



Wrocław, 24-01-2025

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Horbach pt. „Investigation of the role of calpain-1 in the process of pyroptosis using selective chemical tools”

Badania biologicznej roli proteaz prowadzone są od dziesięcioleci z wykorzystaniem różnorodnych podejść eksperymentalnych czy coraz to nowocześniejszych metod badawczych. Niewątpliwie wykorzystanie fluorescencji jako czulej metody detekcji czy obrazowania oraz bibliotek peptydowych przyczyniło się do rozwoju badań biochemicznych i biologicznych ukierunkowanych wobec różnorodnych enzymów hydrolitycznych. Właśnie w ten nurt badań wpisuje się recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Horbach. Praca została wykonana w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym, Politechniki Wrocławskiej pod opieką naukową Pana dr. hab. inż. Marcina Poręby, prof. P.Wr. Praca doktorska Pani mgr Natalii Horbach jest przykładem bardzo dobrze wykonanej pracy z pogranicza chemii bioorganicznej, enzymologii, a także biochemii. Stanowi ona kontynuację wieloletnich już badań prowadzonych przez promotora, dr. hab. inż. Marcina Porębę.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska, licząca 213 stron, ma charakter klasycznej rozprawy doktorskiej i została napisana w języku angielskim. Zawiera ona wprowadzenie teoretyczne, cel pracy, część eksperymentalną, oraz rezultaty wraz z dyskusją, podsumowanie oraz bibliografię składającą się z 279 pozycji literaturowych. Na końcu dysertacji znajduje się lista osiągnięć Kandydatki w postaci publikacji naukowych (jedna opublikowana w Plant Cell z pierwszym współautorstwem oraz drugiej będącej w recenzji), prezentacji konferencyjnych, a także projektów badawczych, w których brała udział. Przed wstępem do rozprawy, Autorka umieściła przydatny i dość obszerny zbiór skrótów stosowanych w pracy.

Wprowadzenie do pracy, liczące 38 stron, podzielone jest na trzy zasadnicze rozdziały dotyczące śmierci komórki, proteinaz oraz sposobów badania aktywności proteaz będących celem pracy. W pierwszej części Autorka wprowadziła prosty ale bardzo istotny dla pracy podział śmierci komórkowej na typy wskazując na dominujący mechanizm oraz jej przykłady. Największą uwagę skupiła jednak na występującej najczęściej apoptozie oraz piroptozie, co jest dość oczywiste w związku z udziałem kalpains-1 w ich propagacji. Mniej uwagi poświęcone jest autofagii i innym typom śmierci komórkowej. Co ważne

dla samej pracy, rozdziały te, mimo, że dotyczące zjawisk biologicznych, w tym również patologicznych, opisane są bardzo przejrzysto i zrozumiale, co czyni wstęp przystępnym dla czytelników ukierunkowanych chemicznie.

