

dr hab. Elżbieta Kierzek, profesor IChB PAN
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Poznań, 14 kwietnia 2015 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Michała Gładysza pt:
Acykliczne analogi oligonukleotydów otrzymane metodą chemii 'click'

Praca doktorska mgr Michała Gładysza powstała w Pracowni Spektrochemii Organicznej Wydziału Chemii UAM kierowanej przez profesora Jana Mileckiego. Promotor pracy doktorskiej od wielu już lat zajmuje się różnymi aspektami chemii bioorganicznej kwasów nukleinowych. Badania naukowe, jakie prowadził mgr Gładysz są nowym tematem w grupie badawczej profesora Mileckiego.

Praca doktorska posiada klasyczny układ i składa się z wszystkich części wymaganych w tego typu rozprawach. W części literaturowej kandydat szczegółowo omawia założenia metody „click”, różne aspekty mechanistyczne tego typu sprzęgania. W dalszej części szczegółowo opisuje wykorzystanie metody „click” w chemii bioorganicznej kwasów nukleinowych. Na początku przedstawia wykorzystanie tego typu reakcji dla przygotowania modyfikowanych antysensowych oligonukleotydów oraz siRNA. Dalej zajmuje się omówieniem nanomateriałów bazujących na oligonukleotydach, w których wykorzystano metodę „click”. Mgr Gładysz kończy ten fragment omówieniem reagentów fluorescencyjnych i służących badaniu struktury kwasów nukleinowych, w których wykorzystano to podejście. Drugi, obszerniejszy fragment części literaturowej dotyczy wykorzystania metody „click” do przygotowania nukleozydowych i nukleotydowych analogów, które służyły otrzymaniu pochodnych o potencjalnej aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej. Autor po kolei omawia modyfikacje, jakie, stosując podejście „click”, wprowadzano w obrębie zasad heterocyklicznych i fragmentów cukrowych nukleozydów i nukleotydów. W ostatnim fragmencie części literaturowej mgr Gładysz omawia przygotowanie analogów oligonukleotydowych, w których naturalne wiązanie fosfodiesterowe zostało zastąpione analogiem triazolowym, powstałym właśnie w wyniku sprzęgania dwóch fragmentów oligonukleotydowych metodą „click”. Jest to zapewne najważniejszy fragment części literaturowej, gdyż bezpośrednio związany z tematem pracy doktorskiej mgr Gładysza.

Jak w większości prac doktorskich część dotycząca badań własnych jest najciekawszą. Kandydat planował syntezę kilku oligonukleotydów w serii DNA, do których w określone miejsca wprowadzał

jednocześnie dwa rodzaje modyfikacji. Jedną było zastąpienie pochodnych rybozy ich acyklicznymi analogami. Druga modyfikacja polegała na zastąpieniu wiązania fosfodiesterowego jego triazolowym analogiem. W tym celu przygotował rodzaj dimerów, które zawierały równocześnie oba rodzaje modyfikacji. W dalszej kolejności zostały one przekształcane w odpowiednie amidofosforyny i jako takie użyte do syntezy oligonukleotydów metodą amidofosforynową na podłożu stałym.

Chcąc uzyskać zamierzony cel kandydat przygotował oba 5'- i 3'-fragmenty owych dimerów zawierające odpowiednio grupy alkinową i azydową. Kandydat szczegółowo opisuje przygotowanie obu fragmentów wychodząc z stosunkowo prostych związków chemicznych. Zastosowanie odpowiednich grup ochronnych, doprowadziły go do pochodnych 59, 60 i 64 pokazanych na schematach 25 i 26. Należy zauważyć, iż mimo, że były to w miarę proste związki chemiczne kandydat sporo zmagął się z ich przygotowaniem. W wielu przypadkach wyjściowymi substratami były pochodne polihydroksylowe i trudnym było uzyskanie selektywności blokowania wymaganych grup hydroksylowych. Być może autor powinien spróbować innej metody usunięcia blokady benzylidenu z pochodnej 46, która doprowadziłaby go do monoestrów benzoesowych. Te pochodne można byłoby selektywnie blokować grupą dimetoksytrytylową a następnie usunąć estry benzoesowe, co powinno w miarę prosto doprowadzić do pochodnej 50. W roku 2008 ukazała się praca, w której opisano oksydacyjne częściowe odblokowanie grupy benzylidenu (*Tetrahedron Letters*, 49, 6390, 2008) i takie podejście wydaje się być bardzo użyteczne. Prosiłabym mgr Gładysza o przedyskutowanie w trakcie obrony takiej aranżacji syntezy bloku alkinowego.

