof. PWr. Przedmiotem badań było określenie roli katepsyn w piroptotycznej śmierci komórkowej oraz opracowanie nowych strategii badawczych umożliwiających analizę ich funkcji. Tematyka badawcza jest bardzo aktualna, w szczególności w świetle poszukiwania efektywnych leków przeciwnowotworowych, a realizacja pracy pod opieką wysokiej klasy specjalisty w zakresie chemii białek, a w szczególności badań nad enzymami proteolitycznymi, zapewniła dostęp do wszelkich niezbędnych metod i prawidłowego zaplanowania prac eksperymentalnych zarówno z obszaru chemii biologicznej, jak i biologii komórki.

Rozprawa doktorska mgr inż. Kalinki jest napisana w języku angielskim, podzielona jest na siedem głównych rozdziałów, zawiera 58 rysunków, 6 tabel i, co warto podkreślić, aż 468 pozycji literaturowych. Praca składa się ze *Wstępu*, *Celu badań*, opisu zastosowanych *Metod* i *Materiałów*, prezentacji uzyskanych *Wyników*, *Dyskusji*, *Podsumowania* oraz *Spisu literatury*. Dodatkowo rozprawa zawiera także cztery rozdziały poświęcone dorobkowi naukowemu Doktorantki oraz *Wykaz zastosowanych skrótów*. *Spis Treści* jest dobrze zredagowany i ułatwia lekturę rozprawy. Żałuję jednak, że w rozprawie zabrakło *Streszczenia*.

W obszernym *Wstępie* Doktorantka szczegółowo omówiła najważniejsze, dla przedstawionych w rozprawie badań, zagadnienia. Zawarła w nim informacje na temat rodzajów zaprogramowanej śmierci komórkowej oraz różnych typów jej induktorów. Przedstawiała proteazy zaangażowane w procesy prowadzące do śmierci komórki, skupiając się na dwóch najważniejszych klasach: kaspazach i katepsynach, stanowiących przedmiot

rozprawy. Opisała także technikę cytometrii masowej, która zrewolucjonizowała badania nad mechanizmami prowadzącymi do zaprogramowanej śmierci komórki, a która z powodzeniem zastosowana została w pracy. Cały rozdział napisany jest kompetentnie, dobrze wprowadza w poszczególne aspekty rozprawy doktorskiej i świadczy o znajomości tematu przez Doktorantkę. Ponadto opatrzony jest bardzo starannymi i estetycznymi rysunkami samodzielnie wykonanymi przez Autorkę.

Cel pracy został precyzyjnie określony. Zadaniem Doktorantki była weryfikacja hipotezy, że piroptoza i zależna od lizosomów śmierć komórkowa mają wspólne molekularne punkty kontrolne. Założono, że katepsyny uwolnione do cytozolu mogą bezpośrednio indukować zapalną śmierć komórki niezależnie lub we współpracy z kaspazami. Podejście eksperymentalne obejmowało połączenie metod biologii komórki z nową generacją narzędzi biologii chemicznej oraz wysokoprzepustowymi technologiami jednokomórkowymi. Doktorantka wykorzystała zestawy inhibitorów oraz sond wobec poszczególnych katepsyn, stworzonych przy użyciu podejścia HyCoSuL (*Hybrid Combinatorial Substrate Library*), wykorzystującego naturalne i nienaturalne aminokwasy, przewyższając problem nakładania się motywów rozpoznawania substratów. Szczegółowe cele pracy obejmowały zweryfikowanie czy: (i) katepsyny bezpośrednio rozszczepiają substraty piroptotyczne, w tym GSDMD i pro-IL-1 $\beta$ ; (ii) hamowanie cysteinowych katepsyn może wpływać na intensywność śmierci piroptotycznej oraz uwalnianie cytokin; (iii) zestaw specjalnie zaprojektowanych inhibitorów katepsyn oraz sond aktywności, opracowanych metodologią HyCoSuL pozwoli uzyskać cząsteczki o wyjątkowej specyficzności wobec poszczególnych katepsyn; (iv) możliwe jest wygenerowanie wielowymiarowych map sieci sygnałowych piroptozy, łącząc aktywność katepsyn z dalszymi efektami funkcjonalnymi poprzez wykorzystanie cytometrii masowej. Doktorantka przeprowadziła wszystkie zaplanowane prace, realizując założone cele badawcze.

