

Prof. UAM dr hab. Lech Celewicz
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Wydział Chemii
Pracownia Chemii Nukleozydów i Nukleotydów
ul. Umultowska 89 b
61-614 Poznań

Poznań, 20.04.2015

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Michała Gładysza zatytułowanej „Acykliczne analogi oligonukleotydów otrzymywane metodą chemii “click””

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr. Michała Gładysza została wykonana pod kierunkiem Prof. UAM dr. hab. Jana Mileckiego w Pracowni Spektrochemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Praca dotyczy syntezy acyklicznych analogów dinukleotydów (ApT i ApA), w których zamiast wiązania fosfodiesterowego metodą chemii “click” wprowadzono mostek triazolowy (1,4 dipodstawiony 1,2,3-triazol). Otrzymane analogi dinukleotydów, po odpowiednim przygotowaniu do automatycznej syntezy oligonukleotydów DNA metodą amidofosforynową na podłożu stałym, zostały użyte do syntezy oligonukleotydów zawierających w sumie 12 jednostek nukleotydowych i posłużyły do badań nad stabilnością termodynamiczną uzyskanych dupleksów. Rozprawa nawiązuje do ważnego nurtu badań, aktualnego w literaturze światowej, nad wpływem modyfikacji łańcucha fosfocukrowego na zdolność do hybrydyzacji fragmentów DNA. Podobnym przykładem tego typu modyfikacji są peptydowe kwasy nukleinowe (ang. peptide nucleic acids, PNA), które są odporne na specyficzne dla kwasów nukleinowych enzymy hydrolityczne.

Rozprawa doktorska mgr. Michała Gładysza liczy 128 stron i składa się z trzech głównych modułów: części literaturowej (str. 11-40), dyskusji wyników (str. 41-80), po której następuje podsumowanie (str. 81-82) oraz części eksperymentalnej (str. 85-118). Pracę poprzedza jednostronicowy „Abstract” w języku angielskim, spis treści (str. 1-4), wstęp (str. 5-7) oraz podrozdział „Założenia i cel pracy” (str. 9-10). Pracę zamyka „Wykaz stosowanych skrótów” (str. 119-121), niestety nie ułożony w porządku alfabetycznym, co utrudnia szukanie i wykaz cytowanej literatury (str. 123-128) obejmujący 123 pozycje. Rozprawa jest

zatem zbudowana w sposób tzw. klasyczny z dosyć dobrym zachowaniem proporcji pomiędzy głównymi częściami.

W części literaturowej Doktorant przedstawił, dosyć skrótowo, katalizowaną jonami miedzi(I) cykloaddycję Huisgena azydków organicznych i terminalnych alkinów (sztandarową reakcję chemii “click”). Brakuje omówienia możliwości prowadzenia tej reakcji w różnych warunkach. Mógłby także zostać zaprezentowany mechanizm reakcji uzasadniający, że ulegają jej tylko terminalne alkiny. Oszczędnie jest też przedstawiona katalizowana jonami rutenu(II) cykloaddycja azydków organicznych i alkinów. Natomiast z większym rozmachem Doktorant przedstawił zastosowanie głównej reakcji chemii “click” do modyfikowania kwasów nukleinowych i ich komponentów. Zostały dosyć szeroko zaprezentowane modyfikacje części zasadowych (w tym przyłączanie znaczników fluorescencyjnych), części cukrowych i szkieletu kwasów nukleinowych. Osobny podrozdział został poświęcony syntezie analogów nukleozydów o potencjalnej aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej z wykorzystaniem chemii “click”. Literatura dotycząca chemii “click” jest już dzisiaj bardzo obszerna, zarówno jeżeli chodzi o prace badawcze jak i przeglądowe, trudno wszystkie istotne zacytować w ramach rozprawy doktorskiej, jednak myślę, że Doktorant był dosyć oszczędny pod tym względem. Brakuje w wykazie literatury chociażby, ważnej pracy: Lucas R. *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **49**, 1004-1007, (2008) dotyczącej syntezy triazolowego analogu TpT z zastosowaniem mikrofal, czy też pracy przeglądowej Kappe C. O., Van der Eycken E., *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 1280-1290 (2010) zatytułowanej “Click chemistry under non-classical reaction conditions”. Ponadto, chciałbym zauważyć, że w części literaturowej powinno się znaleźć krótkie omówienie metody amidofosforynowej syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym. Stanowiłoby to dobre wprowadzenie w problematykę pracy, zwłaszcza dla początkujących adeptów nauki czytających rozprawę.

