

prof. dr hab. inż. Krystyna Dzierzbicka
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Organicznej
Politechnika Gdańska
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk

Gdańsk, 18.09.2017

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Natalii Pieszko pt. „*Synteza i charakterystyka triazolowych ligandów regulatorowych struktur RNA wirusa HIV-1*”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Małgorzaty Natalii Pieszko pt. „*Synteza i charakterystyka triazolowych ligandów regulatorowych struktur RNA wirusa HIV-1*” została wykonana w Katedrze Biochemii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Piotra Muchy, prof. UG. Praca jest zredagowana w sposób przyjęty dla rozpraw doktorskich (liczy 187 stron) i składa się z rozdziałów (poprzedzonych wykazem stosowanych skrótów i symboli), w których Autorka opisuje przegląd literaturowy (str. 13-47), badania własne (str. 48-171), w tym cel pracy (str. 51-53), plan pracy (str. 54) oraz podsumowanie i wnioski (str. 165-171). Praca zakończona jest wykazem literatury cytowanej obejmującym 149 pozycji, zawiera 136 rysunków i 23 tabele. W tym układzie redakcyjnym brakuje streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. Do rozprawy dołączony został dorobek naukowy Doktorantki obejmujący publikacje i komunikaty konferencyjne oraz płyta CD zawierająca widma masowe, widma ^1H NMR, ^{13}C NMR otrzymanych związków i strukturę krystalograficzną zsyntezowanego estru *tert*-butylowego kwasu 5-bromo-1-(2-etyloftalimido)-1*H*-1,2,3-triazolo-4-*o*ctowego (5Br-1,4-TzlAA). Podobała mi się trafna sentencja zacytowana na początku pracy „Teoria i praktyka to jedność, jak ciało i dusza, i jak ciało i dusza są najczęściej skłócone ze sobą” *Marie von Ebner-Eschenbach*.

W części literaturowej (34 strony) Doktorantka bardzo starannie od strony edytorskiej, poprawnym językiem opisała modyfikacje kwasów nukleinowych: zasady azotowej (zasady pirymidynowe, zasady purynowe, substytuty naturalnie występujących zasad azotowych); pierścienia cukrowego (w pozycji C2', C3', C4' i C5', zastąpienie atomu tlenu w pierścieniu cukrowym innym atomem, kwas ksenonukleinowy); wiązania internukleotydowe

(podstawienie atomu tlenu atomem siarki, grupą aminową, borowodorem, grupą metylową); szkieletu fosforanowo-cukrowego (peptydowe kwasy nukleinowe, kwasy morfolino-nukleinowe, kwasy nukleinowe oparte na szkielecie 4-aminoproliny) oraz reakcję „click chemistry” katalizowaną jonami miedzi(I) czy jonami rutenu(II) cykloaddycję Huisgena azydków organicznych i terminalnych alkinów (prezentując mechanizmy reakcji). *Dlaczego tej reakcji ulegają tylko terminalne alkiny?*

Omówiła również zastosowanie reakcji „click chemistry” w chemii kwasów nukleinowych oraz w syntezie związków biologicznie czynnych.

W ostatniej dekadzie znaczenie reakcji „click chemistry” w badaniach naukowych znacznie wzrosło o czym świadczy duża liczba publikacji oryginalnych i przeglądowych pojawiających co roku na ten temat. Literatura donosi, że dzięki niej, jesteśmy w stanie w szybki i prosty sposób otrzymać wiele nowych i ciekawych związków, przykładem są reakcje cykloaddycji mające szerokie zastosowanie w chemii nukleotydów.

W opisie badań eksperymentalnych Doktorantka przedstawiła własne opracowania syntez analogów zawierających układ triazolowy. Doktorantka w ramach pracy doktorskiej: otrzymała pochodne zasad nukleinowych oraz ester *tert*-butylowy kwasu 5-(*N*-ftalimido)pent-3-ynowego, które wykorzystwała jako substraty do reakcji „click chemistry”; zaprojektowała i otrzymała: 6 monomerów triazolowych kwasów nukleinowych (TKN) - 2 monomery w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena, katalizowanej kompleksem rutenu(II) (TKN1) i 4 monomery również w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena, katalizowanej jonami miedzi(I) (TKN2); 3 fragmenty triazolowych kwasów nukleinowych zbudowanych z monomerów TKN2 komplementarne do regulatorowych struktur RNA wirusa HIV-1; 6 triazolowych pochodnych aminokwasów (TzLAA) oraz ich krótkie fragmenty; dendrymer zawierający 3 reszty guaniny oparty na tripropargiloaminie; scharakteryzowała oddziaływania otrzymanych fragmentów TKN2 i (TzLAA)₃-NH₂ ze strukturą regulatorową HIV-1 znajdującą się na 5'-końcu mRNA wiążącą białko regulatorowe wirusa HIV-1 aktywujące transkrypcję (Tat) (TAR RNA) oraz niemodyfikowaną domeną antykodonu ludzkiego tRNA^{Lys3} (ASLK) za pomocą elektroforezy kapilarnej, dichroizmu kołowego (CD) i spektroskopii fluorescencyjnej; oznaczyła struktury 17 związków za pomocą widm ¹H-NMR i ¹³C-NMR oraz strukturę krystalograficzną 5Br-TzLAA.