W rozdziale *Metody* Doktorantka szczegółowo opisuje wykorzystane w pracy techniki biologii komórki, chemii białek, spektrometrii mas oraz obrazowania żywych komórek. Opanowanie różnorodnych metod badawczych, obok uzyskania wartościowych wyników, jest jednym z zasadniczych celów stawianych pracom doktorskim. Rozdział ten świadczy o wszechstronności mgr inż. Kalinki. Mankamentem tej części pracy jest brak rozdziału poświęconego analizie statystycznej.

Rozdział dotyczący wyników jest bardzo obszerny, zawiera szereg wartościowych danych i bezsprzecznie wskazuje na ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę w badania objęte rozprawą. Opatrzony jest bogatą i staranną dokumentacją graficzną. Co ważne, na początku tego rozdziału Doktorantka zaznacza, które analizy wykonywane były przez innych badaczy lub we współpracy. Jednak ze względu na fakt, iż informacje te są kluczowe przy ocenie rozprawy, warto byłoby zaznaczyć wyraźnie (np. w opisie rysunków), które eksperymenty nie zostały przeprowadzone samodzielnie przez Doktorantkę.

Doktorantka wskazała rolę proteaz lizosomalnych w regulowanej śmierci komórkowej i pokazała, że piroptoza i śmierć komórkowa zależna od lizosomów zbiegają się we wspólnych punktach kontrolnych. Pokazała, że katepsyna S rozszczepia region łącznikowy GSDMD w pobliżu klasycznego miejsca cięcia przez kaspazę-1 oraz przetwarza pro-IL-1 $\beta$  i pro-IL-18, wytwarzając fragmenty porównywalne do produktów kaspazy-1. Jednocześnie zaobserwowała zależną od stężenia dwoistość działania: przy niskich stężeniach katepsyny prowadziły ograniczoną, miejscowo specyficzną proteolizę, podobną do działania kaspaz, natomiast przy wyższych stężeniach powodowały masową, degradacyjną proteolizę. Wyniki te wskazują, że po przedostaniu się do cytoplazmy katepsyny, szczególnie katepsyna S, są w stanie generować formy GSDMD-N tworzące pory oraz prowadzić do dojrzewania cytokin z rodziny IL-1 niezależnie od kaspazy-1.

Mgr inż. Kalinka wykazała, że wbrew modelom zakładającym pełną redundancję katepsyn, przebieg litycznej śmierci komórkowej w makrofagach zależy głównie od katepsyny B i kalpajny. Ponadto zastosowała specyficzne inhibitory oraz sondy ABP uzyskane poprzez strategię HyCoSuL do określenia funkcji poszczególnych katepsyn. Selektywne hamowanie katepsyn B, L i S ujawniło ich odmienne, nienakładające się role zależne od bodźca i kontekstu komórkowego. Profilowanie kinetyczne wykazało, że śmierć komórkowa indukowana poprzez LLOMe jest głównie zależna od katepsyn. Sondy ABP zapewniły przewagę funkcjonalną nad przeciwciałami, znakując wyłącznie katalitycznie aktywne enzymy, co umożliwiło wskazanie inhibitorów CatB-23 i CatB-24 jako skutecznych związków hamujących katepsyny B w makrofagach THP-1. W dalszej części rozdziału *Wyniki* Doktorantka skupiła się na analizie kinetyki działania kaspaz przy użyciu cytometrii TOF, która umożliwiła funkcjonalną analizę na poziomie pojedynczej komórki, wykraczającą poza samo barwienie przeciwciałami. Badania te pozwoliły uzyskać wgląd w przebieg zdarzeń proteolitycznych oraz identyfikację punktów przecięcia szlaków sygnałowych.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę uważam za niezwykle nowatorskie. Wykazała ona, że katepsyny nasilają i kształtują zapalną śmierć komórkową poprzez modyfikację substratów piroptotycznych (GSDMD, pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18) oraz poprzez zwiększenia uwalniania cytokin. W konsekwencji aktywność katepsyn może precyzyjnie regulować intensywność i czas trwania zapalnej śmierci komórkowej po uszkodzeniu błony lizosomalnej. Moje zastrzeżenie do tej części pracy dotyczy samego sposobu przedstawienia wyników. Każda analiza poprzedzona jest, w moim odczuciu, zbyt długim wstępem teoretycznym i omówieniem wyników innych badaczy. Informacje te powinny znaleźć się we Wstępie lub zostać przeniesione do sekcji *Dyskusja*. Te dodatkowe opisy utrudniają odbiór przedstawionych danych oraz niekiedy przysłaniają ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę.