W części dysertacji zatytułowanej „Dyskusja wyników” Doktorant przedstawił własne opracowania syntez acyklicznych analogów dinukleotydów ApT i ApA zawierających łącznik triazolowy zamiast ugrupowania fosfodiesterowego, tj. związków **65** i **66**. W pierwszym etapie prac syntetycznych zostały otrzymane „połówki nukleotydowe”: komponent alkinowy **64**, zawierający resztę adeniny i zablokowaną grupę hydroksylową w części pseudocukrowej blokadą dimetoksytrytylową oraz dwa komponenty azydkowe zawierający resztę tyminy **60** i adeniny **59** z wolną grupą hydroksylową w części pseudocukrowej. Ogólnie, synteza tych komponentów została dobrze zaplanowana, jednak trochę dziwi wprowadzanie na początku

syntezy blokady *t*-butylo-difenylosililowej na jedną z grup hydroksylowych w związku **49**, po to aby później zastąpić ją blokadą dimetoksytrytylową (potrzebną w procesie automatycznej syntezy oligonukleotydów metodą amidofosforynową). Może trzeba było od początku do końca syntezy pozostać przy blokadzie dimetoksytrytylowej?

Następnie komponenty alkinowy i azydkowe zostały odpowiednio sprzęgnięte w reakcji “click” katalizowanej jonami miedzi(I) wytworzonymi *in situ* z siarczanu miedzi(II) i askorbinianu sodu, co doprowadziło do związków **65** i **66**.

W kolejnym etapie syntezy przeprowadzono reakcję fosfitacji związków **65** i **66** z użyciem chloro(2-cyjanoetylo)-*N,N*-diizopropylamidofosforanu. Fosfitowany analog ApT (związek **68**) uzyskano z wydajnością 91%, co wydaje się być wartością zawyżoną przy braku blokady na grupie egzoaminowej (6-NH₂) reszty adeniny, natomiast analog ApA (związek **67**) z wydajnością tylko 49%. Może lepszym rozwiązaniem byłoby użycie do reakcji fosfitacji związków **65** i **66** posiadających blokowaną grupę egzoaminową za pomocą blokady benzoilowej, co niewątpliwie poprawiłoby również wydajność syntezy oligonukleotydów zawierających modyfikowane fragmenty ApT i ApA z łącznikiem triazolowym. Przy czym blokada benzoilowa, musiałaby zostać wprowadzona już do komponentu alkinowego **64** jeszcze przed reakcją “click”. Zapewne Doktorant zechce przedyskutować tę kwestię w trakcie obrony pracy doktorskiej?

Związki, które posłużyły Doktorantowi do syntezy acyklicznych analogów nukleotydów („intermediaty” syntetyczne) zostały poddane badaniom na aktywność cytostatyczną *in vitro* z wykorzystaniem dwóch nowotworowych linii komórkowych HeLa (nowotworu raka szyjki macicy) i KB (nowotworu nosogardzieli). Badaniu poddano 8 związków, przy czym dwa z nich nie zawierały zasady (pirymidynowej lub purynowej) i akurat te związki nie wykazywały znaczącej aktywności. Badania zostały wykonane przez dr. Piotra Ruszkowskiego z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Wartości parametru IC₅₀ (tj. stężenia związku wymaganego do zahamowania wzrostu komórkowego w 50%, ang. inhibitory concentration) dla badanych związków została podana w µg/mL (Tabela 1, str. 64), co utrudnia porównanie aktywności cytostatycznej tych związków ze standardem cytarabiną. Wartości parametru IC₅₀ lepiej przeliczać na stężenie µM (µmol/L). Po takim przeliczeniu okazuje się, że trzy związki **58**, **64** i **69** wykazują większą aktywność (mniejszą wartość parametru IC₅₀) niż cytarabina znany nukleozydowy lek przeciwnowotworowy. Przy okazji omawiania badań przeciwnowotworowych zawartych w rozprawie, chciałbym zauważyć, że

