



Prof. dr hab. Maciej Szaleniec
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
Im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk

**Recenzja pracy habilitacyjnej dr inż. Wioletty Rut
pt. „Obrazowanie aktywności proteaz wirusowych za pomocą selektywnych narzędzi chemicznych”**

Wstęp

Recenzja pracy habilitacyjnej dr inż. Wioletty Rut pt. „**Obrazowanie aktywności proteaz wirusowych za pomocą selektywnych narzędzi chemicznych**” jest wykonywana w oparciu o przepisy zawarte w rozdziale 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz 742). Według przedstawionego przez habilitanta autoreferatu, kandydatka nie ubiegał się wcześniej o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Przebieg pracy naukowo-zawodowej

Pani dr inż. Wioletta Rut od początku kariery jest związany z Wydziałem Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, gdzie ukończył studia inżynierskie (01.2012), magisterskie (06.2013) jak i doktoranckie (01.2018). Promotorem jej pracy magisterskiej oraz doktorskiej był prof. Marcin Drąg. Od maja 2016 roku pani dr Rut była zatrudniona na Wydziale Chemicznym PW, początkowo na stanowisku asystentki w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, a następnie w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania. Od 10.2021 pracuje na stanowisku adiunkta badawczo-dydaktycznego.

W lipcu 2022 pani dr inż. Wioletta Rut odbyła staż w Pracowni Neurobiologii Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie o bliżej nieokreślonej długości. W dokumentacji habilitantki brak informacji o jakichkolwiek innych wyjazdach naukowych.

Informacje o osiągnięciu i dorobku habilitantki

Przedstawiona mi do recenzji praca habilitacyjna jest monotematycznym cyklem 6 publikacji, z czego 5 artykułów opublikowano w czasopiśmie z listy JCR zaś jeden jest rozdziałem książkowym typu protokół badawczy zamieszczonym w książce z serii „Methods in Molecular Biology” (Springer Protocols).

Cykl opublikowany został w czasopiśmie chemicznych z najwyższej półki reprezentujących pierwszy kwartył wg Web of Knowledge w dyscyplinach chemicznych. Sumaryczny IF cyklu wyniósł 50,4 pkt. zaś całkowita liczba niezależnych cytowań cyklu bez autoryzowań wynosi aż 443. Na szczególną uwagę zasługuje opublikowanie wyników osiągnięcia habilitantki w takich czasopiśmie jak Science Advances czy Nature Chemical Biology.

Na cały dorobek habilitantki składa się 30 publikacji cytowanych 740 razy przy współczynniku H na poziomie 16. Na uwagę zasługuje bardzo wysoki sumaryczny współczynnik IF całości dorobku (235,6) wskazujący na fakt, że habilitantka stara się publikować w czasopiśmie o wysokich standardach i wymagających zespołach



redakcyjnych. Na koniec należy wspomnieć, że dorobek pani doktor opublikowany przez doktoratem składa się 9 prac o sumarycznym IF 67.6 oraz cynowaniach na poziomie 143.