Rozdział *Dyskusja* jest stosunkowo krótki, aczkolwiek napisany bardzo kompetentnie. Końcowe wnioski sformułowane są jasno, precyzyjnie i znajdują potwierdzenie w zaprezentowanych wynikach doświadczeń. W tym miejscu brakuje mi jednak schematu/rysunku podsumowującego wszystkie uzyskane w ramach doktoratu wyniki. Podczas publicznej obrony prosiłabym Doktorantkę o szersze omówienie aplikacyjnego znaczenia uzyskanych wyników oraz propozycji dalszych prac.

Ponadto prosiłabym Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących kwestii:

- 1) Na jakiej podstawie wybrano jako model eksperymentalny komórki THP-1? Czy nie należałoby zweryfikować uzyskanych danych w innych modelach komórkowych?
- 2) Proszę o wyjaśnienie efektu LPS, stosowanego w wielu eksperymentach.
- 3) Ile powtórzeń eksperymentalnych przeprowadzono dla poszczególnych eksperymentów? Dlaczego nie zastosowano analizy statystycznej? Co oznaczają słupki błędów na poszczególnych wykresach?
- 4) W jaki sposób (i przez kogo) uzyskano komórki pozbawione kaspazy-1 lub GSDMD?
- 5) Dlaczego w eksperymentach proteolitycznych nie zastosowano analizy densytometrycznej?
- 6) W jaki sposób wyznaczono parametry kinetyczne przedstawione w Tabeli 6?
- 7) Czy dane przedstawione na Rysunku 40 A, to te same dane, które widnieją na Rysunku 18?

Praca jest napisana i zilustrowana bardzo starannie. Autorka nie ustrzegła się jednak drobnych błędów interpunkcyjnych, typograficznych i stylistycznych. W Spisie skrótów brak konsekwencji w stosowaniu wielkich liter. Numeracja stron rozpoczyna się dopiero od

pierwszej strony Wstępu, z pominięciem Spisu treści oraz Wykazu skrótów. W Spisie treści nie zostało uwzględnionych kilka podrozdziałów (np. 1.1.4.1 i 1.1.4.2). W kilku miejscach w pracy pojawiają niefortunne sformułowania (np. „the subject of a cel death was born...”). Dane umieszczone w Tabeli 4, 5 i 6 w rozdziale 4.7 nie zostały skomentowane w tekście. W podpisach do rysunków brakuje informacji o liczbie powtórzeń oraz o analizie błędów. Pragnę jednak podkreślić, że są to nieznaczące uchybienia o charakterze edytorskim, niemające wpływu na wysoką wartość merytoryczną pracy.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Kalinki zatytułowanej „Dissecting the role of lysosomal proteases in programmed cell death” jest wysoce pozytywna. Praca ma charakter interdyscyplinarny, a uzyskane przez Doktorantkę wyniki uważam za niezwykle oryginalne i wartościowe. Mgr inż. Kalinka w ramach pracy doktorskiej wykonała bardzo dużo doświadczeń, opanowując przy tym szerokie spektrum technik eksperymentalnych z różnych dziedzin chemii, biochemii i biologii. Oceniana praca dokumentuje opanowany przez Panią magister inżynier warsztat, który z pewnością umożliwi jej w przyszłości prowadzenie samodzielnie badań naukowych.

W świetle przedstawionej powyżej oceny rozprawy doktorskiej wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Kalinki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Stwierdzam, iż przedstawiona praca spełnia wymogi określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571).), stawiane rozprawom doktorskim.

*Małgorzata Zakrzewska*