Szczególnie istotne wg Autorki jest ciągła potrzeba poszukiwania sposobów kontroli stanu zapalnego w sposób coraz to bardziej precyzyjny, co ma skutkować powstaniem nowych strategii w jego leczeniu. Z tego powodu zrozumienie mechanizmów piroptozy i jej interakcji z apoptozą (świetnie przedstawione na Rycinie 5) staje się istotne z punktu widzenia samego leczenia stanów zapalnych jak i chorób zakaźnych. W części poświęconej proteazom, Doktorantka przedstawia ogólną charakterystykę proteaz dzieląc je na cysteinowe, serynowe, aspartyłowe czy metaloproteazy by szczególną uwagę skupić na kalpainach, czyli proteazach cysteinowych zależnych od jonów wapnia. Te ostatnie są szczególnie istotne w komórkowej odpowiedzi na stres, różnicowanie czy migrację komórki. Deregulacja aktywności kalpain powiązana jest z różnymi stanami patologicznymi obejmującymi choroby neurodegeneracyjne, dystrofię mięśniową, zaburzenia kardiologiczne, nowotworzenie. Działanie tychże enzymów zależne jest od domeny katalitycznej, w której zachodzi hydroliza wiązań peptydowych motywów o specyficznych sekwencji aminokwasowych. Dzięki czemu są one specyficzne względem niektórych tylko grup białek zaangażowanych w adhezję komórkową, transdukcję sygnałów czy apoptozę. Jednakże aktywność kalpain kontrolowana jest przez domenę regulatorową zawierającą motyw EF-hand specyficznie wiążący jony wapnia. Związanie ich powoduje zmiany strukturalne prowadzące do aktywacji domeny katalitycznej. Właśnie takiej ilustracji czy schematu obrazującego mechanizm aktywacji zabrakło we wstępie. Jest to istotne, gdyż kalpainsy wykazują różną odpowiedź na poziom komórkowego wapnia, co czyni je mniej lub bardziej wrażliwymi na tzw. sygnały wapniowe. Bardzo proszę zatem Doktorantkę, by podczas obrony mogła zilustrować brakujący mechanizm aktywacji oraz skomentować czym wywołana jest odmienna odpowiedź kalpainsy-1 i 2 na wapń oraz jakie sygnały komórkowe wywołują mobilizację jonów wapnia oraz skąd są one uwalniane w tychże procesach. Innymi słowy, proszę o kilka słów na temat wapniowo-zależnej regulacji kalpain. Ze względu na tematykę rozprawy, Autorka podjęła się przybliżenia roli kalpain w różnych typach śmierci komórkowej, t.j. w apoptozie, nekrozie i piroptozie. Choć kaspazy a nie kalpainsy są głównymi proteazami zaangażowanymi w progresję piroptozy, to jednak te drugie wspierają oraz modulują piroptozę poprzez hydrolizę strukturalnie istotnych białek cytoszkieletowych, takich jak chociażby vimentyna. Tworzy ona różnego rodzaju filamety modulowane przez jony cynku oraz wapnia. Czy aktywacja/regulacja hydrolizy białek cytoszkieletowych następuje w odpowiedzi na sygnały cynkowe i wapniowe? Myślę, że tak, gdyż sama aktywacja inflamasomów, w które zaangażowane są kalpainsy jest metalozależna. Proszę o komentarz. Choć ta część wstępu napisana jest przejrzysto, to wisienki na torcie mogłaby dostarczyć jasne nawiązanie roli kalpain w piroptozie w kontekście potrzeby realizacji badań, która rozwinięta jest w dalszej części pracy.

Ostatnia część rozdziału teoretycznego pozostaje najbardziej chemiczna i technologiczna gdyż dotyczy profilowania aktywności czy badania funkcji proteaz z wykorzystaniem różnych podejść bazujących głównie na bibliotekach peptydowych. Choć rozdział napisany jest w sposób ogólny i dotyczy profilowania większości proteaz, to Doktorantka przygotowała go z myślą o profilowaniu aktywności kalpain, będących celem molekularnym dysertacji. Rozdział przygotowany jest bardzo starannie i jest niezwykle pouczający zarówno dla znawców profilowania aktywności enzymów proteolitycznych jak i niespecjalistów. Autorka przedstawiła zasadę działania dwóch bibliotek używanych do określania optymalnych sekwencji aminokwasowych z dużą precyzją. Pierwsza z nich, bardziej historyczna, to PS-SCL (*ang. Positional Scanning Synthetic Combinatorial Libraries*) a druga to HyCoSuL (*ang. Hybrid Combinatorial Substrate Libraries*) charakteryzująca się wykorzystaniem aminokwasów nienaturalnych. Zabieg ten zdecydowanie rozszerza ilość możliwych sekwencji w bibliotece, zwiększając zarazem prawdopodobieństwo znalezienia najoptymalniejszej, dzięki możliwości zachodzenia dodatkowych, bądź silniejszych oddziaływań z proteazą aniżeli w przypadku biblioteki bazującej jedynie na aminokwasach naturalnych. Poza tymi bibliotekami, Doktorantka również wskazuje, że metody bazujące na spektrometrii mas czy *phage display*, również stanowią doskonałe podejście w profilowaniu aktywności proteaz. Ponadto, opisała również różne zabiegi fizykochemiczne zwiększające czułość opracowywanych substratów, takie jak wprowadzenie do sekwencji aminokwasowej fluoroforów uwalnianych w wyniku działania proteaz, zastosowania zjawiska FRET czy wewnętrznie wygaszonej fluorescencji. W opisie tych dwóch ostatnich zabrakło odpowiedniej ilustracji ukazujących działanie tak skonstruowanych substratów. Za to, poruszona została i to bardzo słusznie, idea konstrukcji specyficznych inhibitorów czy *activity-based probes* (*ang. ABP*), które bazują w swoim działaniu na zoptymalizowanych wcześniej sekwencjach substratowych enzymów. Koniec wstępu teoretycznego wieńczy rozdział poświęcony narzędziom chemicznym używanym w badaniu aktywności czy hamowania kalpain. Mimo, że część z nich stosowana jest z powodzeniem, to charakteryzują się one brakiem specyficzności w obrębie izoform kalpain. Właśnie na ten brak zwraca uwagę Autorka w ostatnim paragrafie, wskazując na potrzebę działania w tym kierunku. Zakończenie to świetnie łączy ze sobą treść zawartą we wstępie z kolejnym rozdziałem obejmującym cel pracy.

