



Kraków, 27 lutego 2026

**WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII,
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
Prof. dr hab. Joanna Koziel**

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Małgorzaty Kalinki

Praca doktorska pani mgr inż. Małgorzaty Kalinki zatytułowana „*Dissecting the role of lysosomal proteases in programmed cell death*” wykonana została pod kierunkiem pana promotora prof. dr hab. Marcina Poręby z Wydziału Chemii, Politechniki Wrocławskiej. Jej celem było zdefiniowanie roli katepsyn w programowanej śmierci komórkowej. Autorka skupiła swoje badania na procesie pyroptozy, której egzekucja jest kluczowa w obronie immunologicznej, ale także prowadzi do rozwoju zapalenia. W swoich badaniach Doktorantka wykorzystwała wysoce specyficzne metody chemiczne umożliwiające precyzyjne zdefiniowanie roli poszczególnych enzymów lizosomalnych (inhibitory oraz ABP), które testowała w modelach *in vitro* bazujących na ludzkich komórkach linii mieloidalnej i nabłonkowej.

Rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim i obejmuje wstęp, cel pracy, rozdział opisujący zastosowane metody, wyniki wykonanych doświadczeń, dyskusję oraz wnioski końcowe, które stanowią krótkie podsumowanie najistotniejszych według oceny Doktorantki wyników. W pracy Autorka odwołuje się do 468 pozycji literaturowych. Opracowanie nie zawiera streszczenia. Wstęp pracy szeroko opisuje rodzaje śmierci komórkowych, przebieg tych procesów z uwzględnieniem zmian molekularnych na poziomie komórki. Doktorantka z dużą szczegółowością opisuje, badane w części doświadczalnej pracy programowane procesy śmierci komórkowej, zwłaszcza takie jak pyroptoza oraz lizosomalna śmierć komórki, czynniki które mogą ją indukować, a ostatecznie enzymy, których rola w powyższych procesach została dotychczas udokumentowana, włączając w to rozbudowany opis roli katepsyn. Wstęp zamyka opis metodologii cytometrii mas, możliwości i zalety jego wykorzystania do badań prowadzonych w ramach przedstawionej rozprawy. Należy podkreślić, że wstęp stanowi bardzo solidne opracowanie bazujące na bieżącej literaturze i dowodzi dużego zrozumienia tematu przez Doktorantkę. Aby ułatwić lekturę Autorka przygotowała

stosowne ryciny i tabele, które ułatwiają śledzenie procesów przebiegu opisywanych śmierci komórkowych. Ta część pracy stanowi bardzo dobre opracowanie i jest doskonałym materiałem wyjściowym do przygotowania pracy przeglądowej. Podobnie wysoko oceniam Cel pracy, który został jasno sformułowany i precyzuje główne założenie realizowanych badań. Doktorantka także w tej części odnosi się do danych literaturowych w trosce o właściwe zrozumienie założeń prowadzonych badań. Kolejna część pracy pani Kalinki opisuje metodologię badań i wykorzystane materiały. Niestety jest ona niepełna. Nie znajdziemy informacji na temat pochodzenia wyjściowej linii komórkowej THP-1 oraz tych zmodyfikowanych genetycznie, opisu metodologii pozyskania linii pozbawionych ekspresji poszczególnych enzymów oraz informacji o wydajności procesu wyciszania. To znaczący zarzut, bowiem większość badań przedstawionych w rozprawie bazuje na wykorzystaniu wspomnianych komórek mieloidalnych. Podobnie brakuje informacji o stosowanym modelu komórek HEK-293T z nadekspresją gasderminy. Podczas obrony proszę o przedstawienie metodologii otrzymania stosowanych linii eukariotycznych. Proszę również o informację czy pozbawienie ekspresji gasderminy i kaspazy-1 skutkuje zmianą w procesie różnicowania komórek THP-1 pod wpływem PMA. Niespójny jest także przekaz informujący o różnicowaniu komórek, miejscami czytelnik może się jedynie domyślać przebiegu procedury. Ze względu na sekwencyjne traktowanie komórek THP-1 różnymi czynnikami niewątpliwym ułatwieniem byłoby przygotowanie schematów stymulacji. Cennym byłaby większa spójność i precyzja opisu, przykładowo wyrażanie stosowanych stężeń w jednej jednostce czy zdefiniowanie terminów np. „low-passage”, który po pierwsze niewiele mówi, a po drugie czytelnik może nie rozumieć jakie konsekwencje ma wykorzystanie wczesnego pasażu do badań. Proszę o wyjaśnienie podczas obrony. Opis wyników jest prawidłowy. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń zostały przedstawione w logicznej kolejności. To duży atut ocenianej pracy, bo Doktorantka podjęła się ambitnej roli wieloczynnikowej analizy procesu śmierci komórkowej stosując różnorodne induktory śmierci komórkowej, inhibitory poszczególnych szlaków czy konkretnych enzymów. Lekturę tekstu ułatwiłoby staranniejsze podpisanie Rycin, ponumerowanie poszczególnych paneli (A, B, C, etc.) oraz umieszczenie odniesień do nich w tekście pracy. Podobnie ułożenie paneli w kolejności opisywania wyników (Ryc. 21). Identyfikacja wzoru zmian molekularnych w komórkach THP-1 po stosowaniu poszczególnych stymulatorów śmierci komórkowej (Ryc. 17) jest doskonałym zabiegiem wprowadzającym czytelnika w zakres prowadzonych analiz. Czy nie byłoby jednak cennym