Cykl opisujący osiągnięcie składająca się z prac wieloautorskich, gdzie liczba autorów waha się pomiędzy 3 (praca H6) a 11 (praca H4 w Science Advances) co jest naturalną konsekwencją prowadzenia badań na styku dyscyplin chemii, enzymologii i biologii komórki. W pracach przedstawionych do oceny habilitantka ma zdecydowanie wiodącą rolę, będąc we wszystkich pracach pierwszym autorem, a w 5 z nich korespondencyjnym (zazwyczaj wraz z prof. M. Drągiem, chociaż w pracy H4 na liście autorów było aż 5 autorów korespondencyjnych). W dokumentacji habilitacyjnej doktorantka szczegółowo opisuje swój wkład w badania przedstawione w ramach cyklu. Na podkreślenie zasługuje samodzielne „opracowanie koncepcji badań” lub „koncepcji syntezy” oraz „zaplanowanie eksperymentów” w pracy H1-5. Również w większości prac doktorantka samodzielnie przeprowadziła większość syntez substratów/markerów oddziaływujących z badanymi proteazami jak i była autorem pierwszej wersji tekstu publikacji (w co najmniej 70%). Należy jednak zauważyć, że analiza wyników uzyskanych w ramach prowadzonych badań była prowadzona wspólnie z prof. Marcinem Drągiem. Również wg. przedstawionych przez współautorów oświadczeń autorem koncepcji wykorzystania nienaturalnych aminokwasów do określania specyficzności substratowej proteaz w pracach oryginalnych (H1-5) był prof. Marcin Drąg, zaś pozostali autorzy odpowiadali za ekspresję i biochemiczną charakterystykę badanych proteaz, analizę ich aktywności z wykorzystaniem opracowanych przez habilitantkę narzędzi, w szczególności w próbkach komórkowych z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej oraz w próbkach rzeczywistych pobranych od pacjentów. **W mojej ocenie wymagałoby doprecyzowania**, w jakim zakresie „samodzielne opracowanie koncepcji badań” czy „koncepcji syntezy markerów/substratów fluorogenicznych” wykracza poza opracowanie „koncepcji wykorzystania nienaturalnych aminokwasów do kreślenia specyficzności substratowej proteaz” HyCoSuL – co jest niewątpliwym osiągnięciem prof. Marcina Drąga. W mojej ocenie osiągnięcie habilitantki jest niewątpliwie przykładem bardzo efektywnego zastosowania metody HyCoSuL, ale nie jest dla mnie jasne, na podstawie przedstawionej dokumentacji, w jakim zakresie pani dr Rut rozwinęła koncepcję swojego byłego promotora prowadząc badania w jego grupie.

Habilitantka w autoreferacie bardzo pobieżnie i krótko (jeden akapit) opisała „istotną aktywność naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej”. Wg. przedstawionych informacji pani doktor prowadziła badania w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie nad obrazowaniem aktywności metaloproteiny macierzowej 9 w hodowlach pierwotnych neuronów hipokampalnych szczurów z zastosowaniem opracowanego przez nią wewnętrzne wygaszonego markera chemicznego. **Aby uznać tę działalność za istotną, należałoby skonfrontować jej opis z owocami tej współpracy.** W załączniku 4 pt. „Wykaz osiągnięć naukowych” trudno jednak doszukać się śladów tej współpracy poza jedną publikacją (Poręba M., Szalek A., Rut W., Kasperkiewicz P., Rutkowska-Włodarczyk I., Snipas S. J., Itoh Y. Turk D., Turk B., Overall Ch., Kaczmarek L., Salvesen G. S., Drąg M., „Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families” Scientific Reports, 2017, 7, 1-13), gdzie na liście autorów znajdują się zarówno habilitantka jak i prof. Leszek Kaczmarek. Jest to jednak publikacja z czasów doktoranckich habilitantki i poprzedza jej staż w Instytucie Nęckiego. **Nie znalazłem również śladów wyników tej współpracy w doniesieniach konferencyjnych.** Z drugiej strony prace habilitantki zostały wykonane w ramach bardzo szerokiej współpracy międzynarodowej, z grupami badającymi proteazy wirusowe zarówno na poziomie molekularnym, komórkowym jak i w preparatach pobranych od pacjentów. Odnoszę więc wrażenie, że działalność habilitantki w rzeczywistości znacznie bardziej wykracza poza jednostkę macierzystą niż opisano to w dokumentacji. Ponieważ spełnienie tego kryterium jest wymagane przez ustawę, **wniosuję o zaproszenie habilitantki do wyjaśnienia tej kwestii**, tak aby możliwa była ocena „istotności” owej działalności poza Politechniką Wrocławską.



Informacje o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych i popularyzatorskich kandydatki.

