

dr hab. inż. Sebastian Demkowicz, prof. Uczelni
80-233 Gdańsk, ul. Gabriela Narutowicza 11/12

☎: 58 347 16 00

✉: sebastian.demkowicz@pg.edu.pl

Gdańsk, 2.07.2025 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Wiktorii Rejmak pt.: „*Nowe analogi ludzkiej katelicyny (LL-37) o zwiększonej odporności na degradację enzymatyczną. Projektowanie, synteza chemiczna i badania biologiczne*” wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Lesnera

Rozprawa doktorska mgr Wiktorii Rejmak pt. „*Nowe analogi ludzkiej katelicyny (LL-37) o zwiększonej odporności na degradację enzymatyczną. Projektowanie, synteza chemiczna i badania biologiczne*” dotyczy bardzo aktualnego zagadnienia z pogranicza chemii bioorganicznej, biochemii i immunologii. Katelicyna LL-37 jest jedynym dotychczas poznanym peptydem antymikrobiającym u człowieka, wywodzącym się z białka prekursorowego hCAP-18. Pełni ona wielorakie funkcje biologiczne: wykazuje bezpośrednie działanie przeciwdrobnoustrojowe (bakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwvirusowe), a także odgrywa istotną rolę immunomodulującą – potrafi stymulować odpowiedź immunologiczną gospodarza, m.in. poprzez modulację sygnałów z receptorów Toll-podobnych (TLR) oraz działa jako chemoatraktant dla różnych typów komórek odpornościowych. Co więcej, literaturowo odnotowano, że LL-37 może uczestniczyć w kontroli procesów nowotworowych (np. poprzez tłumienie niektórych odpowiedzi sprzyjających wzrostowi guza). Ze względu na szerokie spektrum aktywności i małą podatność drobnoustrojów na wykształcenie oporności na peptydy przeciwdrobnoustrojowe, LL-37 stanowi obiecującą bazę do rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych, a także potencjalnie przeciwnowotworowych.

Niestety, naturalny peptyd LL-37 ulega szybkim modyfikacjom i degradacji w warunkach *in vivo*. Jak wiele innych białek i peptydów, LL-37 podlega potranslacyjnej deiminacji (cytrulinacji) reszt argininowych przez enzymy z rodziny deiminaz peptydyloargininowych (PAD). Wykazano, że proces ten znacząco obniża stabilność LL-37 oraz znosi jego podstawowe funkcje biologiczne. Ponadto LL-37 jest podatna na proteolizę

przez różne proteazy obecne w miejscach infekcji lub zapalenia – m.in. proteazy serynowe neutrofilii (np. elastaza neutrofilowa, proteinaza 3), niektóre proteazy tkankowe (kallikreiny) czy proteazy bakteryjne (np. wydzielane przez *Staphylococcus aureus*). Produkty częściowej degradacji LL-37 mogą wykazywać niepożądane, przeciwne do natywnego peptydu działanie, co dodatkowo uzasadnia potrzebę poszukiwania trwałych analogów. Modyfikacje strukturalne peptydu – takie jak wprowadzanie niestandardowych aminokwasów czy elementów peptydomimetycznych – stanowią obiecującą strategię zwiększenia odporności LL-37 na enzymatyczną inaktywację. Szczególnie perspektywiczne jest selektywne PEGylowanie (dołączanie elementów polietylenoglikolu) lub inne modyfikacje łańcuchów bocznych aminokwasów, które mogą poprawić stabilność proteolityczną i wydłużyć czas półtrwania peptydów.

Przedmiotem recenzowanej rozprawy jest właśnie zaprojektowanie i otrzymanie nowych analogów LL-37, cechujących się zwiększoną odpornością zarówno na proteazy, jak i na proces deiminacji. Autorka postawiła hipotezę, że odpowiednie modyfikacje DAPEG – polegające na zastąpieniu wybranych naturalnych aminokwasów specjalnie zaprojektowanymi blokami budulcowymi zawierającymi resztę L-2,3-diaminopropionianu (Dap) zmodyfikowaną łańcuchami polietylenoglikolowymi – pozwolą otrzymać peptydomimetyki zachowujące aktywność LL-37, a jednocześnie niewrażliwe na rozpoznanie i cięcie przez wymienione enzymy. Zgodnie z założeniami, w analogach LL-37 planowano zastąpić kluczowe reszty podatne na działanie enzymów: Arg, Lys, a także wybrane aminokwasy hydrofobowe (jak Phe i Leu/Ile) – odpowiednimi analogami DAPEG, imitującymi właściwości chemiczne tych reszt. Tego typu interdyscyplinarne podejście łączy elementy projektowania chemicznego (synteza peptydów zmodyfikowanych) z oceną biologicznych właściwości uzyskanych analogów. Tematyka pracy wpisuje się w światowe trendy poszukiwania trwałych peptydowych środków terapeutycznych o działaniu przeciwinfekcyjnym i immunomodulującym.

