

**WYDZIAŁ CHEMII**

dr hab. Monika Kijewska, prof. UW.

Zespół Inżynierii Peptydów

ul. F. Joliot-Curie 14,

50-383 Wrocław

✉ monika.kijewska@uwr.edu.pl

☎ 71 375 7250

Wrocław, 16 czerwca 2026 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Helbik-Maciejewskiej pt.: „Design, chemical synthesis and enzymatic studies of transmembrane serine proteases inhibitors: matriptase-1, matriptase-2 and furin” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Rolki oraz promotor pomocniczej dr Agaty Gitlin-Domagalskiej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska poświęcona jest projektowaniu, syntezie oraz charakterystyce nowych analogów peptydowych będących inhibitorami błonowych proteaz serynowych – matryptazy-1 (MT1) oraz furyny. Tematyka ta wpisuje się w jeden z aktualnych nurtów badań chemii medycznej i biologii molekularnej, gdyż enzymy te odgrywają istotną rolę w licznych procesach fizjologicznych i patologicznych, w tym w progresji nowotworów oraz zakażeniach wirusowych. Szczególnie interesującym zagadnieniem pozostaje opracowanie selektywnych inhibitorów matryptazy-1, zdolnych do odróżnienia tego enzymu od blisko spokrewnionej matryptazy-2, której aktywność pełni odmienne funkcje biologiczne.

Recenzowana rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim i liczy 172 stron. Praca ma klasyczny układ i obejmuje streszczenie w języku angielskim i polskim, wykaz skrótów, obszerne wprowadzenie literaturowe, część eksperymentalną, omówienie wyników wraz z dyskusją, podsumowanie, spis cytowanej literatury oraz zestawienie dorobku naukowego Autorki. Część literaturowa koncentruje się na charakterystyce proteaz serynowych, ze szczególnym uwzględnieniem matryptazy-1, matryptazy-2 oraz furyny, a także ich inhibitorów i peptydowych sond molekularnych. Pani mgr Aleksandra Helbik-Maciejewska w sposób kompleksowy przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący budowy, funkcji biologicznych oraz znaczenia terapeutycznego tych enzymów, omawiając jednocześnie dotychczasowe strategie projektowania peptydowych inhibitorów. Na uwagę zasługuje również uwzględnienie zagadnień związanych z peptydowymi sondami molekularnymi, co poszerza kontekst prowadzonych badań i dobrze uzasadnia przyjętą koncepcję projektowania nowych związków. Rozprawa opiera się na 286 starannie dobranych pozycjach literaturowych, które w sposób wyczerpujący odzwierciedlają aktualny stan wiedzy w zakresie biologii proteaz serynowych, chemii peptydów oraz projektowania inhibitorów tych enzymów. W dalszej części rozprawy przedstawiono



szczególony opis stosowanych metod syntetycznych i analitycznych, obejmujących syntezę peptydów na podłożu stałym, strategię cyklizacji, znakowanie fluorescencyjne oraz metody oceny aktywności enzymatycznej i stabilności proteolitycznej. Najobszerniejszy rozdział stanowi część poświęcona wynikom badań własnych, obejmująca projektowanie i ocenę inhibitorów matryptazy-1 oraz furyny, badania ich właściwości biologicznych, analizę strukturalną oraz optymalizację metody N-metylowania peptydów. Układ pracy jest logiczny, przejrzysty i konsekwentnie prowadzi czytelnika od podstaw teoretycznych do prezentacji oraz dyskusji uzyskanych wyników. Na tle dotychczasowych osiągnięć zespołu badawczego prof. Krzysztofa Rolki prezentowana rozprawa stanowi logiczną kontynuację prowadzonych badań. Wcześniejsze prace grupy doprowadziły do opracowania nowatorskich analogów peptydowych opartych na szkielecie SFTI-1, będących inhibitorami matryptazy-2 (MT2). W ocenianej rozprawie Autorka twórczo rozwinęła ten kierunek badań, wykorzystując zarówno analogi bazujące na szkielecie SFTI-1, jak i alternatywny szkielet inhibitora HV-BBI do projektowania nowych związków o wysokiej aktywności i zwiększonej selektywności wobec matryptazy-1. Przedstawione zagadnienia zostały uporządkowane w sposób logiczny i spójny, tworząc solidne podstawy teoretyczne dla zaplanowanych badań własnych oraz ułatwiając czytelnikowi zrozumienie ich celów i znaczenia.