Habilitantka dopiero od października 2021 zatrudniona została na stanowisku badawczo-dydaktycznym. Prowadzi zajęcia dydaktyczne z podstaw chemii organicznej oraz chemii organicznej, chemii produktów naturalnych oraz metod analitycznych dla biotechnologii (głównie zajęcia laboratoria i ćwiczenia). Prowadzi również zajęcia ze spektroskopii fluorescencyjnej i bioobrazowania oraz działa w komisjach do przeprowadzania egzaminów dyplomowych na I i II stopniu studiów.

Pani doktor pełniła rolę promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim, promotora dwóch prac magisterskich oraz opiekuna 4 prac magisterskich i dwóch inżynierskich.

Pani Wioletta wykazywała się **dużą aktywnością popularyzatorską** w trakcie pandemii COVID-19, będąc bezpośrednio zaangażowaną w badania nad koronawirusem SAR-CoV-2. Może również poszczycić się współpracą z otoczeniem gospodarczym, w szczególności sprzedażą licencji japońskiej firmie Peptide Institute Inc. dotyczącej sekwencji fluorogenicznych substratów i inhibitora do badań proteazy M^{pro} SAR-CoV-2, jak również międzynarodowym (PCT) zgłoszeniem patentowym pt. „Compounds for the treatment or diagnosis of COVID-19”. Zdziwienie budzi niewielka aktywność habilitantki w zakresie uczestnictwa w konferencjach (zaledwie 8 wystąpień w latach 2018-2023) pomimo uczestnictwa i kierowania licznymi projektami grantowymi oraz uzyskiwania wyników na najwyższym poziomie.

Informacje powyższe nie wpływają jednak na moją ocenę osiągnięcia, która oparta jest wyłącznie o autoreferat oraz treść sześciu prac cyklu habilitacyjnego.

Ocena jednotematycznego cyklu publikacyjnego zgłoszonego przez habilitantkę do postępowania habilitacyjnego

Jak wskazuje tytuł pracy habilitacyjnej dr inż. Wioletty Rut („Obrazowanie aktywności proteaz wirusowych za pomocą selektywnych narzędzi chemicznych”) wątkiem przewodnim osiągnięcia pani Wioletty Rut było opracowanie markerów chemicznych proteaz wirusowych, które pozwalają śledzić aktywność enzymatyczną lub przeprowadzać detekcję obecności proteaz nawet w obecności innych enzymów tej klasy (markery oparte o selektywne inhibitory). W ramach swojej pracy habilitantka opracowywała peptydy selektywnie wiązane przez badana przez nią proteazy wykorzystując kombinatoryczną metodologię „Hybrid combinatorial substrate library”, HyCoSuL opublikowana w roku 2014 przez promotora jej pracy doktorskiej, prof. Marcina Drąga. Metodologia ta bazuje na syntezie różnych peptydów z biblioteki naturalnych i nienaturalnych aminokwasów i selekcji tych, które wykazują najbardziej specyficzne wiązanie do badanego enzymu. Badania prowadzone przez habilitantkę okazały się niezwykle aktualne i istotne wraz z wybuchem pandemii COVID-19 z początkiem 2020 roku. W efekcie adekwatnej specjalizacji habilitantki (doktorat z opracowania markerów proteaz cysteinowych i treoninowych) oraz doświadczenie kierownika grupy, prof. M. Drąga w badaniu proteaz wirusa SAR-CoV możliwe stało się przeprowadzenie badań de facto na pierwszej linii walki z pandemią. Habilitantka podzieliła cykl na publikacje zorientowane na monitorowanie aktywności ludzkich i wirusowych proteaz deubikwitynujących (choć temat osiągnięcia zawęża oceniany zakres jedynie do enzymów wirusowych) oraz prace poświęcone proteazie M^{pro} i PL^{pro} pochodzącej z wirusa SARS-CoV-2. I to właśnie opracowanie związków wiążących się do tymi proteazami habilitantka wyróżniła, jako nadrzędny cel swoich badań. Takie postawienie akcentów **nie może dziwić**, choćby ze względu na **wysoki poziom oddziaływania prowadzonych przez habilitantkę badań** nie tylko na uprawianą przez nią dyscyplinę naukową, ale również na gospodarkę i społeczeństwo (w szczególności mam tu na myśli przemysł farmaceutyczny i rozwój leków przeciwwirusowych).