Autorka w jasny i klarowny sposób prezentuje, co było zasadniczym celem jej działań. Obejmował on zastosowanie biblioteki HyCoSuL po to, by stworzyć wysoce specyficzne substraty a także potencjalne inhibitory względem kalpainy 1, które to byłyby nieaktywne dla pozostałych izoform jak i blisko powiązanych proteaz, m. in. katepsyn czy proteasomu. W tym celu, Doktorantka zastosowała szereg nienaturalnych aminokwasów by zwiększyć paletę elementów strukturalnych budujących peptydy, a także zastosowała znakowanie fluorescencyjne z ACC co zwiększyło czułość i obniżyło zakres stosowanych stężeń. Ponadto, bazując na zoptymalizowanych sekwencjach, celem pracy było również otrzymanie

pierwszego dotąd *activity-based probe* ukierunkowanego właśnie w stronę kalpajny 1, a następnie walidacja jego działania w systemach komórkowych tak, aby rzucić światło na rolę tegoż enzymu w procesie piroptozy, a docelowo regulacji stanu zapalnego i migracji komórkowej. Pobocznym ale równie istotnym nurtem badań Doktorantki było zbadanie roli kalpajny 1 w hydrolizie gasderminy D, efektora piroptozy. Skoro podjęte w pracy doktorskiej działania były ukierunkowane w stronę stworzenia narzędzi o wysokiej specyficzności względem konkretnego enzymu, można było rozważyć podkreślenie tego faktu w tytule rozprawy np. poprzez wprowadzenie określenia „isoform-selective”.