Największą wartość rozprawy stanowi obszerna część eksperymentalna obejmująca projektowanie, syntezę oraz kompleksową ocenę biologiczną nowych inhibitorów proteaz serynowych. Łącznie Doktorantka otrzymała 49 peptydów, spośród których 36 zaprojektowano jako inhibitory matryptazy-1 (w tym 2 analogi oparte na szkielecie SFTI-1 oraz 34 analogi bazujące na szkielecie HV-BBI), jeden jako inhibitor matryptazy-2 oraz 12 jako inhibitory furyny oparte na szkielecie SFTI-1. Wśród wszystkich otrzymanych związków znalazło się 47 peptydów cyklicznych, w tym 5 bicyklicznych, 39 zawierających mostek disulfidowy, 2 z mostkiem triazolowym, 7 znakowanych 5(6)-karboksyluoresceiną oraz 2 poddane N-metylowaniu, co świadczy o szerokim zakresie zastosowanych strategii projektowania i modyfikacji strukturalnych.

Pierwszy nurt badań dotyczył opracowania selektywnych inhibitorów matryptazy-1. Punktem wyjścia był analog inhibitora HV-BBI wykazujący bardzo wysokie powinowactwo wobec MT1 oraz znaczną selektywność względem matryptazy-2. Na bazie tej struktury Autorka otrzymała 25 nowych analogów, spośród których 15 zachowało aktywność inhibitorową porównywalną ze związkiem wyjściowym, potwierdzając trafność przyjętej strategii projektowania. Wykorzystując symulacje dynamiki molekularnej oraz skanowanie alaninowe wykazano, że reszta Phe13 nie jest kluczowa dla aktywności inhibitora, natomiast zasadnicze znaczenie dla rozpoznawania enzymu mają aminokwasy zlokalizowane w obrębie pętli wiążącej, w szczególności Lys5, Ser6, Ile7 oraz Arg10. Szczególnie wartościowym osiągnięciem było zaprojektowanie skróconych analogów o zmniejszonej masie cząsteczkowej. Spośród nich inhibitor 31 wykazywał nie tylko wysoką aktywność wobec MT1, ale również największą stabilność proteolityczną, co czyni go szczególnie interesującym kandydatem do dalszych badań.



Wykazano ponadto, że zastąpienie mostka disulfidowego mostkiem triazolowym prowadzi do istotnego spadku aktywności biologicznej, podkreślając kluczową rolę naturalnej geometrii mostka disulfidowego w utrzymaniu prawidłowej konformacji inhibitora.

Drugim ważnym kierunkiem badań było opracowanie nowych inhibitorów furyny opartych na szkielecie SFTI-1. Autorka zsyntetyzowała 10 peptydów przeznaczonych do badań aktywności wobec furyny oraz 2 dodatkowe analogi wykorzystywane do badań organizacji strukturalnej. Wykorzystując chemię kombinatoryczną oraz iteracyjną dekonwolucję biblioteki peptydowej zidentyfikowano trzy związki (40, 42 i 46) wykazujące nanomolowe wartości stałej inhibicji (K_i). Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że opracowane inhibitory zostały poddane nie tylko klasycznym badaniom enzymatycznym, ale również zweryfikowano ich potencjał biologiczny w testach przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Szczególnie interesujące wydają się wyniki uzyskane dla wirusa ZIKV, gdzie wszystkie trzy najsilniejsze inhibitory powodowały obniżenie miana wirusa, a inhibitor 40 wykazał wyższą aktywność niż komercyjny inhibitor Dec-RVCR-CMK przy jednocześnie niemal pięciokrotnie wyższym indeksie terapeutycznym i niższej cytotoksyczności. Rezultaty te doprowadziły do zgłoszenia patentowego i wskazują na znaczący potencjał aplikacyjny opracowanego związku. Badania nad analogami z modyfikowanymi mostkami wykazały ponadto, że zamiana mostka disulfidowego na mostek triazolowy skutkuje obniżeniem aktywności i stabilności proteolitycznej, podczas gdy zastosowanie mostka diselenowego pozwala zachować aktywność na poziomie związku macierzystego, potwierdzając izosteryczny charakter tej modyfikacji.