Przygotowanie bloku azydowego przebiegło prościej, chociaż wymagało dużej precyzji w jego oczyszczaniu. Następnie oba bloki budulcowe zostały przekształcone w odpowiednie analogi acyklicznych nukleozydów. Kandydat otrzymał acykliczne analogi adenozyne zarówno dla bloku alkinowego i azydowego oraz analog tymidynowy dla bloku azydowego. Czy kandydat może wyjaśnić, dlaczego synteza innych acyklicznych analogów stwarzała tak duże trudności?

W toku badań mgr Gładysz wybrał 8 zsyntetyzowanych analogów nukleozydów i nukleotydów do przetestowania ich potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych w liniach komórkowych. Prosiłabym kandydata o przedstawienie kryteriów wyboru związków do badań.

Kolejnym istotnym etapem syntezy było sprzęganie odpowiednich bloków alkinowych i azydowych metodą „click”. W ten sposób mgr Gładysz otrzymał dwa rodzaje acyklicznych dimerów typu AT i AA, które zawierały „internukleotydowe” wiązanie triazolowe. Te ostatnie pochodne działaniem chlorofosfiny zostały przekształcone w odpowiednie dimeryczne amidofosforyny gotowe do użycia w syntezie oligonukleotydów metodą amidofosforynową na podłożu stałym. Zastanawiające jest, dlaczego grupa aminowa pochodnej adenozyne w acyklicznych dimerach 65 i 66 nie była blokowana grupą

ochronną. Zostało opisane w literaturze, że synteza nukleozydów z nieblokowanymi grupami aminowymi jest możliwa, ale wymaga specjalnych warunków. W tym miejscu należy wspomnieć klasyczną publikację Gryznova i Letsingera z 1991 (*JACS*, 113, 5876, 1991) czy nowsze doniesienia Hayakawy (*JACS*, 120, 12395, 1998) i Sekine (*JACS*, 126, 10884, 2004). W przygotowaniu odpowiednich amidofosforynów i syntezy oligonukleotydów z wolnymi grupami aminowymi istotnym było użycie odpowiednich aktywatorów na obu etapach. Prosiłabym mgr Gładysza o komentarz na ten temat podczas obrony pracy doktorskiej.

Tak przegotowane amidofosforyny acyklicznych dimerów AA i AT zostały użyte do syntezy oligonukleotydów. Odpowiednie bloki dimeryczne zostały wprowadzone w pozycje środkowe i 5'-terminalne modelowych oligonukleotydów, które po sparowaniu się z komplementarnym oligonukleotydem tworzyły modelowe dupleksy DNA. Podczas syntezy oligonukleotydów metodą amidofosforynową na podłożu stałym kandydat obserwował wyraźny spadek wydajności kondensacji, gdy wprowadzał do oligonukleotydu modyfikowany acykliczny i dimeryczny amidofosforyn. Interesującym byłoby usłyszeć opinię kandydata, co było przyczyną spadku wydajności. Czy wynikało to z braku blokady grupy aminowej adenozy, czy zawady przestrzennej dimerycznego amidofosforynu, czy z warunków kondensacji (za krótki czas, nie optymalny aktywator), czy jeszcze z jakiś innych powodów?