Kolejnym częścią rozprawy jest część eksperymentalna, w której znajduje się opis prowadzonych eksperymentów i analiz. Rozdział ten jest połączeniem sekcji eksperymentalnej z wynikową, gdyż zawiera struktury, schematy, widma masowe czy chromatogramy uzyskane podczas realizacji badań. Wprowadza to pewien chaos w odbiorze. Jeśli Doktorantka nie chciała umieszczać informacji o tożsamości uzyskanych związków w części poświęconej wynikom, mogła na przykład rozważyć zastosowanie suplementu, w którym mogła znaleźć się spora część rycin z tego rozdziału. Mimo tego, umieszczone tu opisy są bardzo jasno przygotowane. Zdarzają się drobne błędy natury edytorskiej, jak brak spacji pomiędzy wartościami i jednostkami, brak zastosowanych kursyw przy wartościach stałych, przyspieszenie ziemskie zapisane bez kursywy czy mało czytelne ilustracje jak np. Rycina 20 czy struktury na rycinach z widmami masowymi. Podpisy tabel zwyczajowo umieszczane są nad a nie pod nimi. Z ciekawości chciałbym zapytać o przyczynę użycia 2,4,6-kolidyny jako zasady przy reakcji sprzęgania aminokwasów? Proszę również o wyjaśnienie pojęcia „*magic point*” pojawiającego się na stronie 88. Praca, w sporej części odnosi się do enzymologii i pojawiają się w niej pojęcia typowe dla tej dziedziny. Myślę, że mogły być one wyjaśnione w krótkim rozdziale metodologicznym w tej sekcji po to, by przybliżyć znaczenie lub potrzebę ich wyznaczenia. Dość nietypowa jest również prezentacja mas obliczonych i uzyskanych. Autorka prezentuje bowiem wartości mas cząsteczkowych (nie wiadomo czy chodzi o masy średnie czy monoizotopowe) w postaci jonów jednododatnich $[M+H]^+$ a następnie przedstawia wartości dla jonów trój- bądź czterododatnich choć tu zapis nie jest do końca poprawny. Powinno być odpowiednio $[M+3H]^{3+}$, $[M+4H]^{4+}$. Zmusza to czytelnika do samodzielnych rachunków, by sprawdzić jak masy eksperymentalne mają się do obliczonych oraz jaka jest różnica między masami.

Najistotniejszy dla rozprawy pozostaje jednak rozdział „Rezultaty i dyskusja” który w sposób klarowny i skondensowany prezentuje uzyskane wyniki, które zostały podzielone na sześć części. W pierwszym podejściu Autorka dokonała profilowania specyficzności poszczególnych pozycji (P1-P4) substratów kalpajny-1 z wykorzystaniem wspomnianej wcześniej biblioteki HyCoSuL ale także bazując na wcześniej uzyskanych danych przy profilowaniu innych enzymów, t.j. katepsyn. Profilowanie pozycji P1 wykazało preferencję kalpajny 1 do reszt hydrofobowych i aromatycznych, w szczególności do tyrozyny, fenyloalaniny oraz kilku reszt nienaturalnych. Wykazuje też sporą preferencję do reszt dodatnich takich jak

arginina i lizyna. Autorka dokonała bardzo szczegółowej analizy potencjalnych oddziaływań wyselekcjonowanych reszt z kieszeni S1 enzymu. W pracy nie ma struktury kalpainsy 1 ani jej domeny katalitycznej. Dyskusja na temat potencjalnych oddziaływań byłaby łatwiejsza w prezentacji gdyby posłużono się strukturą domeny katalitycznej. W kolejnym kroku, wykorzystując dwa zestawy bibliotek substratowych posiadających w pozycji P1 resztę Tyr oraz Arg, Doktorantka przeprowadziła niezależnie profilowanie pozycji P2-P4. W tym celu do profilowania pozycji P2 zostało użytych 20 reszt naturalnych i 100 reszt nienaturalnych. Czy ta sama ilość reszt była użyta przy profilowaniu pozycji P3 i P4? Autorka wspomina również na stronie 144 o wykorzystaniu mieszaniny równomolowej aminokwasów. Dlaczego nie było ta mieszanina izokinetyczna i jak to mogło wpłynąć na uzyskane wyniki? Przeprowadzona analiza jest imponująca pod względem ilości włożonej pracy i pozwoliła na selekcję reszt wykazujących najlepsze preferencje względem enzymu. Szczególnie ważna jest pozycja P2, która wydaje się być najistotniejsza dla selektywności substratowej. Jej preferencja względem małych i rozgałęzionych reszt alifatycznych, w szczególności L-Leu i L-Val wskazuje na kluczową rolę w specyficzności względem naturalnych substratów. Wyniki dla pozycji P3, a w szczególności dla P4 wykazały mniejszą specyficzność w porównaniu do pozycji P2. Jednakże, użycie nienaturalnych aminokwasów pozwoliło na selekcję unikalnych reszt, które można wykorzystać zarówno przy konstrukcji substratów jak i inhibitorów o czym Doktorantka wspomina wielokrotnie, czasami niepotrzebnie się powtarzając. Warta podkreślenia jest szczegółowa dyskusja na preferencjach odpowiednich pozycji substratu względem kieszeni enzymu.

