



Kraków, 15 stycznia 2025

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

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Natalii Horbach**

Praca doktorska pani mgr inż. Natalii Horbach zatytułowana „*Investigation of the role of calpain-1 in the process of pyroptosis using selective chemical tools*” wykonana została pod kierunkiem pana promotora prof. dr hab. Marcina Poręby z Wydziału Chemii, Politechniki Wrocławskiej. Stanowi ona kompleksowe opracowanie narzędzi badawczych służących do identyfikacji obecności i aktywności kalpains-1, ograniczenia aktywności enzymatycznej tego białka, jego lokalizacji tkankowej i komórkowej. Ponadto przedstawia ocenę roli biologicznej kalpains-1 w leukocytach podczas przebiegu procesu śmierci komórkowej zwanego pyroptozą.

Rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim. Ma układ standardowy i obejmuje wstęp, cel pracy, rozdział opisujący zastosowane metody, wyniki wykonanych doświadczeń wraz z dyskusją. Ponadto zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, spis literatury oraz konkluzje, które stanowią krótkie podsumowanie najistotniejszych według oceny Doktorantki wyników. Pracę rozpoczyna dobrze przemyślany i skonstruowany wstęp, w którym Doktorantka opisuje biologiczną rolę kalpains-1, jako enzymu, którego rola została dotychczas opisana w regulacji procesu śmierci komórkowej. Z tego względu w tej części pracy opisano szczegółowo poznane dotychczas rodzaje śmierci komórkowej, ich rolę w procesach fizjologicznych i w stanach patologicznych, metody oceny ich przebiegu, wykorzystanie terapeutyczne tej wiedzy oraz perspektywy/kierunki dalszych badań naukowych w tym temacie. Tu brakuje moim zdaniem informacji na temat netozy, unikatowej dla neutrofilów śmierci komórkowej będącej często zwieńczeniem formowania przez te komórki pułapek neutrofilowych (NETs). Ten aspekt wydaje się istotnym, ponieważ w dalszej części pracy autorka wdraża badania nad śmiercią komórkową właśnie tych leukocytów. We wstępie znajdziemy także podrozdział poświęcony proteazom ze szczególnym uwzględnieniem kalpains jako białek o aktywności enzymatycznej, których rolę identyfikuje się w chorobach

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48 (12) 664 6377

email: joanna.koziel@uj.edu.pl

neurodegeneracyjnych, nowotworach, dystrofii mięśniowej i chorobach układu krążenia. Ostatecznie, wstęp zamyka tekst opisujący profilowanie aktywności enzymatycznej białek. Tu autorka pracy przedstawia stosowane metody badawcze z określeniem ich zalet i ograniczeń. Ponadto opisuje metody opracowania narzędzi służących do badań enzymów, takich jak substraty, inhibitory czy sondy oparte o aktywność enzymatyczną tych białek. Rozdział ten jest bardzo wartościowy dla czytelnika, zwłaszcza ze względu na interdyscyplinarny charakter pracy, bowiem umożliwia dogłębne zrozumienie tematyki badań. Dodatkową zaletą jest ubogacenie go o Ryciny (14) i Tabele (3) ułatwiające przyswojenie tekstu pracy. Tu mam uwagę dotyczącą braku kompatybilności niektórych Rycin z tekstem pracy, bowiem na kilku z nich np. Rycina 1, 4 oraz 8 znajdziemy elementy nie wspomniane w tekście pracy oraz także nie opisane w legendzie. W ten sposób, przekaz skierowany do czytelnika nie jest kompletny. Pomimo powyższej uwagi ta część pracy stanowi bardzo dobre opracowanie i może stanowić doskonały materiał wyjściowy do przygotowania pracy przeglądowej. Cel pracy następujący po „Wstępie” został jasno sformułowany i precyzuje główne założenie realizowanych badań, jakim jest opracowanie selektywnych narzędzi do identyfikacji i oceny aktywności kalpainy-1, które znajdują zastosowanie w badaniach śmierci komórkowej. W tym miejscu warto podkreślić istotną rolę naukową takich badań. Dzięki nim bowiem i narzędziom wypracowanym w ich toku mamy szansę na poznanie roli biologicznej proteaz. Selektywność i czułość takich narzędzi jest niezbędna do precyzyjnego określenia nie tylko znaczenia tych enzymów, ale także modulacji ich działania, co może mieć wartość terapeutyczną. Ponieważ proces śmierci komórkowej, a zwłaszcza jego zaburzony przebieg identyfikuje się w licznych procesach chorobowych człowieka, zatem narzędzia identyfikujące jednoznacznie rolę kalpainy-1 i wpływające na aktywność tego enzymu mają szansę na wykorzystanie terapeutyczne. Kolejna część pracy pani Horbach opisuje szczegółowo metodologię badań. Tu również Doktorantka przedstawia bogate zobrazowanie metod w postaci Rycin (14) i Tabel (12). Uważam, że ta część pracy również została przygotowana z dużą starannością. Nie zamieszczono jednak informacji o metodologii pozyskiwania mysiej i ludzkiej gasderminy D o czym wspomniano na stronie 50 tego rozdziału. Opis wyników realizowanych doświadczeń połączono z dyskusją. W tej części pracy należy podkreślić logikę prowadzenia badań i w konsekwencji prezentowanego przez Doktorantkę wyводу. Autorka pracy zadbała, aby każdorazowo uzasadnić cel realizowanych kroków badawczych, a co istotne także o to, aby zamknąć poszczególne odkrycia związłymi i celnymi konkluzjami. Opis wyników jest bardzo