tytuł podrozdziału 7.1., występujący w części eksperymentalnej na stronie 106 i w spisie treści, powinien być inny, na pewno nie: „Zastosowane kultury bakteryjne”, lecz na przykład: „Zastosowane nowotworowe linie komórkowe”.

W następnym etapie pracy badawczej Doktorant przeprowadził syntezę sześciu oligonukleotydów o długości 12 jednostek nukleotydowych zawierających modyfikowane fragmenty ApT i ApA z łącznikiem triazolowym na końcu 5' w środku oraz w na końcu 5' i w środku równocześnie. Zsyntetyzowane też zostały dwa oligonukleotydy o identycznej sekwencji bez wprowadzonej modyfikacji triazolowej oraz dwa komplementarne oligonukleotydy w celu otrzymania dupleksów. Synteza oligonukleotydów została przeprowadzona w automatycznym syntetyzerze metodą amidofosforynową na podłożu stałym. Po oczyszczeniu zsyntetyzowanych oligonukleotydów metodą HPLC i ich scharakteryzowaniu metodą spektrometrii mas otrzymano odpowiednie dupleksy, które wykorzystano w badaniach ich stabilności termodynamicznej. Badań tych nie przeprowadzono na dupleksach zawierających dwukrotną modyfikację triazolową z uwagi na zbyt małą ilość otrzymanego oligonukleotydu po oczyszczeniu metodą HPLC. Dla otrzymanych dupleksów wyznaczono temperatury topnienia i wartości entalpii swobodnej. Uzyskane wyniki wskazują na destabilizujący charakter wprowadzonej zmiany w postaci łącznika triazolowego. Temperatura topnienia dupleksów zawierających nić z modyfikacją triazolową zmniejszyła się względem dupleksów wzorcowych. Ponadto, wykazano, że modyfikacja na końcu łańcucha ma mniejszy wpływ destabilizujący niż modyfikacja w środkowej części nici.

W części eksperymentalnej pracy Doktorant precyzyjnie przedstawił procedury otrzymywania nowych związków oraz podał ich charakterystykę spektroskopową: ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR i MS.

Ogólnie chciałbym stwierdzić, że praca wykonana jest na dobrym poziomie badawczym, napisana jest starannie, poprawnym językiem i czyta się ją z zainteresowaniem. Natomiast, nie wiem dlaczego Doktorant w sformułowaniu „chemia “click” ” wyraz “click” konsekwentnie pisze z wielkiej litery, podobnie jak nazwy niektórych związków, na przykład cytarabina czy luminarozyna. Rozprawa jest dobrze opracowana pod względem graficznym, zawiera 30 rysunków, 27 schematów i 4 tabele.

Doktorant jest współautorem dwóch publikacji z zakresu pracy doktorskiej w czasopiśmie o zasięgu krajowym (*Wiadomości Chemiczne* oraz *Nauka i Przemysł*), uważam,

że rozprawa zawiera gotowy materiał na dalsze publikacje. Poza tym, Doktorant jest współautorem pięciu prezentacji na konferencjach naukowych, w tym jednej międzynarodowej.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr. Michała Gładysza, z uwagi na liczne osiągnięcia badawcze o charakterze istotnych nowości naukowych, oceniam jako wartościową. Przedstawione uwagi krytyczne w znacznym stopniu tej oceny nie umniejszają. W moim przekonaniu przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia w całej rozciągłości wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki” (Dz. U. nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami). W związku z tym stawiam wniosek o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. UAM dr hab. Lech Celewicz