Wykorzystując wyniki uzyskane w pierwszym etapie prac, Autorka w kolejnych trzech krokach swoich badań przeprowadziła optymalizację i charakterystykę najbardziej optymalnych substratów, inhibitorów jak i sond opartych na reaktywności enzymatycznej (*ang. activity-based probes*). W pierwszym z nich, Doktorantka otrzymała 16 peptydów o sekwencji Ac-P4-P3-P2-P1-ACC zawierających aminokwasy naturalne, które wykazywały największą preferencję danej pozycji. Najlepszą preferencję względem kalpainsy 1 wykazywał peptyd Ac-Trp-Leu-Leu-Tyr-ACC. Jednakże porównanie parametrów k_{cat}/K_m dla wybranych katepsyn i proteasomu 20S wykazało brak oczekiwanej selektywności. W związku z tym Autorka przygotowała drugą bibliotekę substratową, tym razem zawierającą 46 peptydów o ogólnym wzorze Ac-P4-P3-P2-P1-ACC zawierającą zarówno reszty naturalne i nienaturalne, które we wcześniejszej analizie wykazywały najlepsze preferencje względem kalpainsy 1. Przeprowadzona charakterystyka enzymatyczna i porównanie parametru k_{cat}/K_m względem katepsyn i proteasomu 20S wykazało, że najbardziej selektywnym substratem względem kalpainsy 1 jest Ac-Bta-Leu-Leu-Tyr-ACC oraz Ac-1Nal-hTyr-Leu-Tyr-ACC. Substraty te wykazują również wyższą reaktywność w porównaniu do substratu zbudowanego jedynie na resztach naturalnych. Należy jednak wspomnieć, że nie została uzyskana pełna selektywność, gdyż katepsyna L a w mniejszym stopniu proteasom 20S nadal hydrolizują zwalidowane substraty, jednakże zdecydowanie słabiej. O sukcesie można mówić względem katepsyny S i B.

Wykorzystując analogiczne podejście do substratów, Autorka w kolejnym kroku zsyntezowała 21 peptydów o ogólnym wzorze, Ac-P4-P3-P2-P1-AOMK zawierających zarówno reszty naturalne i nienaturalne będących potencjalnymi nieodwracalnymi inhibitorami proteaz dzięki obecności grupy AOMK. Co ciekawe, wykorzystwała do porównania również dziewięć znanych i opisanych w literaturze inhibitorów. Porównanie parametrów $k_{obs}/[I]$ pokazało, że najlepszym inhibitorem kalpainy 1 okazał się peptyd Ac-Tyr-Phg-Leu-Tyr-AOMK wykazujący lepsze działanie hamujące względem enzymu aniżeli powszechnie używany inhibitor MG132. Warte podkreślenia jest również to, że zoptymalizowane sekwencje substratów i inhibitorów bardzo dobrze korelują ze sobą parametry kinetyczne (Rycina 46) ukazując wysoki potencjał użytkowy biblioteki substratów celem konstrukcji efektywnych inhibitorów. Godna podkreślenia jest również dyskusja zawarta w tej części pracy, w której Autorka dokładnie porównuje ze sobą inhibitory opisane dotąd w literaturze jak i te własne.

