

dr hab. Damian Plażuk, prof. UŁ

Łódź, dn. 10.01.2025

Pracownia Spektroskopii Molekularnej

Wydział Chemii

Uniwersytet Łódzki

ul. Tamka 12

91-403 Łódź

e-mail: damian.plazuk@chemia.uni.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Natalii Horbach

zatytułowanej

"Investigation of the role of calpain-1 in the process of pyroptosis using selective chemical tools"

złożonej do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej.

Rozprawa doktorska pani mgr inż. Natalii Horbach została zrealizowana pod kierunkiem promotora Marcina Poręby, PhD, DSc, Eng, prof. PWr na Politechnice Wrocławskiej.

Celem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej jest zbadanie roli kalpains-1 w pyroptozie. Problemem badawczym, którego rozwiązania podjęła się Doktorantka, było opracowanie selektywnego narzędzia do wykrywania i badania aktywności kalpains-1 w procesie apoptozy i pyroptozy. O ile rola kalpains-1 w apoptozie jest dobrze poznana, to jej rola w pyroptozie pozostaje znacznie słabiej zbadana. Taki dobór tematyki badawczej świadczy o dobrym rozpoznaniu literatury i stanowi interesujący obszar badawczy.

Doktorantka jest współautorką publikacji w czasopiśmie Plant Cell., opublikowanej w 2024 roku. Kolejna praca, w której mgr inż. Horbach jest pierwszą autorką, znajduje się w recenzji - zgodnie z informacjami zawartymi w rozprawie. Doktorantka brała udział w trzech projektach badawczych finansowanych ze źródeł zewnętrznych (NCN). Wyniki swoich badań prezentowała na jednej konferencji krajowej oraz na dwóch konferencjach międzynarodowych.

Przedstawiona rozprawa doktorska jest rozprawą klasyczną, która powstała w oparciu o starannie zaplanowane i przeprowadzone badania. Rozprawa doktorska liczy 213 stron, zawiera kluczowe elementy, takie jak część teoretyczna, eksperymentalna, omówienie wyników i wnioski. Struktura rozprawy jest logiczna, a proporcje między rozdziałami są prawidłowo zachowane.

W pierwszej części swojej rozprawy mgr inż. Natalia Horbach obszernie i znacznej mierze wyczerpująco przedstawia tematykę śmierci komórki. W tej części Autorka szczegółowo omawia różne rodzaje śmierci komórki, opisuje ich mechanizmy, metody wykrywania, rolę w organizmie w warunkach fizjologicznych i patologii, a także możliwość wykorzystania w terapiach. Autorka skupia się przede wszystkim na apoptozie i pyroptozie oraz ich wzajemnych interakcjach, natomiast pozostałe formy śmierci komórki opisane zostały mniej szczegółowo, co jest zrozumiałe i prawidłowe w kontekście zakresu badań stanowiących podstawę rozprawy. W części literaturowej Autorka opisała również szczegółowo proteazy

co umożliwia zapoznanie się z ich klasyfikacją, mechanizmem działania oraz rolą w komórce. Następnie Doktorantka przechodzi do omówienia kalpain, należących do proteaz cysteinowych zależnych od wapnia, przedstawiając ich strukturę, funkcje i związki ze stanami patologicznymi organizmu oraz ich znaczenie w terapii. Kolejna istotna dla czytelnika część pracy dotyczy sposobu profilowania specyficzności substratowej proteaz. Autorka przybliży tu metodę PS-SCL (Positional Scanning Synthetic Combinatorial Libraries) oraz HyCoSuL (Hybrid Combinatorial Substrate Libraries). Ta część pracy, będąca przeglądem literatury (łącznie 215 pozycji), stanowi znakomitą podstawę do zrozumienia dalszych rozdziałów rozprawy doktorskiej.

Ważnym elementem rozprawy jest precyzyjne określenie celu pracy, który został prawidłowo sformułowany a droga do jego osiągnięcia została starannie zaplanowana i zrealizowana.

W rozdziale „*Experimental section*” Doktorantka przedstawiła szczegółowy opis prowadzonych badań. Rozdział ten został przygotowany bardzo starannie, zarówno w zakresie syntezy związków, jak i metodologii badań biologicznych. Niektóre badania wykonane zostały z pomocą innych badaczy z zespołu co Autorka rzetelnie zaznaczyła. Badania zaplanowano w sposób logiczny, a ich realizacja stanowi spójną i przemyślaną całość. Zastosowana metodologia jest prawidłowa i pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników. Syntezy substratów oraz związków docelowych opisano szczegółowo. Badania biologiczne wykonano w przynajmniej trzech powtórzeniach.

