



prof. dr hab. inż. Marcin Sieńczyk
Katedra Chemii Organicznej i Medycznej
ul. Łukasiewicza 2, bud. A-2, p. 424a
50-371 Wrocław
tel. 71 320 36 46
tel. 71 320 32 44

Politechnika Wroclawska
Wydział Chemiczny
Cypriana Kamila Norwida 4/6
50-373 Wrocław
tel. 71 320 24 25

Wrocław, 7 lipca 2025

Recenzja pracy doktorskiej mgr Wiktorii Rejmak zatytułowanej

Nowe analogi ludzkiej katelicydyny (LL-37) o zwiększonej odporności na degradację enzymatyczną.

Projektowanie, synteza chemiczna i badania biologiczne.

Przyroda od zawsze inspirowała człowieka w poszukiwaniu nowych rozwiązań. Wiele spośród odkryć naukowych wynika właśnie z wnikliwej obserwacji otaczającego nas, wciąż skrywającego wiele tajemnic, świata. Do dnia dzisiejszego dokładne zrozumienie algorytmów ewolucji i molekularnych podstaw tych rozwiązań stanowi wyzwanie dla ludzkości. I choć w zasadzie natura się nie myli (niektórych załków po prostu jeszcze nie zrozumieliśmy), to od dekad nasza uwaga skupia się na podpatrywaniu i usprawnianiu jej osiągnięć.

Jednym z przykładów poprawiania natury są białka, których biologiczne funkcje staramy się korygować w nadziei na uzyskanie pożądanego efektu terapeutycznego (inhibitory enzymów, interkalatory oddziaływań białko-białko czy hamowanie szlaków przekazywania sygnałów). Z drugiej tworzymy ulepszone wersje naturalnych, jednak w różnych powodów czasami wadliwie funkcjonujących białek i polipeptydów, czego doskonałym przykładem są insulina, FVIII czy przeciwciała monoklonalne. Mając na uwadze użyteczność kliniczną polipeptydów, staramy się poprawiać ich właściwości biologiczne, stabilność *in vivo*, profil farmakologiczny czy funkcjonalność.



Choć białka pełnią kluczową rolę w kontroli procesów zachodzących w świecie istot żywych, zapewniając jednocześnie skuteczny przepływ informacji leżący u podstaw procesów metabolicznych, to nie mają monopolu na sposób działania szlaków komunikacyjnych czy funkcji obronnych organizmu. Polipeptydy pełnią ważną, komplementarną do białek rolę choćby w układowej propagacji sygnałów metabolicznych (np. insulina, glukagon, AgRP czy GLP-1), regulacji procesów wzrostu i różnicowania, regulacji ciśnienia krwi i procesów trawiennych, funkcjonowaniu wrodzonych mechanizmów obrony czy w tak fundamentalnej dla życia kontroli statusu redoks organizmu. Najczęściej jednak polipeptydy pełniące tak ważne funkcje działają przez krótki, precyzyjnie określony czas, co jest zrozumiałe w świetle ich biologicznej roli. Z drugiej strony owa naturalna niestabilność sprawia, że polipeptydy mają ograniczony potencjał terapeutyczny, co sprawiło, że przez długi czas nie rozpatrywano ich w kategorii możliwych leków. Jednak osiągnięcia technologiczne i naukowe ostatnich dziesięcioleci (jak przykładowo technologia rekombinowanych białek czy zautomatyzowane metody syntezy peptydów) oraz dokładniejsze zrozumienie funkcji i biochemii peptydów, szczególnie identyfikacja w ich strukturze motywów kluczowych dla oddziaływania z partnerami czy odpowiedzialnych za ich stabilność *in vivo*, pozwoliły na opracowanie skutecznych polipeptydowych terapeutyków, jak choćby kolejne generacje insuliny czy triumfujące w ostatnich latach skuteczne w leczeniu cukrzycy typu 2 analogi GLP-1 – semaglutyd (Ozempic®) czy tirzepatyd (Mounjaro®). W dobie możliwości, jakie daje nam rozwój sztucznej inteligencji oraz narzędzi uczenia maszynowego przewiduje się, że peptydowe terapeutyki wchodzić będą właśnie w erę swojej największej świetności.