W pracy H3 habilitantka zmierzyła się z problemem opracowania substratów fluorescencyjnych dla ludzkiej deubikwitynazy UCH-L3 oraz wirusowej proteazy MERS-CoV PL^{PRO}. Pomimo opracowania specyficznych tetrapeptydów dla obu białek habilitantka nie była w stanie zaobserwować aktywności biologicznej ze względu na konieczność oddziaływania proteaz z ubikwityną (i wynikające z tego oddziaływania zmiany konformacyjne proteaz). Problem ten habilitantka rozwiązała metodą chemiczną, a nie biotechnologiczną, tzn. przeprowadziła pełną syntezę fragmentów peptydów budujących ubikwitynę, następnie połączyła je i wyznakowała c-koniec białka nieproteogenicznymi aminokwasami oraz fluorescencyjnym ACC (7-amino-4-karbamoilmetylocoumariną). W efekcie udało się uzyskać nowe substraty, które wykazywały się większą selektywnością niż referencyjny Ub-ACC który był hydrolizowany przez oba enzymy. Uzyskany Ub-UCHL3-2-ACC nie był rozpoznawany przez MERS PL^{PRO} przy jednoczesnym zachowaniu tego samego poziomu wiązania i podobnej szybkości konwersji jak w przypadku substrat referencyjnego. Z kolei substrat Ub-MERS27-ACC wykazywał o dwa rzędy niższą stałą specyficzności (k_{cat}/K_m) w reakcji z UCH-L3 w porównaniu do Ub-ACC. W tym miejscu, niejako na marginesie, należy zwrócić uwagę habilitantki na nieścisłość w autoreferacie. Uzyskane substraty były w rzeczywistości rozpoznawane „gorzej” od substratu referencyjnego (wyższe wartości K_m) natomiast efektem pracy było znaczący wzrost selektywności otrzymanych związków (wiązały się preferencyjnie z jedną z dwóch badanych proteaz). Na koniec habilitantka zamieniła znacznik ACC na winylometyloestr na C-końcu oraz wprowadziła na N-koniec białka biotynę. Takie zmiany umożliwiły selektywne kowalencyjne wiązanie inhibitora w centrum aktywnym i detekcję enzymów w ekstraktach komórkowych. Co więcej, dzięki wyznakowaniu kowalencyjnego markera za pomocą biotyny możliwa była selektywna izolacja proteaz z ekstraktów komórkowych. Część cyklu zamyka praca H6, która jest bardzo szczegółowym i przejrzystym napisanym protokołem, dostarczającym cennych uwag na temat syntezy substratów/markerów jak i przeprowadzania testów kinetycznych. Są to informacje praktyczne, których zazwyczaj nie sposób znaleźć nawet w suplementach publikacji (np. dotyczących doboru buforu czy czasu inkubacji proteazy z substratem). Dlatego **bardzo wysoko oceniam** wysiłek jaki habilitantka włożyła w przygotowanie takiego protokołu, w szczególności wobec mizernego wynagrodzenia (w sensie punktowym) jaki naukowiec dostaje za opublikowanie takiej pracy. Tymczasem **poziom szczegółowości** przedstawionych tam protokołów eksperymentalnych jest **nie do przecenienia** dla każdego naukowca, czy to w działającym w akademii czy w przemyśle, który chciałby prowadzić podobne badania nad proteazami.