Jeśli chodzi o sondy oparte na reaktywności enzymatycznej, to Doktorantka ograniczyła się w konstrukcji do pięciu potencjalnych inhibitorów fluorescencyjnych. Sekwencje aminokwasowe czterech z nich pochodziły z wcześniejszych profilowań. Jeden z nich był o jedną resztę aminokwasową krótszy w porównaniu do pozostałych. Co więcej, inhibitor bazujący na tej sekwencji wykazał się najlepszymi parametrami kinetycznymi względem kalpainy 1. Czy Doktorantka może skomentować fakt pojawienia się tej sekwencji i dlaczego ta krótsza sekwencja nie została użyta w profilowaniu substratów i inhibitorów? Warte podkreślenia jest to, że wszystkie pięć testowanych inhibitorów fluorescencyjnych charakteryzowało się zdecydowaną selektywnością względem katepsyny L, V, B i S. Funkcjonalność dwóch reaktywnych sond została również potwierdzona poprzez znakowanie oczyszczonej kalpainy 1 i jej rozdział na żelu SDS PAGE. Obecność znakowanego enzymu poza wskazaniem odpowiedniej masy została również potwierdzona przy użyciu przeciwciała skierowanego przeciwko kalpainie 1 z wykorzystaniem Western Blot. Czy można powiedzieć coś o wydajności znakowania w tych warunkach? Sądzę, że rozdział na żelu jest niewystarczający aby rozdzielić białko znakowane od nieznakowanego. Funkcjonalność znakowania została również potwierdzona w komórkach THP-1. Komórki te inkubowane z jonoforem wapniowym i $CaCl_2$ ulegały aktywacji pod względem kalpainy 1 i dostarczyły bardzo ciekawego obiektu do badań inhibicji enzymatycznej enzymu. Użycie aktywnego inhibitora NH-ABP-1 spowodowało szybką modyfikację aktywnego enzymu, która była nieobserwowana przy braku obecności jonoforu i jonów Ca^{2+} .

W przedostatniej części pracy, Doktorantka podjęła się ambitnej próby profilowania kalpainy oraz innych białek zaangażowanych czy powiązanych z kontrolowaną śmiercią komórki. W tym celu wykorzystwała cytometrię masową, która dzięki swojej przepustowości i rozdzielczości jest w stanie obrazować obecność poszczególnych białek z dużą dokładnością. Prowadzone badania koncentrowały się wokół komórek krwi, które świetnie nadają się do analizy z wykorzystaniem cytometrii masowej. Analiza ta była możliwa dzięki zastosowaniu odpowiednich przeciwciał kierowanych przeciwko markerom

odpowiednich komórek krwi oraz koniugatowi przeciwciała anty-kalpainy 1 ze stabilnym izotopem neodymu. Uzyskane wyniki wykazały, że kalpaina 1 obecna jest głównie w granulocytach, w szczególności w eozynofilah i neutrofilach. Po usunięciu tychże komórek z analizy, kalpaina-1 była również obrazowana w monocytach i mniejszym stopniu w komórkach beta czy komórkach CD8+ T. Bardzo ciekawą obserwacją badań Pani Horbach jest to, że ekspresja kalpainy 1 silnie koreluje z ekspresją kaspazy 1 i gazderminą D, co sugeruje, że kalpaina 1 może odgrywać ważną rolę w piroptozie u neutrofilii. Obecność kalpainy-1 została również potwierdzona z użyciem wcześniej opracowanego inhibitora NH-ABP-1, co niewątpliwie udowadnia obecność enzymu w neutrofilach na poziomie białka.