Projektowanie i otrzymywanie syntetycznych analogów polipeptydów, które z jednej strony można uznać za funkcjonalne „substytuty” naturalnie występujących oligomerów, z drugiej strony będących niewrażliwymi na mechanizmy ich eliminacji (przykładowo działanie enzymów proteolitycznych), stanowi wyzwanie współczesnej chemii medycznej, w nurt której wpisuje się przedstawiona do recenzji realizowana pod opieką naukową Prof. Adama Lesnera praca doktorska Pani mgr Wiktorii Rejmak, która dotyczyła syntezy nowych analogów katelicydyny (peptydu LL-37), analizy wpływu wprowadzonych modyfikacji na strukturę oraz badanie właściwości biologicznych otrzymanych związków. Badania zostały zrealizowane w ramach projektu NCN Preludium BIS 1 (kierownik projektu Prof. Adam Lesner) o tytule tożsamym z tytułem pracy doktorskiej w Pracowni



Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej Katedry Technologii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Praca liczy 138 stron i ma układ typowy, powszechnie przyjęty dla tego rodzaju opracowań. Rozprawa składa się z pięciu głównych części (Przegląd literaturowy, Cel pracy, Metody przeprowadzonych badań, Wyniki i dyskusja oraz Podsumowanie i wnioski) poprzedzonych krótkim Streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim oraz Wykazem stosowanych skrótów (niestety niepełnym i nieuporządkowanym alfabetycznie; w treści pracy pojawia się wiele skrótów bez ich dalszego rozwinięcia). Niejasna jest dla mnie osobna numeracja poszczególnych rozdziałów i podrozdziałów – w każdej części rozprawy numeracja zaczyna się od początku – z tego też powodu w rozprawie istnieją cztery rozdziały o numerze 1., trzy podrozdziały 1.1. etc. co jest dość mylące. Doktorantka umieściła w swojej rozprawie 37 rysunków i 11 tabel. Spis cytowanej literatury obejmuje 144 pozycje w większości z ostatnich piętnastu lat. Rozprawę uzupełniają Wykaz rysunków, Wykaz tabel, Opis dorobku naukowego, Oświadczenie Autorki, że przedłożona praca doktorska nie narusza praw autorskich, interesów prawnych i materialnych osób w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz.U. 2000 r. nr 80, poz. 904, z późn. zm.) oraz Podziękowania.

Zanim przejdę do analizy poszczególnych części opracowania, pozwolę sobie na kilka uwag natury ogólnej. Rozprawa doktorska Pani mgr Wiktorii Rejmak nie została zbyt starannie opracowana pod względem edytorskim i graficznym, i choć nie wpływa to istotnie na jej ogólny odbiór, liczne błędy stylistyczne, gramatyczne, logiczne, interpunkcyjne (przecinki pojawiają się całkowicie losowo) czy literówki utrudniają jej płynne czytanie (na palcach jednej ręki można policzyć strony, na których nie ma choć jednego błędu). Niektóre zdania, ze względu na swoją konstrukcję, są trudne do zrozumienia. Wydaje mi się, iż w przygotowaniu rozprawy zabrakło ostatniego szlif w postaci solidnej korekty strony językowej. Pragnę podkreślić, iż obecne w pracy potknięcia i pomyłki językowe nie wpływają na jej wartość merytoryczną. Spośród niesłychanie bogatego zbioru błędów pozwolę sobie jednak wybrać choć kilka (pierwsza literówka obecna jest już w tytule na pierwszej stronie rozprawy – „degradację enzymatyczną” zamiast „degradację enzymatyczną” – co można uznać za swoiste preludium do tego, co ma nastąpić w trakcie dalszej lektury): zdanie „Furthermore, the peptidomimetics were evaluated



for their enzymatic activity...” jest dość niefortunne i wskazuje, że otrzymane pochodne wykazują aktywność katalityczną (strona 9, analogicznie strona 11); brak rozwinięć skrótów zawartych w Tabeli 1 (CAMP, CAP, BF czy BAC); co Autorka miała na myśli pisząc „Dojrzały peptyd można uwolnić z formy przechowywania...” (strona 19)? co oznaczają terminy *kolejność sekwencyjna* (strona 20) oraz *peptyd o szerokiej ekspresji* (strona 23)? „Katelicydyna posiada działanie ...” zamieniłbym raczej na *wykazuje działanie*; alanina raczej nie należy do dużych hydrofobowych aminokwasów, ponadto poprawnym jest raczej określenie, że chymotrypsynopodobne proteazy *rozszczepiają* wiązania peptydowe po karboksylowej stronie aminokwasów, a nie „po aminokwasach” (strona 33); rozdziały 4.2.1. i 4.2.2 nie mają nazwy (strona 35); dopełniacz liczby pojedynczej słowa stabilność to stabilności (mimo, iż litera „ć” brzmi jak „ci”, zapisujemy „ci”) - powinno zatem być *zwiększenia stabilności*, nie *zwiększenia stabilność* (strona 39 i późniejsze); błędne cytowania w podpisie pod Rysunkami 7 i 8. Równocześnie pragnę dodać, iż nie znalazłem w pracy błędów merytorycznych, a pojawiające się w rozprawie drobne błędy rzeczowe są najprawdopodobniej wynikiem dość niefortunnej konstrukcji zdań.