Druga część cyklu skupia się już stricte na proteazach wirusowych. Tę część cyklu otwiera praca H1 poświęcona detekcji proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika. Zasadniczo postępowanie badawcze w tym przypadku nie odbiega od opracowanego przez habilitantkę schematu, a więc w pierwszym kroku optymalizacja specyficzności znakowanych kumaryną substratów tetrapeptydowych, następnie analiza kinetyczna dla wyselekcjonowanego substratu, zamiana fluorogenicznego znacznika na grupę wiążącą (tutaj fosfonian difenylowy) i pomiar nieodwracalnej inhibicji zakończony detekcją znakowanych enzymów na membranie za pomocą specyficznego odczynnika wykrywającego biotynę (IRDye® 800CW Streptavidin). Po zoptymalizowaniu sekwencji selektywnie rozpoznawanej przez proteazę NS2B-NS3 w wirusie Zika habilitantka podjęła badania mające wykazać, czy otrzymany związek umożliwia różnicowanie pomiędzy protezami pochodzącymi z różnych wirusów (wirusa zachodniego Nilu i Dengi – praca H2). Badania wykazały, że podobieństwo strukturalne proteazy NS2B-NS3 w tych wirusach uniemożliwia całkowitą selektywność związków otrzymanych nawet z wykorzystaniem niebiałkowych aminokwasów, chociaż udało się uzyskać specyficzność wobec proteazy DENV2. Należy podkreślić, że opracowana przez habilitantkę metodologia porównawczej oceny selektywności wiązania markerów **ma duże znacznie dla potencjalnego zastosowania opracowywanych przez nią markerów**, ze względu na przetestowanie specyficzności związków nie tylko w wiązaniu się do **proteaz wirusa** ale również do **licznych proteaz występujących w komórce zakażonego gospodarza** (i to zarówno w przypadku zastosowań diagnostycznych jak i terapeutycznych).



Ostatnie dwie prace H5 i H4 koncentrują się na rozwiązaniu bardzo aktualnych problemów związanych z globalną infekcją koronawirusa SARS-CoV-2. Obie prace zostały wydane bardzo szybko po wybuchu pandemii, bo już w 2020 i 2021 roku co świadczy o **dużej intensywności badań**, które habilitantka musiała prowadzić w sytuacji powszechnych obostrzeń i lockdownów. Praca H5, która ukazała się w Nature Chemical Biology, opisuje zastosowanie wypracowanej przez habilitantkę metodologii do opracowania selektywnych inhibitorów oraz fluorescencyjnych markerów względem proteazy M^{pro}. Ponownie strategia była analogiczna do opisanej powyżej - a więc optymalizacja charakterystycznego tetrapeptydu i ocena parametrów kinetycznych dla 3 najlepszych związków wybranych w doświadczeniu przesiewowym, następnie zamiana grupy fluoroforowej na C-końcową grupę wiążącą się z enzymem (tj. winylowo-sulfonową głowicę) w celu wytworzenia inhibitora proteazy, oraz w N-końcową grupę umożliwiającą detekcję – w tym przypadku w biotynę lub barwnik. Przy okazji habilitantka pracując z międzynarodowym zespołem udowodniła, że główna proteaza koronawirusa nie różni się specyficznością od proteazy pochodzącej z wirusa SARS-CoV, a więc opracowane wcześniej, m.in. w grupie prof. Drąga, inhibitory, nadają się do ponownego zastosowania. Dzięki kooperacji z grupą prof. Hilgenfelda udało się uzyskać strukturę proteazy M^{pro} w kompleksie z jednym z inhibitorów, potwierdzając tym samym mechanizm jego działania jako inhibitora kowalencyjnego. Mianowicie zaobserwowano kowalencyjne wiązanie katalitycznej cysteiny oraz zajęcie dziury oksoanionowej przez inhibitor. Również dzięki międzynarodowej współpracy z prof. Johanem Neytsem z KU Leuven w Belgii oraz prof. Wojciecha Młynarskiego z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, przetestowano opracowane przez habilitantkę związki w warunkach klinicznych, wykorzystując Bodipy-QS5-VS do detekcji obecności wirusa w komórkach nabłonka nosogardła pobranych od pacjentów zakażonych koronawirusem. Przeprowadzono też charakterystykę inhibitorów typu dose-response na układach komórkowych wątroby linii komórkowej Huh7 wyznaczając ich efektywność (EC₅₀) oraz cytotoksyczność (CC₅₀). Praca ta w najlepszy sposób udowadnia, że habilitantka **osiągnęła tytułowe selektywne obrazowanie** – albowiem nie obserwowano niespecyficznego wybarwienia komórek pobranych od pacjentów z grupy kontrolnej. **Wynik ten jest o tyle istotny**, że ze względów praktycznych nie sposób przetestować selektywności inhibitorów względem wszystkich proteaz, jakie są produkowane przez ludzkie komórki. A więc potencjalnie nawet najlepsza optymalizacja specyficzności względem proteazy wirusowej nie wyklucza aktywności krzyżowej. Eksperymenty na rzeczywistych preparatach od pacjentów wykazały, że opracowane **narzędzia chemiczne są faktycznie selektywne** a jeżeli jakaś aktywność krzyżowa ma miejsce, to jest ona poniżej poziomu detekcji w mikroskopii konfokalnej.