Mgr inż. Horbach rozpoczęła prace od syntezy znacznika fluorescencyjnego ACC. Związek ten otrzymano, w kilku etapach, z bardzo dobrą wydajnością wychodzą z 3-aminofenolu. Z uwagi na dużą skalę prowadzonych reakcji nasuwa się pytanie, czy powstający w pierwszy etapie chlorowoderek 3-aminofenolu, który jest usuwany z mieszaniny poreakcyjnej poprzez odsączenie, był odzyskiwany? Stosując otrzymany znacznik Fmoc-ACC-OH, Doktorantka zsyntezowała bibliotekę 142 fluorogenicznych substratów, zawierających jeden z naturalnych lub nienaturalnych aminokwasów w pozycji P1 w substracie Ac-All-Arg-Leu-P1-ACC. Sekwencję pozycji P4-P3-P2 wybrano na podstawie danych literaturowych. Otrzymane związki poddano badaniom profilowania specyficzności substratowej kalpaina-1 w pozycji P1. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazały na preferencję aminokwasów hydrofobowych o konfiguracji L (zarówno naturalnych takich jak tyrozyna (Tyr), fenyloalanina (Phe)), jak i nienaturalnych (np. biphenyloalanina (Bip), pochodna benzofenonu (Bpa), O-benzylotyrozyna (Try(Bzl) i Tyr(2,6-CI-Bzl)) oraz 4-halogenofenyloalanina (Phe(4I) i Phe(4Br)). Zaobserwowano również, że kalpaina-1 toleruje aminokwasy z zasadowym łańcuchem bocznym, takie jak arginina (Arg) i lizyna (Lys). W kolejnym etapie Doktorantka wykorzystwała technologię HyCoSuL do profilowania

specyficzności substratowej kalpeiny-1 w pozycjach P4-P2. W tym celu zsyntezowała bibliotekę fluorogenicznych substratów zawierających w pozycji P1 fenyloalaninę (Ac-X-X-X-Phe-ACC) i argininę (Ac-X-X-X-Arg-ACC), oraz zdefiniowane naturalne i nienaturalne aminokwasy w ustalonej pozycji P4 lub P3 lub P2 i równomolowe ilości naturalnych aminokwasów w pozostałych pozycjach. Wyniki dla biblioteki z Phe w pozycji P1 wskazały, iż najwyższą aktywność w pozycji P2 wykazują naturalne aminokwasy z rozgałęzionym łańcuchem bocznym takie jak leucyna (Leu) czy walina (Val) oraz nienaturalne, takie jak norwalina (Nva), kwas aminomasłowy (Abu) i homoseryna (hSer). Zbliżone rezultaty uzyskano dla biblioteki z argininą (Arg) w pozycji P1. Doktorantka wykazała, że najwyższą aktywność w pozycji P3 wykazuje nienaturalny aminokwas fenyloglicyna (Phg) a także duże hydrofobowe aminokwasów takich jak L-Dab(Z) czy homotyrozyna (hTyr). Ponadto, kalpaina-1 dobrze tolerowała mniejsze i średnie aminokwasy. Spośród naturalnych aminokwasów najwyższą aktywność wykazywała lizyna (Lys), oraz w mniejszym stopniu, polarne i naładowane aminokwasy. Doktorantka wykazała także, że obecność argininy w pozycji P1 dodatkowo poszerza zakres tolerowanych aminokwasów w pozycji P3 również o D-aminokwasy. Autorka wykazała także, że pozycja P4, podobnie jak P3, cechuje się niską specyficznością z preferencją dużych podstawników aromatycznych, takich jak tryptofan (Trp), Lys(2ClZ), 2-naftyloalanina (2Nal), 1- naftyloalanina (1Nal) i bifenyloalanina (Bip).

Na podstawie uzyskanych wyników mgr inż. Horbach zaprojektowała i zsyntezowała kolejną bibliotekę fluorogenicznych substratów zawierających najlepiej rozpoznawane aminokwasy w pozycjach P1 (Tyr) oraz P2 (Leu). Doktorantka wykazała, że obecność tryptofanu (Trp) w pozycji P4 oraz leucyny (Leu) w pozycji P3 jest kluczowe dla wysokiej specyficzności substratu dla kalpainy-1. Analiza kinetyczna ujawniła trudność w odróżnieniu aktywności kalpainy-1 od proteasomu 20S i katepsyny L. Zastosowanie technologii HyCoSuL z wykorzystaniem naturalnych i nienaturalnych aminokwasów umożliwiło opracowanie substratów dla kalpainy-1, z których Ac-1Nal-hTyr-Leu-Tyr-ACC i Ac-Trp-Leu-Leu-Tyr-ACC okazały się najbardziej aktywnymi i selektywnymi substratami.

W kolejnym etapie Doktorantka wykorzystwała zdobytą wiedzę do zaprojektowania inhibitorów kalpainy-1 zawierających grupę acyloksymetyl ketonu (AOMK) jako „głowicy bojowej”. Wybór tej grupy został dobrze uzasadniony. Spośród 21 zsyntezowanych związków mgr inż. Horbach zidentyfikowała dwa o najwyższej skuteczności hamowania, NHI-17 (Ac-1Nal-hTyr-Leu-Tyr-AOMK) i NHI-18 (Ac-Tyr-Phg-Leu-Tyr-AOMLK).