Opracowanie literaturowe zawarte zostało na 77 stronach, na których Autorka przybliży czytelnikowi podstawowe informacje dotyczące przeglądu peptydów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, strukturze, funkcji i mechanizmach działania katelicydyn oraz wybranych peptydów antymikrobiotycznych, ze szczególnym uwzględnieniem uwalnianego z hCAP18 peptydu LL-37. Opis zawiera także przegląd aktualnych badań dotyczących biologicznej roli LL-37 i jego potencjalnego zastosowania terapeutycznego. W kolejnej części przeglądu literaturowego Autorka skupiła swoją uwagę na enzymach jako czynnikach biologicznych, które wpływają na stabilność peptydów terapeutycznych oraz na podejściach stosowanych w celu zmniejszenia wrażliwości tej klasy oligomerów na czynniki środowiskowe. Ostatni fragment tej części rozprawy poświęcony jest neutrofilom – mechanizmom ich różnicowania, aktywacji oraz strategiom wykorzystywanym przez nie w eliminacji patogenów, jak degranulacja, fagocytoza czy tworzenie zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NETs). Przedstawione opracowanie jest dość ciekawe, aktualne i porusza wiele ważnych aspektów w zakresie podejmowanych w temacie rozprawy zagadnień. Pomijając błędy językowe, omówione kwestie potraktowane zostały pobieżnie i nie wykraczają, niestety, poza niemalże



faktograficzne przybliżenie tematu. Zabrakło głębszej analizy i dyskusji, także krytycznej, przytoczonych danych literaturowych. Przykładowo, Autorka omawiając strukturę LL-37 mogła przedstawić rysunek ją obrazujący (2k6o.pdb). Niektóre zdania są ucięte tak, jakby w połowie pisania zabrakło koncepcji na ich zakończenie. Brak przedstawienia dokładnych, molekularnych podstaw działania omawianych peptydów (jak choćby bardzo lapidarny opis mechanizmu antymikrobiotycznego, który zajmuje jedynie pół strony 22 wraz z rysunkiem czy szczerbawy opis działanie GI-20 wobec wirusa HIV-1 na stronie 25). Nie znalazłem także precyzyjnego wyjaśnienia, w jaki sposób LL-37 wpływa na aktywność neutrofilów (jedyna wzmianka zawarta jest na Rysunku 1). Warto było też (strona 21) podać konkretne przykłady peptydów antymikrobiotycznych, których podział przedstawiono. W pracy pojawia się też intrygujące stwierdzenie (strona 23), że „Ludzka katelicydyna jest peptydem przeciwdrobnoustrojowym kluczowym dla obrony wrodzonego układu odpornościowego przed patogenami” – katelicydyna jest wszak elementem tego układu, a jej rolą jest ochrona organizmu, nie systemu obronnego per se. Proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób peptydy przeciwdrobnoustrojowe dokonują „bezpośredniej lizy bakterii” (strona 24). W wielu miejscach znajdują się zbędne powtórzenia tych samych informacji – o tym, że katelicydyny i neutrofile stanowią pierwszą linię obrony organizmu można przeczytać przynajmniej w kilku miejscach. Proszę o wyjaśnienie w jakim celu, w kontekście funkcji LL-37, przedstawiono opis roli witaminy D zawarty na stronie 27? Proszę także o przedstawienie z jakimi konkretnie receptorami obecnymi na powierzchni komórek nowotworowych wiąże się LL-37 i jaki ma to wpływ na proces angiogenezy (strony 29-30), a także jak LL-37 bezpośrednio stymuluje komórki złośliwe (strona 30). Do opisu dotyczącego porównania funkcji i budowy proteinazy 3 i elastazy warto było dodać rysunek obrazujący struktury i sekwencje obu proteaz (strona 34). W opisie funkcji deiminaz peptydyloargininowych zabrakło też jakiegokolwiek odniesienia do przedmiotowych katelicydyn, szczególnie, w świetle podjętych przez Autorkę prac eksperymentalnych, peptydu LL-37 (strona 35). W jaki sposób zamiana *naturalnych* aminokwasów na ich D analogi zwiększa biodostępność peptydów (strona 38)? Proszę o wyjaśnienie stwierdzenia, że samoagregacja peptydów powoduje modyfikowanie ich właściwości wewnętrznych (strona 40) oraz jak zwiększenie odporności peptydów na proteolizę zmniejsza ich immunogenność



(strona 41). Proponowałbym także zmienić kolejność rozdziałów 7 i 8, co byłoby bardziej logiczne – najpierw przedstawić funkcje neutrofili, a potem opisać czym są NETs.