Na uwagę zasługuje również dodatkowy wątek metodologiczny pracy dotyczący optymalizacji procedury N-metylowania peptydów na podłożu stałym. Pani mgr Aleksandra Helbik-Maciejewska wykazała, że reakcja ta może być skutecznie prowadzona z wykorzystaniem różnych urządzeń laboratoryjnych, w tym łaźni ultradźwiękowej i syntezy mikrofalowej, a czas jego trwania można skrócić z 4 godzin do zaledwie 40 minut, zachowując wysokie wydajności reakcji na poziomie 74–100%. Opracowana metoda została z powodzeniem zastosowana do N-metylowania aminokwasów zawierających różne grupy funkcyjne w łańcuchach bocznych, umożliwiając jednocześnie wyeliminowanie problemów związanych z reakcjami ubocznymi obserwowanymi dla reszt kwasu asparaginowego, co znacząco zwiększa jej potencjał aplikacyjny.

Całość przeprowadzonych badań świadczy o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu syntetycznego i analitycznego oraz umiejętności racjonalnego projektowania analogów peptydowych. Na szczególne podkreślenie zasługuje konsekwentna realizacja założonych celów badawczych oraz umiejętne połączenie metod chemii peptydów z badaniami biologicznymi, co pozwoliło nie tylko na identyfikację nowych, obiecujących inhibitorów badanych proteaz, ale również na sformułowanie istotnych wniosków dotyczących zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną.



Pomimo bardzo wysokiej wartości merytorycznej rozprawy oraz staranności wykonania części eksperymentalnej, podczas jej lektury nasunęło mi się kilka pytań i uwag o charakterze dyskusyjnym, które – w mojej opinii – nie umniejszają wartości przeprowadzonych badań, a mogą stanowić punkt wyjścia do dalszej dyskusji.

Pierwsza z nich dotyczy opisu procedur syntezy peptydów. Otrzymane związki były syntezowane z wykorzystaniem trzech strategii, tj. syntezy manualnej, syntezy prowadzonej z użyciem półautomatycznego synteзаторa peptydów oraz syntezy na automatycznym synteзаторze. Zwróciłam jednak uwagę na rozbieżności dotyczące procedury przemywania żywicy po etapach sprzęgania. W przypadku syntezy manualnej (str. 66) po każdym etapie stosowano sekwencję przemywań obejmującą DMF, izopropanol oraz dichlorometan (3×1 min każdy z rozpuszczalników), natomiast w przypadku syntezy prowadzonej na synteзаторze (str. 67) ograniczono się jedynie do przemywania DMF (5×1 min). Byłabym wdzięczna za komentarz, z czego wynikają przedstawione różnice oraz czy były one podyktowane specyfiką wykorzystywanego sprzętu, czy też wynikały z wcześniejszych doświadczeń Autorki związanych z optymalizacją procedury syntezy. W tym kontekście interesujące byłoby również doprecyzowanie, które z prezentowanych w rozprawie peptydów były otrzymywane metodą manualną, a które na synteзаторze peptydów. Ciekawym uzupełnieniem byłaby również informacja, czy określone typy modyfikacji – na przykład wprowadzanie reszt znakowanych 5(6)-karboksyfluoresceiną lub innych niestandardowych aminokwasów – wymagały prowadzenia syntezy manualnej, a także czy podczas syntezy automatycznej lub półautomatycznej zaobserwowano trudności uzasadniające wybór jednej z metod.