przejrzysty, ale co kluczowe prawidłowy. Zostały one przedstawione w czytelny i staranny sposób. W tej części pracy Doktorantka opisała badania, dzięki którym określiła specyficzność substratową z wykorzystaniem kombinatorycznej biblioteki substratów fluorescencyjnych. To doprowadziło do najistotniejszego osiągnięcia prezentowanej pracy, którym jest opracowanie selektywnych substratów, wydajnych, selektywnych i nieodwracalnych inhibitorów oraz sond aktywności enzymatycznej, które mogą zostać wykorzystane do badań biomedycznych nad kalpainą-1. Co warto podkreślić, narzędzia te umożliwiają odróżnienie aktywności badanego enzymu od pozostałych, takich jak podjednostka 20S proteasomu, czy katepsyn. Bardzo cennym aspektem prezentowanej pracy jest udowodnienie użyteczności opracowanych narzędzi z wykorzystaniem linii komórkowej monocytów ludzkich THP-1, leukocytów krwi obwodowej izolowanych od dawców krwi oraz oczyszczonej frakcji neutrofilii ludzkich. Należy podkreślić staranność w planowaniu badań, właściwy dobór metod i stosownych kontroli. Do tej części tekstu pracy nasuwa się kilka komentarzy:

- Rycina 34 – na jej podstawie ciężko wyciągnąć wniosek, aby norleucyna (Nle) była bardziej preferencyjnie rozpoznawanym aminokwasem w pozycji P2
- str. 169 – Doktorantka stwierdza, że potwierdziła indukcję pyroptozy indukowaną nigeryciną poprzez identyfikację proteolizy gasdeminy D – takich wyników w pracy nie zaprezentowano, odniesiono się do referencji
- proszę wyjaśnić na czym polega zasada oceny żywotności komórek, którą Doktorantka opisuje w procedurze CyTOF po utrwaleniu komórek – str. 109, jaka jest podstawa molekularna odróżnienia komórek martwych od żywych?
- str. 110 – 112 – nie opisano metody liczenia neutrofilii oraz oceny ich czystości i żywotności po izolacji – proszę o uzupełnienie tych informacji
- Rycina 58 – czy na podstawie wykonanych analiz CyTOF można ocenić procent komórek wykazujących wiązanie przeciwciał rozpoznających kalpainę-1 i gasderminę D, czy można ocenić kolokalizację tych dwóch białek w poszczególnych komórkach i określić procent komórek ją wykazujących?
- tu nasuwa się ogólne pytanie, czy wyniki przeprowadzonej w pracy analizy CyTOF, zwłaszcza zaprezentowane na Rycinach 54, 57, 58 można przedstawić w sposób ilościowy przypisując intensywność sygnału pochodzącego przykładowo od kalpains-1 do poszczególnych populacji leukocytów?