Następnie wykorzystując otrzymane związki o najwyższej aktywności hamującej, zsyntezowano fluorescencyjne koniugaty jako sondy aktywności (ABPs). Pomimo, iż zadanie to okazało się trudniejsze

niż zakładano, opracowane przez Doktorantkę fluorescencyjne sondy ABPs dla kalpainy-1 pozwoliły na oznaczanie aktywnego enzymu, odróżniając formę katalitycznie aktywną od form nieaktywnych. Dalsze badania wykazały, że sonda NH-ABP-1 wiązała się specyficznym z kalpainą-1, nie wpływając na aktywność proteasomu 20S. Przydatność sondy NH-ABP-1 do znakowania aktywnej formy kalpainy-1 (75 kDa) potwierdzono w badaniach z wykorzystaniem linii komórkowej THP-1.

Następnie Doktorantka wykorzystowała cytometrię masową (CyTOF) do kompleksowej analizy aktywności kalpainy-1 na poziomie pojedynczych komórek układu odpornościowego. Dzięki tej technice śledzono aktywność i ekspresję kalpainy-1 w różnych typach leukocytów, w tym monocytach, neutrofilach i limfocytach, w odpowiedzi na napływ jonów wapnia. Doktorantka wykazała, że kalpain-1 jest zlokalizowana głównie w eozynofilach. Lokalizacja kalpainy-1 w eozynofilach i neutrofilach wskazuje na jej kluczową rolę w procesach zapalnych związanych z alergiami, infekcjami i przewlekłym stanem zapalnym. Z kolei jej ograniczona obecność w monocytach sugeruje bardziej wyspecjalizowaną funkcję w aktywacji i regulacji układu odpornościowego. Te wyniki podkreślają potencjał kalpainy-1 jako celu terapeutycznego w chorobach związanych z nadmiernym lub przewlekłym zapaleniem, takich jak choroby autoimmunologiczne, alergiczne i przewlekłe infekcje. Następnie zbadano ekspresję kalpainy-1 w jądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMCs) pozbawionych neutrofilów i eozynofili. Doktorantka potwierdziła, że kalpain-1 jest obecna głównie w monocytach, a w mniejszym stopniu także w limfocytach B i T. Wyniki te dostarczają nowych informacji na temat lokalizacji kalpainy-1 i jej możliwych ról w populacjach komórek PBMCs. Doktorantka wykazała, iż kalpain-1 odgrywa kluczową rolę w regulacji ścieżek śmierci komórkowej w neutrofilach, szczególnie poprzez szlak kaspazy-1/GSDMD (gasdermina D), promując pyroptozę. Doktorantka stosując opracowaną przez siebie sondę ABPs, zbadła aktywność kalpainy-1 w neutrofilach, odkrywając dodatkowo aktywną formę kalpainy-1 o masie 40 kDa.

W kolejnym etapie swoich badań Doktorantka zbadła rozszczepienie gasderminy-D przez kalpainę-1 wykorzystując wewnętrznie wygaszone (ang. internally quenched fluorescent IQF) substraty. Wykazała, że gasdermina D jest rozszczepiana przez kalpainę-1 w innych miejscach niż w przypadku kaspazy-1. Dodatkowe eksperymenty z wykorzystaniem linii komórkowej THP-1 oraz jej wariantu z wyłączonym genem kaspazy-1 potwierdziły to spostrzeżenie. Odkrycie to zasługuje na szczególne podkreślenie, ponieważ wykazuje na udział kalpainy-1 w pyroptozie.

W rozdziale *Conclusion* Autorka podsumowała najważniejsze z uzyskanych wyników, omawiając także ich ograniczenia oraz wskazując kierunek przyszłych badań.

Nieliczne i drobne uchybienia edytorskie nie umniejszają ani osiągnięć, ani wartości merytorycznej pracy. Z obowiązku recenzenta wymienię kilka z nich. Na przykład, na stronie 19 niepoprawnie sformatowano skrót czasopisma, jest „Nat Rev Immunol.” a powinno być „Nat. Rev. Immunol.” Niepoprawnie użyto nazwę „phosphorus pentoxide (P₂O₅)” (str. 50). Ponadto w Figurze 6 przedstawiającej mechanizm hydrolizy peptydu przez proteazę cysteinową, pojawił się błąd. Mianowicie, w jednym z etapów nukleofilowy atom tlenu z cząsteczki wody powinien atakować elektrofilowy atom węgla grupy COS, a nie atom tlenu grupy karbonylowej. Proszę także o komentarz do kopii widma MS zaprezentowanej na stronie 76. Obliczona wartość m/z dla tego związku to 843,91 zaś w widmie widoczny jest pik o m/z = 813,35.

Uwzględniając merytoryczną i poznawczą wartość pracy, jej wymiar naukowy, wykład w rozwój dyscypliny oraz staranne przedstawienie wyników, stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Horbach całkowicie **spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. 2018 poz. 1571)**. Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie pani mgr inż. Natalii Horbach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką jakość naukową przedstawionej rozprawy, zastosowane rozwiązanie problemu badawczego i w mojej opinii duży wpływ na rozwój dyscypliny, wnoszę o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Natalii Horbach.

Damian Płażuk
KIEROWNIK
PRACOWNI SPEKTROSKOPII MOLEKULARNEJ
Wydział Chemii UŁ



dr hab. Damian Płażuk, prof. UŁ