Dobór metod analitycznych zastosowanych do charakterystyki otrzymanych związków należy ocenić jako właściwy i odpowiadający standardom obowiązującym w chemii peptydów. Niemniej jednak sposób prezentacji części wyników mógłby zostać nieco dopracowany pod względem graficznym. Wszystkie zamieszczone w rozprawie chromatogramy i widma zostały przedstawione w niewielkim formacie oraz charakteryzują się niską rozdzielczością, co utrudnia ich dokładną analizę. Przygotowanie rycin w wyższej jakości i odpowiedniej skali niewątpliwie zwiększyłoby czytelność prezentowanych wyników oraz walory edytorskie rozprawy. Warto również zwrócić uwagę, że podawanie czasów retencji z dokładnością do trzech miejsc po przecinku wydaje się nadmiernie precyzyjne. W większości przypadków wystarczające jest podanie jednej cyfry po przecinku, natomiast zastosowanie dwóch miejsc po przecinku znajduje uzasadnienie jedynie przy rozdziale związków o bardzo zbliżonych czasach retencji, np. izomerów.

Pewne wątpliwości wzbudziły również wyniki oznaczeń wartości m/z wykonanych metodą MALDI-TOF. Analizując przedstawione dane, zauważyłam dość systematyczne odchylenia pomiędzy wartościami obliczonymi i eksperymentalnymi. Przykładowo, dla peptydu 43 (Fig. 19, str. 69) zarówno dla formy zredukowanej, jak i utlenionej różnica pomiędzy obliczoną a zmierzoną wartością jonu protonowanego $[M+H]^+$ wynosi około 3 Da. Analiza danych analitycznych przedstawionych w Tabeli 2 (str. 60–61) wskazuje, że dla kilku peptydów



występują stosunkowo duże odchylenia pomiędzy masą obliczoną a eksperymentalnie wyznaczoną. W przypadku peptydów 2, 17, 36, 42 oraz 47 różnice sięgają około 2 Da, natomiast dla peptydu 37, 40, 41 wynoszą około 0,5-1 Da. Co istotne, dla znacznej części analizowanych peptydów uzyskano bardzo dobrą zgodność pomiędzy wartościami eksperymentalnymi i teoretycznymi, co wskazuje na prawidłowe wykonanie pomiarów. W rozprawie wskazano, że do rejestracji widm wykorzystano spektrometr Autoflex maX MALDI-TOF, który zgodnie ze specyfikacją producenta, podczas pracy w trybie reflektromowym, charakteryzuje się zdolnością rozdzielczą rzędu 20 000–26 000 oraz dokładnością pomiaru masy wynoszącą 2–5 ppm przy zastosowaniu kalibracji wewnętrznej. Przy takich parametrach instrumentalnych należałoby oczekiwać bardzo dobrej zgodności pomiędzy wartościami teoretycznymi i eksperymentalnymi. Tym bardziej zastanawiające wydają się obserwowane dla części peptydów odchylenia sięgające nawet 2–3 Da. Uprzejmie proszę Autorkę o komentarz dotyczący źródła tych rozbieżności. Czy aparat był każdorazowo kalibrowany przed wykonaniem pomiarów? Czy pomiary były wykonywane w trybie reflektromowym, czy też zastosowano inny tryb pracy spektrometru (np. liniowy), który mógł wpłynąć na uzyskaną dokładność oznaczeń? W tym kontekście nasuwa się również pytanie dotyczące wykorzystania tandemowej spektrometrii mas (MS/MS). W chemii peptydów technika ta jest powszechnie stosowana do analizy sekwencji aminokwasowej syntetyzowanych związków i stanowi cenne uzupełnienie ich charakterystyki. Zastosowanie takiego podejścia wydaje się szczególnie uzasadnione w sytuacji, gdy oznaczenia mas cząsteczkowych wykazują zauważalne odchylenia od wartości teoretycznych. Byłabym wdzięczna za komentarz, czy wykonywano analizy MS/MS, a jeśli nie, jakie przesłanki zdecydowały o rezygnacji z tego etapu charakterystyki.