Przeprowadzone i opisane w pracy eksperymenty poszerzają stan wiedzy i wnoszą istotny wkład w poszukiwanie nowych inhibitorów zawierających układy triazolowe stosowane w terapii do zahamowania replikacji wirusa HIV-1 (ludzkiego wirusa niedoboru odporności). Należy on do wirusów z rodzaju lentiwirusów, z rodziny retrowirusów i atakuje głównie

pomocnicze limfocyty T wywołując AIDS. W pierwszym etapie prac Doktorantka przeprowadziła syntezę *N*-alkilowych i *N*-alkinowych pochodnych nukleozasad (Tabela 7, str. 91): tyminy (5 pochodnych), cytozyny (7 pochodnych), adeniny (5 pochodnych), 2-amino-6-chloropuryny (3 pochodne) i guaniny (3 pochodne) w sumie otrzymała 23 pochodne. W pierwszym etapie uzyskała halogenopochodne nukleozasad, następnie atom halogenu podstawiała ugrupowaniem azydkowym stosując 3-krotny molowy nadmiar azydku sodu względem nukleozasady. Wykorzystała również reakcję Mitsunobu w syntezie alkilowych pochodnych tyminy (Tabela 5, str. 68) oraz ¹*N*-(*p*-toluenosulfonylo)imidazol do *N*-alkilowania zasad azotowych przy użyciu alkoholi w obecności K₂CO₃ i trietyloaminy w bezwodnym DMF (Tabela 6, str. 70) jednak bez sukcesu. *Proszę o racjonalne wytłumaczenie przebiegu tych reakcji.* Na Rys. 69 (str. 84) przedstawiono reakcję otrzymywania 2-amino-6-chloro-*N*⁹-(2-propynylo)puryny. *Brakuje jednak wyjaśnienia regioselektywności tej reakcji.* Kolejny krok to synteza pochodnych kwasu 5-aminopent-3-ynowego czyli *N*-(2-propynylo)ftalimidu i estru *tert*-butylowego kwasu 5-(*N*-ftalimido)pent-3-ynowego, których charakterystyka fizykochemiczna została zawarta w Tabeli 8 (str. 96), a w Tabeli 9 (str. 98) zamieszczono pozostałe próby otrzymywania pochodnych kwasu 5-aminopent-3-ynowego zakończone niepowodzeniem. Warto podkreślić, że reakcje wrażliwe na wilgoć i tlen Doktorantka prowadziła w zaprojektowanych przez siebie komorach do pracy w atmosferze gazu obojętnego (na str. 97 pokazane są ich zdjęcia). Otrzymano także *N*-(2-azydoetylo)ftalimid i ester *tert*-butylowy kwasu 3-bromoprop-2-ynowego pozostałe substraty w reakcji „click” (Tabela 10, str. 102 prezentuje charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych pochodnych). Kolejny etap prac eksperymentalnych to synteza monomerów triazolowych kwasów nukleinowych. Doktorantka zoptymalizowała reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowanej kompleksem rutenu(II) w celu otrzymania dwóch monomerów TKN1 z wykorzystaniem azydkowych pochodnych adeniny i guaniny jednak z bardzo słabymi wydajnościami (5% i 2,4%) (Tabela 13, str. 108). W przypadku azydkowych pochodnych tyminy i cytozyny Doktorantka nie otrzymała oczekiwanych produktów. *Dlaczego?* Synteza TKN2 w 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowanej jonami miedzi(I), w której użyto alkinowych pochodnych nukleozasad oraz Fmoc-azydohomoalaninę, a jony miedzi były generowane *in situ* z siarczanu miedzi w obecności czynnika redukującego askorbinianu sodu pozwoliła otrzymać 4 monomery TKN2, ich struktury prezentuje Rys. 94 (str. 111), a charakterystykę fizykochemiczną Tabela 15 (str. 115). Otrzymano również fragmenty TKN2 na nośniku stałym (Tabela 16, str. 120). Sprawdzone czy trimer homopolimerowy AAA-NH₂ (TKN2) można otrzymać wykorzystując