Ostania część badań Kandydatki była odpowiedzią na obserwacje uzyskane w poprzednim kroku i dotyczyła korelacji ekspresji kalpainy 1 i gazderminy D. Celem ich było sprawdzenie czy kalpaina 1 jest w stanie ciąć gazderminę D, co jest kluczowe do dalszych etapów procesu piroptozy. W tym celu Autorka przygotowała w pierwszej kolejności substraty z wewnątrznie wygaszoną fluorescencją zawierającą różne fragmenty gazderminy D, które zostały następnie wykorzystane do badania reakcji hydrolizy z użyciem kalpainy 1 oraz kaspazy 1. Wskazały one na potencjalne miejsca hydrolizy wywołane przez te enzymy. Najwięcej jednak informacji przyniosły testy przeprowadzone na całej gazderminie D. Tu Autorka konstrukt SUMO-GSDM-6xHis nazywa białkiem natywnym, co jest pewną przesadą i zapewne uproszczeniem wypowiedzi. Przy okazji pytanie o potrzebę wprowadzenia metki SUMO do tegoż konstruktu? Zarówno badania na całym białku jak i przeprowadzone później na komórkach THP-1 aktywowane jonoforem wapniowym i chlorkiem wapnia wykazały, że kalpaina 1 tnie gazderminę D w dwóch pozycjach, których sekwencje zostały zaprezentowane przez Doktorantkę. Ważną konkluzją z przeprowadzonych badań jest to, że kalpaina 1 w większym stopniu niż kaspaza 1 uczestniczy w procesie piroptozy. Zdecydowanie jest to jedna z najistotniejszych obserwacji dokonanych przez Autorkę w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Pracę wieńczy trójstronicowe podsumowanie, w którym Autorka bardzo przejrzyście podsumowała najważniejsze obserwacje oraz wyniki wskazując na dale możliwości rozwoju.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Natalii Horbach prezentuje bardzo dobrze zrealizowany projekt pracy doktorskiej, za sukcesem którego stoi Doktorant jak i Promotor pracy. Praca napisana jest poprawnym językiem i poza nielicznymi błędami natury interpunkcyjnej czy edytorskiej, o których wspomniałem wcześniej i obecnych we wszystkich rozdziałach rozprawy, nie znalazłem poważniejszych błędów. Praca opatrzona jest jasnymi i bardzo dobrze przygotowanymi ilustracjami i schematami. Na wyróżnienie zasługuje dokładna i dojrzała naukowo dyskusja wyników. Nie mam zasadniczych zastrzeżeń merytorycznych do recenzowanej pracy poza wskazanymi wyżej, które w większości wynikają z mojego zaciekawienia. Jednakże do wymienionych wyżej pytań czy uwag chciałbym dodać następujące:

- Czy możliwe jest badanie profili substratowych/inhibitorowych kalpainy 1 z wykorzystaniem modelowania bądź dynamiki molekularnej? Czy takie badania może były realizowane? Jakich dostarczają informacji.
- Zależnie od odpowiedzi na powyższe pytanie chciałbym dowiedzieć się dlaczego Doktorantka/Promotor nie podjęli się takiej próby. Z pewnością dokowanie inhibitorów dostarczyłoby cennych informacji przydatnych do projektowania inhibitorów lub udoskonalania własnego warsztatu?
- Czy może Pani opisać jak koniugat przeciwciała anty-kalpaina 1 ze stabilnym izotopem neodynu był otrzymany?
- Czy wykluczenie eozynofilii i neutrofilii z analizy cytometrycznej odbyło się poprzez brak użycia specyficznego przeciwciała kierowanego względem markera komórkowego czy może inną bardziej klasyczną metodą?

Reasumując, mimo drobnych niedociągnięć, o których wspomniałem powyżej, stwierdzam, że przyszło mi recenzować bardzo ciekawą pracę, której wyniki są wartościowe pod względem technicznym i naukowym. Praca Pani mgr Natalii Horbach to przykład świetnie zrealizowanego projektu badawczego wykraczającego poza ogólnie pojętą enzymologię czy chemię bioorganiczną/biologiczną. Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Horbach w pełni spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), przepisy wprowadzające ustawę o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Wniosuję zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr Natalii Horbach do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Biorąc pod uwagę fakt, że wyniki przedstawione w rozprawie zostały częściowo opublikowane w prestiżowym czasopiśmie naukowym lub pozostają w recenzji, Kandydatka przygotowała bardzo dobrą rozprawę i przeprowadziła dojrzałą dyskusję oraz lub przede wszystkim to, że wyniki badań Doktorantki mają spory potencjał aplikacyjny, zwracam się do Rady dyscypliny Nauki Chemiczne o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Horbach.

Z wyrazami szacunku,

Artur Krężel