Rozprawa liczy 138 stron maszynopisu i posiada przejrzystą, akademicką konstrukcję: obszerny przegląd literatury, jasno wyodrębnione cele, dokładny opis materiałów i metod, logicznie uporządkowaną prezentację wyników, dyskusję oraz wyczerpujące podsumowanie. Objętość poszczególnych rozdziałów jest dobrze wyważona. Taki układ zapewnia płynne przejście od tła teoretycznego do analizy danych eksperymentalnych. Część literaturowa dowodzi rzetelnej kwerendy: Autorka omawia historię katelicydyn, ich mechanizmy działania, próby stabilizacji AMPs oraz najnowsze doniesienia dotyczące udziału LL-37 w infekcjach wirusowych i procesach onkogennych. Część eksperymentalna jest z kolei odpowiednio szczegółowa i zawiera opisy syntez chemicznych,

zastosowanych metod analitycznych (np. HPLC, spektrometria mas, dichroizm kołowy) oraz procedur badań biologicznych (badania wiązania DNA, ocena cytotoksyczności, analiza odporności na proteolizę i cytrulinację). Rozprawa jest napisana klarownym, naukowym językiem, a terminologia chemiczno-biologiczna została użyta konsekwentnie. Zidentyfikowane usterki mają głównie charakter techniczny – dominują nieliczne błędy fleksyjne w dopełniaczu po czasownikach np. str. 37 „dużą ilości peptydaz”, str. 34 „określenia specyficzność” itp., sporadyczne literówki oraz pojedyncze zbędne przecinki. Nie wpływają one na zrozumiałość treści i nie obniżają płynności lektury. Stylistycznie praca trzyma spójny, rzeczowy ton charakterystyczny dla rozprawy doktorskiej i tekstu naukowego: każdą tezę Doktorantka popiera wynikami i literaturą, unika kolokwializmów oraz nadmiernej emfazy. Struktura akapitów jest logiczna, a ilustracje i tabele dobrze zintegrowane z tekstem.

Cele badawcze sformułowane na stronie 52 rozprawy są konkretne i weryfikowalne. Obejmują: zaprojektowanie sześciu analogów LL-37 zawierających różne warianty DAPEG; porównanie ich odporności na proteolizę i deiminację z peptydem natywnym; ocenę wpływu modyfikacji na strukturę drugorzędową, zdolności kompleksowania DNA i profile komórkowe. Ukierunkowanie na konkretny mechanizm degradacji i jego równoległą eliminację (PR3 i PAD) nadaje pracy wyraźną wartość innowacyjną. Główne założenie badawcze pracy – otrzymanie analogów LL-37 opornych na degradację enzymatyczną, przy zachowaniu wybranych funkcji biologicznych oryginału – uważam za w pełni uzasadnione naukowo. Jak opisano we wprowadzeniu, istnieje wyraźna potrzeba opracowania form LL-37 o większej trwałości. Autorka dążyła do syntezy serii peptydowych analogów LL-37, w których newralgiczne reszty aminokwasowe (Arg, Lys, Phe, Ile) zastąpiono strukturami peptydomimetycznymi typu DAPEG. Taka modyfikacja miała zapobiec zarówno proteolizie (dzięki utrudnionemu dostępowi proteaz do miejsc cięcia), jak i deiminacji (poprzez eliminację naturalnych reszt argininy). Zamierzenia te są oryginalne i spójne z literaturą. Podkreślenia wymaga interdyscyplinarny charakter projektu: obejmuje on syntezę chemiczną, analizy strukturalne oraz testy biologiczne. Taki zakres badań świadczy o ambitnym podejściu Autorki.

W mojej ocenie metody badawcze zastosowane w pracy są adekwatne do postawionych celów i świadczą o wysokim poziomie warsztatu doświadczalnego. W części chemicznej mgr W. Rejmak przeprowadziła syntezę analogów LL-37 metodą Fmoc-SPPS, z zastosowaniem odpowiednich technik oczyszczania i potwierdzania struktury. Opis syntez jest szczegółowy, obejmuje m.in. wprowadzanie modyfikowanych reszt DAPEG. Zastosowane techniki analityczne, w tym spektroskopia CD, testy enzymatycznej degradacji, elektroforeza i DLS, zostały dobrane adekwatnie i są standardowe w badaniach peptydów.

Autorka oceniła również wpływ związków na komórki – przeprowadzono testy cytotoksyczności oraz ocenę odpowiedzi komórkowej. Pewne kwestie można by jednak doprecyzować: w pracy nie podano wydajności syntez, nie uzasadniono doboru długości łańcuchów DAPEG, ani nie zastosowano metod (np. MS/MS, 2D NMR) do potwierdzenia lokalizacji modyfikacji. Zdaję sobie sprawę, że tego typu badania strukturalne byłyby trudne do interpretacji z uwagi na długość łańcucha peptydowego oraz rozbudowanych strukturalnie łańcuchów bocznych mimetyków, niemniej jednak prosiłbym Doktorantkę o komentarz. Brakuje też informacji o rozpuszczalności i potencjalnej agregacji niektórych pochodnych. Uwagi te nie umniejszają jednak wartości części chemicznej, która została przeprowadzona rzetelnie i z dużą samodzielnością.