katalizowaną CuI reakcją „click” prowadzoną na żywicy oraz w roztworze (str. 120-123) konkludując, że opracowana procedura na żywicy pozwala na otrzymanie TKN zbudowanych z takich samych monomerów w szybki i prosty sposób. Doktorantka otrzymała 1,4-dipodstawione 1,2,3-triazolowe monomery aminokwasów stosując: kwas azydooctowy i *N*-Boc-prop-2-ynyloaminę oraz *N*-2-(azydoetylo)ftalimid i kwas prop-2-ynowy w obecności jonów miedzi(I) jako katalizatora (Tabela 18, str. 128). Do syntezy 1,5-dipodstawionego oraz 1,4,5-tripodstawionego 1,2,3-triazolowego monomeru aminokwasowego użyła *N*-(2-azydoetylo)ftalimidu i kwasu prop-2-ynowego oraz *N*-(2-azydoetylo)ftalimidu i estru *tert*-butylowego kwasu 3-bromoprop-2-ynowego w obecności jonów rutenu(II) jako katalizatora, co sugeruje opis w tekście, a nie podany schemat reakcji (Rys. 106, str. 129), otrzymując dwa monomery (Tabela 20, str. 133). *Proszę o wyjaśnienie reakcji podanej na str. 129 porównując ją z reakcją na str. 124 (Rys. 102)*. Ciekawym fragmentem pracy było otrzymanie dwóch regioizomerów 1-Phth-1,4-TzlAA i 1-Phth-1,5-TzlAA (1-ftalimido-1,5-(1,2,3-triazolo)aminokwasów, str. 133-135) w celu oceny wpływu podstawnika 5-bromo na bioaktywność pierścienia triazolowego. Biorąc pod uwagę talidomid, pochodną kwasu α -*N*-ftalimidoglutarimidowego, lek uspokajający i przeciwbólowy wprowadzony do użytku w II połowie XX w, który okazał się czynnikiem teratogennym (drugi stereoizomer (*S*)-talidomid pojawił się podczas produkcji leku w wyniku racemizacji) zbadano cytotoksyczność i aktywność proliferacyjną *in vitro* otrzymanych pochodnych. Badania zostały wykonane w GUMed w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii przez dr hab. Michała Pikulę oraz mgr Adrianę Schumacher na dwóch liniach komórkowych: nienowotworogennej, unieśmiertelnionej linii komórkowej keratynocytów człowieka (HaCaT) oraz fibroblastów skóry (46BR.1N). Okazało się, że badane pochodne nie są toksyczne, nie wywołują również efektu proliferacyjnego w komórkach badanych linii i zdaniem Doktorantki mogą być stosowane jako struktury wiodące lub peptydomimetyczne w związkach o potencjalnych właściwościach przeciwwirusowych. *Jakie były racjonalne przesłanki do wyboru takich linii komórkowych?*

Syntezę trimerów TzlAA [Fmoc-(1,4-TzlAA)₃-NH₂, (1,4-TzlAA)₃-NH₂] *Czy to jest poprawny zapis? Dlaczego NH₂ wiązania amidowego zostało wyszczególnione i pisane jest kursywą?* przeprowadzono na nośniku stałym z zastosowaniem procedury Fmoc (Rys. 112, str. 137) oraz Boc-(1,4-TzlAA)₃-OH (Rys. 113, str. 139). Ich charakterystykę fizykochemiczną podano w Tabeli 21 (str. 142).

Próby otrzymania dłuższych fragmentów TzlAA (4, 5 lub 6 monomerów) nie powiodły się. *Jak można to wytłumaczyć, czy Doktorantka ma to swój pogląd?*

Kolejny etap to synteza tris-[(1-etylo- N^9 -guanozylo-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)metylo]aminy z N^9 -(2-azydoetylo)guaniny i tripropargiloaminy w reakcji „click” katalizowanej jonami miedzi(II). Otrzymano trzy główne produkty reakcji: docelową tripodstawioną pochodną tripropargiloaminy oraz jej mono- i dipodstawioną pochodną, które Doktorantka poddała ponownie reakcji z N^9 -(2-azydoetylo)guaniną podnosząc wydajność docelowej tripodstawionej pochodnej. Zsyntezowany związek, zdaniem Doktorantki, ma posłużyć jako ligand do badania oddziaływań z fragmentami kwasów nukleinowych bogatych w reszty guaniny i cytozyny. *Dlaczego właśnie taka pochodna została zaprojektowana?*