W sumie mgr Gładysz otrzymał cztery 12-nukleotydowe oligonukleotydy, które posłużyły do przygotowania czterech modelowych dupleksów DNA. W dwóch z nich acykliczny dimer AA ulokowany był w środku a w dwóch w 5'-terminalnej pozycji dupleksu. To samo dotyczyło dupleksów DNA zawierających analogi dimeru AT. Oprócz modyfikowanych dupleksów przygotował także ich niemodyfikowane izosekwencyjne analogi, które były dupleksami referencyjnymi. Wszystkie one posłużyły do badania wpływu acyklicznych triazolowych analogów na trwałość termodynamiczną dupleksów. Badania termodynamiczne zostały przeprowadzone zgodnie z ogólnymi regułami, metodą topnienia UV (*UV-melting method*). W tej części rozprawy zabrakło recenzentowi tabeli z pełnymi parametrami trwałości termodynamicznej badanych dupleksów, które kandydat na pewno posiada. W dyskusji kilka razy wymieniana jest entalpia choć pewnie chodziło o energię swobodną. Analiza krzywych topnienia prowadzona była dwoma sposobami a zgodność uzyskanych wyników świadczy, że proces topnienia dupleksów przebiegał w sposób dwustanowy. Jeśli analogi acykliczno-triazolowe ulokowane były w pozycji 5'-terminalnej dupleksu to powodowały one nieznaczne obniżenie jego trwałości termodynamicznej a zmiana energii swobodnej dupleksu była rzędu 0.7-1 kcal/mol. Gdy jednak dimer acykliczno-triazolowy umiejscowiony był w środku dupleksu DNA spadek trwałości dupleksu był bardzo znaczący a energia swobodna zmieniała się o 5-6 kcal/mol.

Ze strukturalnego i termodynamicznego punktu widzenia można było oczekiwać takich wyników. Ilość wiązań w analogu triazolowym była podobna jak w naturalnym wiązaniu fosfodiesterowym, jednak geometria obu wiązań internukleotydydowych jest całkowicie inna. Znane są w chemii oligonukleotydów kwasy LNA (*Locked Nucleic Acids*) i UNA (*Unlocked Nucleic Acids*), w którym usztywnienie lub rozluźnienie struktury wiązania diestrowego sprawia, że ich wpływ na trwałość termodynamiczną RNA i DNA dupleksów jest olbrzymi. Jeśli oligonukleotydy mają formować stabilne termodynamicznie dupleksy to tworzące je jednoniciowe składniki muszą być wstępnie podobnie ustrukturalizowane, jak w tworzonym dupleksie.

W końcowych fragmentach swojej rozprawy doktorskiej mgr Gładysz przedstawia szczegółowe informacje eksperymentalne o prowadzonych badaniach i zestawia prace literaturowe, z których korzystał podczas wykonywania dysertacji.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr Gładysz podejmuje bardzo trudny, ale bardzo innowacyjny w swym zamyśle temat badań. Intencją autora było otrzymanie i badanie takich analogów nukleotydydowych, które wprowadzone do dupleksu poprawiałyby zdolność wiązania się do komplementarnej nici, ale również taki oligonukleotyd byłby odporny na hydrolizę chemiczną i enzymatyczną w medium komórkowym. Jest to szczególnie ważne, gdy myśli się o zastosowaniu tak modyfikowanych oligonukleotydów do wyciszania określonych genów czy innych badań *in vivo*.

Praca napisana jest poprawnie, chociaż autor mógłby w kilku miejscach ją zmodyfikować i udoskonalić. Szkoda, że opisując prowadzone reakcje w dyskusji wyników nie podaje ich wydajności, bo dałoby to dodatkowe informacje o przebiegu reakcji i prawidłowości wybranego sposobu syntezy. Uważam, że wszystkie tabele, schematy i rysunki powinny być również opisane z nazwy. Podczas dyskusji wyników własnych badań autor dość rzadko odwołuje się do wyników podobnych prac opisanych w literaturze. Nie zgadzam się z pierwszym zdaniem rozprawy doktorskiej, że „życie zapisane jest genach”. W genach zapisana jest informacja genetyczna i zastanawia mnie, co autor rozumie pod pojęciem „życie”? Zdaża się, że kandydat zbyt ogólnie opisuje podstawowe procesy biologiczne przez co zbliża się w swych sformułowaniach do określeń popularnonaukowych i mało precyzyjnych.

Reasumując, uważam, że jest to ciekawa i wartościowa praca doktorska, która wnosi dużo informacji o chemii bioorganicznej i termodynamice kwasów nukleinowych. Pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Michała Gładysza spełnia całkowicie wymogi merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu im.

Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Michała Gładysza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Elżbieta Kierzek

dr hab. Elżbieta Kierzek, profesor IChB PAN