Uzyskane wyniki doświadczalne potwierdziły w dużej mierze słuszność postawionych hipotez. Po pierwsze, stwierdzono znaczącą poprawę odporności proteolitycznej zmodyfikowanych analogów w porównaniu do natywnej LL-37. Po drugie, analogi zawierające niestandardowe reszty argininopodobne (Dap-G) wykazały istotnie zwiększoną odporność na deiminację w badaniach z enzymami PAD2 i PAD4. Potwierdzono również zachowanie struktury α -helikalnej oraz zdolności do tworzenia kompleksów z DNA. Modyfikacje nie upośledziły zdolności analogów do interakcji z polianionami, co ma znaczenie dla ich potencjalnej funkcji immunomodulującej.

Recenzowana praca ma wiele mocnych stron: innowacyjność projektu, zakres interdyscyplinarny oraz kompleksowość badań, obejmujących syntezę, analizę struktury i właściwości biologiczne. Doktorantka wykazała się samodzielnością i kompetencjami eksperymentalnymi. W mojej ocenie, pewne obszary wymagają jednak omówienia lub uzupełnienia w podczas publicznej obrony:

1. Autorka analizowała wpływ modyfikacji strukturalnych na ładunek peptydów i ich oddziaływanie z DNA. Choć nie badano bezpośrednio wpływu na aktywność przeciwdrobnoustrojową, warto rozważyć, czy zmniejszenie kationowości mogłoby wpłynąć korzystnie na ograniczenie niespecyficznych oddziaływań elektrostatycznych? Czy analogi o niższym ładunku mogłyby penetrować błonę bakterii głębiej, nie będąc zbyt silnie przyciągane do powierzchni? Czy może zmniejszenie ładunku zmniejsza agregację peptydu w roztworze? Te pytania nasuwają się i ich omówienie mogłoby dodatkowo wzbogacić interpretację wyników.
2. W pracy użyto linii komórkowych HL-60 (różnicowanych do neutrofilii) oraz HDFa, CRL-1472 i HB2. Czy Doktorantka rozważyła testy na komórkach pierwotnych (np. neutrofile, monocyty)? Czy tego typu badania mogłyby dostarczyć dodatkowych informacji o

immunomodulującym potencjale otrzymanych analogów? Czy planowane było przeprowadzanie testów aktywności przeciwdrobnoustrojowej?

3. Praca dowodzi odporności analogów na wybrane indywidualne enzymy (proteazy, PAD). Nasuwa się pytanie, jak analogi zachowywałyby się w bardziej złożonych środowiskach biologicznych – np. w osoczu krwi, gdzie obecny jest „koktajl” różnych enzymów, czy w obecności żywych komórek aktywnie wydzielających proteazy. Być może warto byłoby przeprowadzić eksperyment polegający na inkubacji analogów w surowicy krwi lub w pożywce z dodatkiem homogenatu neutrofilii i sprawdzić czas półtrwania peptydów metodą HPLC/MS? Takie alternatywne podejście do testowania stabilności mogłoby jeszcze dobitniej wykazać przewagę analogów nad natywnym LL-37.
4. W kontekście deiminacji – czy Autorka próbowała potwierdzić odporność analogów na PAD w warunkach *ex vivo* (np. dodając analogi do hodowli neutrofilii stymulowanych do wytwarzania NET)?
5. W części eksperymentalnej brakuje mi informacji (o ile rzeczywiście jej brak) na temat wydajności otrzymanych syntez peptydów – choć nie jest to krytyczne dla wniosków biologicznych, byłoby cenne z punktu widzenia chemika zobaczyć, czy wprowadzenie dużych modyfikacji DAPEG nie obniża znacząco wydajności syntezy i oczyszczania.

Powyższe uwagi mają charakter uzupełniający i nie podważają wartości naukowej uzyskanych wyników. Wskazują raczej naturalne kierunki kontynuacji badań.

Reasumując, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Wiktorii Rejmak jest dojrzałą i wartościową pracą naukową, wnosi istotny wkład w dziedzinę badań nad peptydami przeciwdrobnoustrojowymi. Autorka osiągnęła postawione cele: zaprojektowała i zsyntezowała nowe analogi katelicyny LL-37, wykazała doświadczalnie ich zwiększoną odporność na degradację enzymatyczną oraz zachowanie kluczowych funkcji biologicznych. Praca imponuje zarówno pod względem merytorycznym, jak i organizacyjnym – zakres eksperymentów jest szeroki, a uzyskane wyniki zostały wszechstronnie przeanalizowane. Mgr W. Rejmak demonstruje tym samym umiejętność samodzielnego prowadzenia zaawansowanych badań, krytycznego interpretowania danych oraz wyciągania trafnych wniosków. Jej rozprawa świadczy o opanowaniu warsztatu badawczego na poziomie eksperta w swojej specjalności.

Nie mam wątpliwości, że rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauk Chemicznych Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Wiktorii

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

A handwritten signature in blue ink, reading "Sebastian Paulsen". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the left.