Z kolei praca H4 poświęcona jest drugiej kluczowej proteazie koronawirusa, PL^{pro}, która nie tylko odpowiada za rozcinanie poliproteiny wirusowej, ale również wspomaga infekcję wirusową dzięki swojej aktywności deubikwytynującej i deISGującej, co wpływa na zdolność zakażonej komórki do produkcji cytokin i chemokin mobilizujących odpowiedź na zakażenie wirusowe. Podobnie jak w poprzednich pracach habilitantka przeprowadziła badania przesiewowe, które doprowadziły do wyselekcjonowania preferencyjnie wiązanej sekwencji. Habilitantka prowadziła badania porównawcze dla PL^{pro}-CoV-2 z PL^{pro}-CoV-1, wykazując duże podobieństwo w specyficzności obu wirusów. Podobnie jak i w poprzedniej pracy udało się międzynarodowemu zespołowi, w którym pracowała pani Wioletta Rut, uzyskać struktury kowalencyjnie zainhibowanej proteazy (tym razem z dwoma różnymi związkami). Następnie habilitantka wykorzystwała swoje doświadczenie z proteazami deubikwytynującymi do charakterystyki dodatkowe aktywacji enzymów przez obecność ubikwityny w substracie. Wyniki te są **bardzo ważne**, gdyż wykazały wpływ zmian mutacyjnych w rejonie interakcji z ubikwityną na aktywność PL^{pro}.

Jak należy oczekiwać po tego typu badaniach, które na gorąco ukazują się w czasie globalnego kryzysu, obie prace (H4 i H5) spotkały się z **bardzo szerokim odbiorem naukowym** i są wysoko cytowane w literaturze. Jestem jednak przekonany, iż nawet bez „koronawirusowej gorączki” prace te zostałyby bardzo dobrze odebrane przez środowisko, ze względu na **wysoki poziom przedstawionych w nich wyników**. Obie prace są również dowodem, iż pani dr inż. Rut potrafi prowadzić badania **znacznie wychodzące** poza jej klasyczny warsztat naukowy, kooperując z naukowcami z Polski i z zagranicy i mających komplementarne umiejętności do jej specjalizacji.