umieszczenie już w tym miejscu profilu zmian w sekretomie, który jest opisywany i analizowany w kolejnych częściach pracy np. Ryc. 19, 20 itp.? Pominięto analizę statystyczną, choć istotność poczynionych obserwacji jest wielokrotnie wspomniana w tekście. W pracy nie znajdziemy analizy statystycznej na Ryc. 37, 43, 45 itp. Nasuwa się zatem pytanie, ile razy było wykonywane każde oznaczenie prezentowane w pracy. Opracowanie ABP do badań procesu śmierci komórkowej i roli enzymów lizosomalnych stanowi perspektywę do dalszych badań w tym obszarze. Nasuwa się tu kilka pytań. Czy identyfikacja aktywności enzymów zależy od kompartmentu komórkowego, zwłaszcza jeśli jego aktywność nie jest determinowana zmiennym pH? Czy można wykorzystać opracowane ABP wraz z przeciwciałami do jednoczesnej identyfikacji subkomórkowej lokalizacji katepsyn z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej – analogicznie do Ryc. 38, w której wykorzystano technikę Western blot? Rozdział nr 4.7. stanowią 3 tabele nie znajdziemy tam jednak żadnego opisu – w tym stanie rzeczy powinny się one znaleźć w suplemencie lub w sekcji materiały. Autorka wspomina o konieczności jednoczesnego lub równoległego wykorzystania w przyszłych badaniach dedykowanych, wysoce selektywnych inhibitorów katepsyn i kalpain wraz z modelami bazującymi na technikach inżynierii genetycznej. Biorąc pod uwagę zidentyfikowaną w rozprawie rolę katepsyny B oraz kalpainsy w egzekucji litycznej śmierci komórkowej indukowanej LLOM czy należy rozważać jednoczesne wyciszenie aktywności i ekspresji obydwu enzymów? Wykonana analiza cytometrii mas jest niewątpliwym atutem pracy definiując globalny profil zmian. Biorąc jednak pod uwagę analizę wykonaną na komórkach THP-1 po stymulacji nigerycyną i LLOM ciężko wnioskować o wspomnianych przez Doktorantkę zmianach przyczynowo-skutkowych, w których wiodącą rolę odgrywają katepsyny. Opracowanie tej metody stanowi jednak bardzo cenny przyczynek do dalszych badań. Dyskusja choć krótka jest wyczerpująca, ale należy podkreślić, że Doktorantka opisując wyniki swoich badań (rozdział Wyniki) wielokrotnie odnosiła się do danych literaturowych i podejmowała próby wyjaśnienia swoich obserwacji. Ponadto z lektury tekstu wynika, że Doktorantka ma szeroka wiedzę i dostrzega znaczenie oraz perspektywę swoich odkryć. W tym świetle dyskusję otrzymanych wyników można uznać za bardzo solidną. Po jej lekturze nie mam wątpliwości, że Doktorantka ma świadomość złożoności prowadzonych badań, ograniczeń wynikających z niedoskonałości stosowanych metod, cross-talku w obrębie badanych ścieżek przekazu sygnału komórkowego oraz współdziałania lub dominacji wybranych enzymów.

W prezentowanej rozprawie Doktorantka podsumowała także swoją aktywność naukową. Wyszczególniła liczbę publikacji doświadczalnych, których jest lub będzie współautorem, swój udział w konferencjach naukowych oraz zaangażowanie w projektach. Te informacje wskazują na dodatkowe, aktywne zaangażowanie naukowe Doktorantki.

Podsumowując recenzję niniejszej dysertacji, która ma charakter interdyscyplinarny, pragnę podkreślić, że autorka w pełni zrealizowała zaplanowane cele stosując liczne, adekwatne do potrzeb metody, co dowodzi, że dobrze opanowała niezbędny warsztat badawczy. Doktorantka pogłębiła naszą wiedzę na temat roli enzymów lizosomalnych w przebiegu procesu śmierci komórkowej. Udowodniła, że w przebiegu pyroptozy katepsyna S jest istotna w obróbce proteolitycznej interleukin z rodziny IL-1 (pro-IL-1b oraz pro-IL-18), zaś w procesie zależnej od lizosomu śmierci komórkowej odkryła znaczenie aktywności katepsyny B i kalpajny. Warto podkreślić wysoką wartość naukową przeprowadzonych badań i ich znaczenie, zwłaszcza w dobie wzrostu przypadków chorób o podłożu zapalnym w populacji. Uzyskane wyniki są nowatorskie, zwracają uwagę na rolę enzymów lizosomalnych w regulacji śmierci komórkowej. Stosowane i opracowane narzędzia otwierają nowe możliwości badań nad procesem śmierci komórkowej. Praca ta stanowi bardzo dobre dzieło, które udowadnia dojrzałość naukową Doktorantki. Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia zatem kryteria formalne wymagane dla tego typu prac, czyli warunki 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). Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Małgorzaty Kalinki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Joanna Kozieł