Kolejna uwaga dotyczy Rysunku 26 (str. 77), przedstawiającego chromatogram HPLC peptydu 44 zawierającego mostek triazolowy po inkubacji z trypsyną. Na schemacie peptydu zaznaczono dwa przewidywane miejsca hydrolizy enzymatycznej, jednak na uzyskanym chromatogramie obserwowanych jest znacznie więcej sygnałów, niż można byłoby oczekiwać na podstawie zaproponowanego mechanizmu degradacji. Jednocześnie w rozprawie zamieszczono jedynie widma masowe peptydu wyjściowego oraz jednego produktu hydrolizy, pozostawiając pozostałe sygnały chromatograficzne bez identyfikacji. Byłabym wdzięczna za komentarz, czy odpowiadają one innym produktom częściowej hydrolizy, produktom wtórnych przemian zachodzących podczas inkubacji, czy też ich pochodzenie nie zostało jednoznacznie ustalone. Dodatkowo zwróciłam uwagę, że sygnał o wartości m/z 1205,675 został zinterpretowany jako addukt potasowy fragmentu peptydu pozbawionego trzech reszt argininy oraz zawierający zhydrolizowane wiązanie peptydowe zlokalizowane w obrębie pętli wiążącej. Taka interpretacja wydaje się dość nietypowa, zwłaszcza że analizowany fragment nadal zawiera resztę lizyny, stanowiącą dogodne miejsce protonacji, przez co należałoby oczekiwać przede wszystkim obserwacji jonu protonowanego. Oczywiście nie można wykluczyć tworzenia adduktów z jonami potasu, jednak w przedstawionym przypadku wymagałoby to szerszego uzasadnienia. W związku z tym uprzejmie proszę Autorkę o wyjaśnienie, jakie przesłanki skłoniły

Ją do przypisania zarejestrowanego sygnału właśnie adduktowi potasowemu oraz czy rozważano alternatywne interpretacje tego piku. Interesujące byłoby również odniesienie się do dostępnych danych literaturowych dotyczących skłonności peptydów zawierających mostek triazolowy do preferencyjnego tworzenia adduktów z jonami potasu oraz wskazanie, czy tego typu zjawisko jest charakterystyczne dla analizowanych układów.

Interesującym zagadnieniem pozostaje również możliwość dalszej optymalizacji opracowanych inhibitorów furyny w celu zwiększenia ich aktywności przeciwwirusowej przy jednoczesnym ograniczeniu potencjalnych działań niepożądanych wynikających z fizjologicznej roli tego enzymu w organizmie. Chętnie poznałabym opinię Autorki, jakie kierunki dalszych modyfikacji badanych związków uważa za najbardziej obiecujące i czy planowane są kolejne etapy ich optymalizacji.

W części poświęconej badaniom przeciwnowotworowym warto byłoby także szerzej przedyskutować obserwację, zgodnie z którą komercyjny inhibitor furyny nie wykazywał aktywności wobec badanych linii komórkowych, podczas gdy niektóre otrzymane analogi wykazywały wyraźny efekt biologiczny. Rodzi to pytanie o rzeczywisty mechanizm działania tych związków oraz możliwość występowania dodatkowych celów molekularnych. W rozprawie występują pojedyncze błędy edytorskie (np. str. 67 „KCN in H₂ ml”), które jednak nie wpływają na jej wartość naukową. Biorąc pod uwagę objętość dysertacji, tego rodzaju drobne uchybienia są w pełni zrozumiałe i trudno ich całkowicie uniknąć.