Cel pracy został przedstawiony szczegółowo. Autorka przedstawiła, w jaki sposób zamierza poszerzyć wiedzę w zakresie oceny wpływu wprowadzonych modyfikacji peptydu LL-37 na ich właściwości geometryczne, zdolności wiązania DNA, stopnia wrażliwości na działanie wybranych enzymów oraz aktywności biologicznej. Należy podkreślić, iż Pani Wiktoria postawiła sobie ambitne zadanie – z jednej strony dość czasochłonna synteza chemiczna, z drugiej badania strukturalne otrzymanych związków oraz wstępne badania biochemiczne. Interdyscyplinarny charakter badań jest niewątpliwą zaletą przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na kilka drobnych nieścisłości: a. zabrakło uzasadnienia dlaczego badano wrażliwość otrzymanych związków na PAD2/4; b. niefortunny tytuł rozdziału 4, który sugeruje, że peptydomimetyki na *jakaś* cytotoksyczność – wydaje mi się, że lepszym rozwiązaniem byłby tytuł *Określenie cytotoksyczności peptydomimetyków wobec wybranych linii komórkowych*; c. dlaczego w ramach prowadzonych badań nie podjęto próby oznaczenia poziomu ekspresji neutrofilowych cytokin?

Kolejny rozdział *Metody przeprowadzonych badań* (21 stron) zawiera opis zastosowanych metod syntetycznych i analitycznych oraz wykonanych testów biochemicznych. Przedstawione opisy, zarówno syntetyczne, jak i biologiczne (brak choćby informacji, skąd pochodziły użyte w pracy enzymy), są w mojej ocenie niewystarczająco szczegółowe. Z tego powodu mam więc kilka pytań: a. jaką N-terminalną grupę ochronną posiadała N-końcowa reszta leucyny użyta w syntezie docelowych peptydomimetyków (Fmoc, Boc)? – ta kwestia została pominięta w rozprawie; b. schemat przedstawiony na Rysunku 10 jest mylący – wynika z niego, że w jakiś magiczny sposób z polipeptydu powstają analogi argininy – można było odczynnik acylujący umieścić obok strzałki, a w dolnych polach podać sekwencję otrzymanych produktów; c. szkoda, że Autorka nie podjęła się zbadania właściwości otrzymanych polipeptydów zawierających reszty Dab jeszcze przed ich modyfikacją, co, być może, pozwoliłoby lepiej zrozumieć zmiany strukturalne i funkcjonalne otrzymanych analogów LL-37; d. jakie były racjonalne powody wyboru plazmidu pUC19 w przedstawionych badaniach?; e. jaka i dlaczego akurat taka była sekwencja użytego w pracy dsDNA?; f. proszę o przedstawienie podczas publicznej



przykładowych analiz LC-MS (opisanych na stronie 68), na podstawie których opracowano wykresy przedstawione na Rysunku 27 (strona 97). Pragnę podkreślić, iż moje uwagi do tej części nie podważają ogromnej pracy eksperymentalnej, jaką wykonała Pani Wiktoria Rejmak - sam opis konkretnej procedury, która na pozór wydaje się prostą czynnością, nie oddaje czasu, który Autorka musiała spędzić przy stole laboratoryjnym.