Ostatnim zaprezentowanym etapem badań była analiza oddziaływań otrzymanych fragmentów TKN2 i (TzlAA)₃-NH₂ z regulatorowymi strukturami RNA wirusa HIV-1 za pomocą elektroforezy kapilarnej, dichroizmu kołowego (CD) i spektroskopii fluorescencyjnej. Doktorantka zaznaczyła, że mają one charakter badań wstępnych, których celem było określenie warunków jakie musi spełnić triazolowy ligand aby mógł specyficznie rozpoznawać i wiązać się z komplementarną sekwencją kwasów nukleinowych kluczowych w replikacji wirusa HIV-1. W badaniach z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej nie zaobserwowano tworzenia się kompleksu TAR-ligand oraz ASLK-ligand. Doktorantka tłumaczyła to słabymi wiązaniami wodorowymi i planowaniem w kolejnych projektowanych strukturach ligandów zawierających lizynę i argininę. *Dlaczego takie ligandy, proszę o głębszą analizę?*

Z analizy krzywych CD wynika, że ASLK jest znacznie mniej stabilny w porównaniu do struktur TAR. Natywna struktura TAR UCU jest mniej stabilna niż mutant TAR UUU. Największy wzrost stabilności Doktorantka zaobserwowała dla oddziaływań TCCCAG-NH₂ z TAR UCU, zaś spadek dla oddziaływań AAA-NH₂ oraz (TzlAA)₃-NH₂ z TAR UUU. Badania z zastosowaniem spektrofluorymetrii wykazały, że poza wiązaniami wodorowymi oraz potencjalnymi efektami asocjacji warstwowej pomiędzy resztami 1,2,3-triazoli i nukleozasadami również czynniki steryczne mają udział w wiązaniu się ze strukturą TAR.

Należy podkreślić, że obszar w którym porusza się Doktorantka stanowi skomplikowany materiał badawczy wynikający z jednej strony trudnej chemii cukrów czy związków heterocyklicznych oraz wykonywania dużej ilości pracochłonnych i czasochłonnych eksperymentów syntetycznych, z drugiej zaś koniecznością opracowania sposobu oczyszczania otrzymanych nowych związków by spełniały one kryteria czystości niezbędne do wykonania badań strukturalnych oraz biologicznych. Stopień opanowania przez mgr Małgorzatę Pieszko syntezy fragmentów kwasów nukleinowych zarówno w roztworze jak i

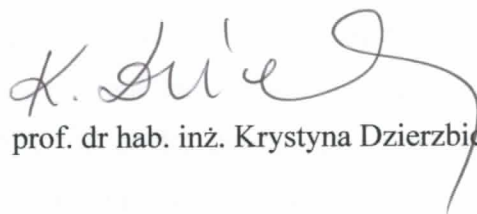
na fazie stałej oraz wiedza z zakresu analizy i interpretacji wyników umożliwiły jej w pełni realizację założonych celów badawczych.

Kilka uwag ogólnych:

- przyjęte jest, że N-, O-, H-, m-, t- piszemy kursywą;
- w podanych nazwach związków lokanty atomu azotu powinny być napisane w indeksie górnym, dotyczy to całej rozprawy; Czy zapis stosowany przez Doktorantkę jest poprawny?;
- mam wątpliwości co do poprawności nazw związków podanych na str. 113 i 114;
- wydajność zazwyczaj podajemy do jednego miejsca po przecinku;
- w nazwach związków nie stosujemy myślnika jeżeli nie ma podanego lokantu;
- skróty zamieszczone w wykazie nie powinny być ponownie wyjaśniane w tekście;
- „odparowałam” – żargon laboratoryjny, powinno być „oddestylowałam na wyparce rotacyjnej”.

Pani Małgorzata Pieszko jest współautorką 2 publikacji z listy filadelfijskiej (*J. Pept. Sci., Prot. Pept. Lett.*), 54 abstraktów konferencyjnych oraz 3 publikacji popularno-naukowych.

Reasumując, stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca zawiera elementy nowości oraz odpowiedni dorobek naukowy a tym samym spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim wynikające z „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U. z 14 marca 2003 r. Nr 65, poz. 595) i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Natalii Pieszko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


prof. dr hab. inż. Krystyna Dzierzbicka