Na koniec mojej recenzji, która ma **zdecydowanie pozytywny wydźwięk**, chciałbym załączyć drobną uwagę krytyczną. Analizując wyniki przedstawionego mi do oceny cyklu zapoznawałem się nie tylko z samymi publikacjami, ale i z dostępnymi w sieci materiałami uzupełniającymi, które są w dzisiejszych czasach nieodłączną częścią publikacji w naukach przyrodniczych. Powodem tych poszukiwań była chęć dowiedzenia się czegoś więcej na temat stosowanego przez habilitantkę i jej współautorów formalizmu opisu nieodwracalnej inhibicji. Referencja cytowana przez habilitantkę przy okazji wyznaczania $k_{obs}/[I]$ (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111 (7), 2518e2523.) zasadniczo nie zawiera pełnego opisu stosowanej metodologii, aczkolwiek dostarcza więcej informacji na temat sposobu prowadzenia eksperymentu. W cytowanej pracy znaleźć można jedynie kolejne odniesienie do trudnodostępnej pozycji książkowej (*Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*). Tymczasem analiza kinetyczna prowadzona w obecności nieodwracalnych inhibitorów powinna skutkować, przynajmniej na podstawie znanych mi podręczników enzymologii, wyznaczeniem tzw. k_{inact} oraz K_{lapp} (czyli stałej szybkości inaktywacji enzymu oraz obserwowanej stałej równowagi tworzenia kowalencyjnego kompleksu EI) lub tzw. drugorzędowej stałej kinetycznej tworzenia nieodwracalnego kompleksu EI k_{inact}/K_i . Przyznam się, że nie jest mi znany formalizm prowadzący do „drugorzędowej stałej inhibicji $k_{obs}/[I]$ ”, chyba, że habilitantka posługiwała się równaniem kinetycznym reakcji dwucząsteczkowej $v_{inac}=k[E][I]$ w warunkach stężenia inhibitora znacząco wyższych niż stężenie enzymu. Wydaje mi się, że omówienie cyklu habilitacyjnego byłoby znacznie bardziej czytelne, gdyby zostały w nim omówione zastosowane w pracach wzory kinetyczne. Zwróciłem również uwagę na fakt, że przebiegi kinetyczne (zarówno dla substratów jak i dla inhibowanych enzymów) nie zostały nigdzie udostępnione. Ze względu na niezwykle kluczową rangę prowadzonych przez habilitantkę badań uważam, że otwarcie dostępu do surowych wyników, zarówno screeningów specyficzności jak i badań kinetycznych z substratami proteaz, ma bardzo duże znaczenie, nie tylko ze względu na zasad FAIR, ale również aspekty etyczne.

Podsumowanie

Reasumując, uważam, że całokształt przedstawionego mi do oceny cyklu habilitacyjnego **ma istotny wpływ na rozwój dyscypliny nauk chemicznych**. W mojej ocenie prace pani dr inż. Rut w istotny sposób poszerzyły naszą wiedzę o proteolitycznych enzymach pełniących kluczową rolę w reprodukcji wirusów. Wypracowana przez habilitantkę metodologia, stosowana systematycznie do kolejnych układów, wykazała się wysoką powtarzalnością – można więc oczekiwać, iż w analogiczny sposób możliwe będzie opracowanie selektywnych substratów oraz inhibitorów dla bardzo szerokiego spektrum enzymów proteolitycznych. Nie mam najmniejszych wątpliwości co do istotności i doniosłości naukowych dokonań habilitantki. Wysoko oceniam również zauważalne poszerzenie spektrum metod, jakie były stosowane w publikacjach, których głównym autorem była pani dr inż. Rut. Mam nadzieję, że jest to zapowiedź jeszcze większego otwarcia się na różnorodne metody badania enzymów proteolitycznych przez habilitantkę i wyjście poza ewidentną strefę komfortu jaką jest metodologia, którą wspólnie wypracowała z prof. Marcinem Drągiem. W związku z moją **pozytywną oceną osiągnięcia** przedstawionego w cyklu habilitacyjnym wnoszę do Rady Naukową Dyscypliny Nauk Chemicznych Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie dr inż. Wioletty Rut do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego.

.....

Prof. dr hab. Maciej Szaleniec