Dalsza część – *Wyniki i dyskusja* (38 stron) – stanowi rozwinięcie i uzupełnienie części eksperymentalnej. Autorka przedstawiła wyniki przeprowadzonych syntez chemicznych oraz biologicznej ewaluacji otrzymanych pochodnych. Niestety, w wielu miejscach Autorka jedynie podaje uzyskane wyniki bez próby ich analizy, głębszej interpretacji czy dyskusji. Dlatego też proszę o wyjaśnienie: 1. dlaczego nie podano wyników UPLC dla wszystkich otrzymanych związków?; 2. jaka była wydajność otrzymanych związków?; 3. rozumiem, że nie udało się otrzymać pochodnych 4a i 4b, nie mniej jednak wskazana byłaby analiza otrzymanych produktów w miejsce pozostawienia czytelnika ze stwierdzeniem *...nie udało się potwierdzić mas molekularnych...*; 4. dlaczego nie zbadano wpływu stężenia TFE na struktury otrzymanych związków metodą dichroizmu kołowego (Rysunek 17); 5. opis Rysunków 20 i 21 jest niespójny z numeracją studzienek przedstawioną na zdjęciu (ponadto jakość grafik jest bardzo słaba – podczas publicznej dyskusji proszę o dokładne omówienie tych wyników oraz przedstawienie zdjęć w wysokiej jakości, poza tym otrzymane obrazy migracji kompleksów trudno nazwać „prążkami”); 6. dlaczego nie przeanalizowano różnych warunków (choćby różne stężenia czy stosunek N/P) podczas próby wyznaczenia stałych K_d metodą termoforezy mikrofalowej (jak Autorka sama wspomina na stronie 114) oraz czy podjęto w próbę użycia dsDNA-Cy5 w eksperymentach elektroforetycznych? Poza tym z czego wynika tak duża rozpiętość uzyskanych wartości K_d dla LL-37 (Rysunek 22, bo w treści pracy brak jakiegokolwiek analizy czy opisu podjętych badań); 7. w jaki sposób wyniki uzyskane metodą mikroskopii sił atomowych pozwalają na ocenę sposobu oraz dynamikę wiązania peptydomimetyków z DNA (strona 87)?; 8. dlaczego nie przedstawiono wyników AFM w tym samym powiększeniu (Rysunek 23)?; 9. zadanie rozpoczynające się od słów „Badanie z wykorzystaniem...” nie zawiera czasownika (strona 89); 10. połączenie punktów pomiarowych na wykresach zawartych na Rysunku 25 świadczy o tym, że jest to funkcja matematyczna, co jest zupełnie niezrozumiałe; 11. dlaczego efekt działania PAD2 i PAD4 określono jedynie dla dwóch z otrzymanych



związków (strona 100)? Ponadto, dlaczego Autorka nie przeprowadziła jakiegokolwiek głębszej analizy zależności struktury peptydomimetyków od ich podatności na działanie deiminaz ponad stwierdzenie, że modyfikacje „...zwiększyły odporność...” (strona 101); 12. stwierdzenie, że Autorka mierzyła stężenie proteiny 3 (strona 110) jest błędne, gdyż mierzona była aktywność proteolityczna tej enzymu; 13. proszę o dokładną weryfikację i przedstawienie podczas publicznej dyskusji analizy wyników zawartych w podrozdziale 4.1.1., gdyż zaprezentowane na Rysunkach 35-37 wykresy są w całkowitej sprzeczności z zaprezentowaną przez Autorkę analizą – przykładowo, Autorka stwierdza (strona 110), że „W obu systemach HL-60 + LL-37 poziom fluorescencji wynikający z efektywnej hydrolizy substratu PR3 nie jest tak wysoki jak w próbach z dodatkiem LPS...” co jest odwrotnością wyników przedstawionych na Rysunku 35. Podobnie stwierdzenie „Dodatek LPS do próbek z analogami zwiększa ich efekt stymulujący, jednak aktywność ta pozostaje niższa niż w przypadku LL-37 w połączeniu z LPS” jest zaprzeczeniem wyników uzyskanych dla 24h inkubacji, gdzie dla obu testowanych pochodnych zmierzona aktywność PR3 była najwyższa (z wyłączeniem kontroli HL-60 i HL-60+LPS). Proszę o komentarz do tej części rozprawy.

Kolejny rozdział poświęcony jest krótkiemu podsumowaniu uzyskanych wyników – *Podsumowanie i wnioski* (2 strony). Poza wspomnianymi wcześniej uwagami dotyczącymi języka, nie mam do tej części większych uwag. Proszę jednak o wyjaśnienie (punkt 3, strona 114) czym są „punkty przecięcia”.

Pani mgr Wiktoria Rejmak jest współautorką pięciu publikacji naukowych (*Analytical Biochemistry*, 2022, 2024; *Wiadomości Chemiczne*, 2022, 2024×2) i siedmiu doniesień konferencyjnych. Pani Wiktoria była także beneficjentką grantu NCN Preludium Bis 1 oraz kierownikiem dwóch wewnętrznych projektów przyznanych w ramach *Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich* (Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański).

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Wiktorii Rejmak spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Jednocześnie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Wiktorii



Rejmak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

prof. dr hab. inż. Marcin Sieńczyk