Przedstawione powyżej uwagi mają przede wszystkim charakter dyskusyjny i nie wpływają na moją wysoką ocenę zarówno poziomu naukowego rozprawy, jak i kompetencji badawczych Autorki.

Dorobek naukowy Doktorantki należy ocenić bardzo wysoko. Jest ona współautorką pięciu publikacji naukowych, z których cztery bezpośrednio dotyczą tematyki realizowanej w ramach rozprawy doktorskiej. Przy czym warto zaznaczyć, że w momencie składania dysertacji kolejny manuskrypt Doktorantki był już złożony do czasopisma *Journal of Molecular Biology*, natomiast obecnie został on zaakceptowany do publikacji. W konsekwencji łączny współczynnik wpływu (*Impact Factor*) prac współautorstwa Doktorantki, liczony według wartości obowiązujących w roku ich publikacji, wzrasta do 27,563 (stan na 16.06.2026, zgodnie z danymi udostępnionymi przez Repozytorium Biblioteki Głównej Uniwersytetu Gdańskiego), co stanowi bardzo dobry wynik na etapie kształcenia w szkole doktorskiej. Na szczególne podkreślenie zasługuje również aktywność w pozyskiwaniu środków na badania naukowe. Doktorantka jest kierownikiem grantu NCN PRELUDIUM 23, a ponadto była kierownikiem czterech grantów wewnętrznych Uniwersytetu Gdańskiego (dwóch konkursów UGrants-start oraz dwóch grantów BMN dla Młodych Naukowców), co świadczy o jej samodzielności badawczej, dojrzałości naukowej oraz umiejętności skutecznego planowania i realizacji projektów badawczych. Doktorantka aktywnie uczestniczy również w życiu naukowym, prezentując wyniki swoich badań podczas ośmiu konferencji naukowych, w tym trzech wystąpień ustnych i pięciu prezentacji

posterowych, zarówno na konferencjach krajowych, jak i międzynarodowych. Jej działalność została dodatkowo doceniona nagrodą za najlepszą prezentację w obszarze nauk farmaceutycznych podczas XX Ogólnopolskiego Seminarium Doktorantów i Studentów „Na pograniczu chemii, biologii i farmacji”.

Recenzowana rozprawa doktorska stanowi wartościowe i oryginalne opracowanie naukowe dotyczące projektowania nowych inhibitorów matryptyazy-1 oraz furyny. Na szczególne uznanie zasługuje kompleksowość przeprowadzonych badań, obejmujących racjonalne projektowanie związków, ich syntezę, charakterystykę analityczną oraz wszechstronną ocenę właściwości biologicznych. Dodatkowym osiągnięciem jest opracowanie zoptymalizowanej procedury N-metylowania peptydów na fazie stałej, która może znaleźć praktyczne zastosowanie w nowoczesnej chemii peptydów. Uzyskane wyniki mają zarówno istotną wartość poznawczą, jak i potencjał aplikacyjny, a przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie cennych wniosków dotyczących zależności pomiędzy strukturą a aktywnością inhibitorową, co znajduje potwierdzenie w publikacjach w renomowanych czasopismach naukowych.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska mgr Aleksandry Helbik-Maciejewskiej stanowi oryginalne i wartościowe osiągnięcie naukowe, wnoszące istotny wkład w rozwój badań nad peptydowymi inhibitorami proteaz serynowych. W mojej ocenie spełnia ona wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w obowiązujących przepisach (art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”) i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. **W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy, nowatorski charakter uzyskanych wyników, ich znaczenie dla rozwoju dyscypliny oraz bogaty dorobek publikacyjny będący efektem przeprowadzonych badań, **składam wniosek o wyróżnienie przedłożonej rozprawy doktorskiej.**

Monika Kijewska

Monika Kijewska