- czy specyficzność badanych ABP w stosunku do innych proteaz była oceniana w modelu ludzkich neutrofilów? Jak można by przeprowadzić taką analizę?
- nie dostrzegłam w pracy informacji na temat pochodzenia komórek THP-1 pozbawionych kaspazy-1 str. 191. Nie podano referencji albo wyników potwierdzających brak tego białka w stosowanym modelu.

Prezentowane wyniki zostały dojrzałe przedyskutowane. Ponadto z lektury tekstu wynika, że Doktorantka ma szeroka wiedzę i dostrzega znaczenie oraz perspektywę swoich odkryć, choć brak w niektórych fragmentach pracy odnośników literaturowych do opisywanych prac (str. 145, 147, 160). Nawiązując do dyskusji wyników Doktorantka bardzo słusznie zauważyła, że częściowa proteoliza GSDMD przez kalpainę-1 może wskazywać na komórkowy mechanizm regulacyjny. Chciałabym zatem spytać, jakie scenariusze badań mogłaby zaproponować doktorantka, aby zweryfikować tę hipotezę? Wyjątkowo ciekawą obserwacją, która może mieć niezwykle cenne znaczenie kliniczne jest identyfikacja obecności kalpains-1 w eozynofilach. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować dalszy ciąg badań zmierzający do określenia roli badanego enzymu w tych komórkach? Jak wykorzystać tę wiedzę? Pracę więc zają konkluzje, które zwięźle i bardzo celnie podsumowują osiągnięcia prezentowanej pracy. Ta część rozprawy, choć krótka jest bardzo dobrze przemyślana i właściwie zredagowana.

Z błędów edytorskich można wymienić:

- powtórzenia pewnych stwierdzeń w tekście wstępu, np. o molekularnym oddziaływaniu kalpains z błoną komórkową i skutkach tego procesu (str. 18 i 19),
- w Tabeli 2, str. 25 brak informacji o proteazach treoninowych, co opisano w legendzie do tej tabeli
- błędny opis na Rycinie 11, w miejscu P2 zaznaczono P4
- nieczytelna, o słabej rozdzielczości Rycina 20 na stronie 65 oraz częściowo Tabela 10 na stronie 122
- pojedyncze błędy językowe, literowe, interpunkcyjne w głównej części pracy
- liczne błędy językowe w polskim streszczeniu pracy

Są to jednak drobne niedociągnięcia, których ciężko uniknąć przy tak rozbudowanej rozprawie i nie umniejszają one wartości pracy.

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, którego beneficjentem jest Promotor ocenianej pracy. Te informacje wskazują na dodatkowe, aktywne zaangażowanie naukowe Doktorantki.

Podsumowując recenzję niniejszej dysertacji pragnę podkreślić, że autorka w pełni zrealizowała zaplanowane cele stosując liczne, adekwatne do potrzeb metody, co dowodzi, że dobrze opanowała niezbędny warsztat badawczy. Jest to tym cenniejsze, że praca ma charakter interdyscyplinarny. Warto podkreślić wysoką wartość naukową przeprowadzonych badań i ich aktualność w sferze potrzeb klinicznych. Uzyskane wyniki bezsprzecznie są nowatorskie i otwierają nowe możliwości badań nad kalpainą-1. Praca ta stanowi bardzo dobre dzieło, które udowadnia dojrzałość naukową Doktorantki. Oceniam ją bardzo wysoko. 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. Natalii Horbach do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto uznaję rozprawę doktorską za godną nagrodzenia.

Dr hab. Joanna Koziół, prof. UJ