

Prof. dr hab. Jacek Jemielity  
Laboratorium Chemii Bioorganicznej  
Centrum Nowych Technologii  
Uniwersytet Warszawski  
e-mail: [j.jemielity@cent.uw.edu.pl](mailto:j.jemielity@cent.uw.edu.pl)  
tel. 22 5543774

Warszawa 31.08.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Justyny Gołębowskiej  
p.t. „Nukleozydo Boranofosfoniany–Badania Mechanistycznej Syntetycznej”**

Nukleotydy pełnią w żywych organizmach szereg funkcji niezbędnych dla prawidłowego ich działania. Są nośnikami energii niezbędnej do napędzania przebiegu procesów biochemicznych, są kofaktorami enzymów, są cząsteczkami sygnalizacyjnymi oraz w końcu składnikami i substratami do biosyntezy materiału genetycznego. To sprawia, że chemicznie modyfikowane analogi tych biocząsteczek są niezwykle cennymi narzędziami stosowanymi do badań procesów biologicznych, jak również mogą być wykorzystywane do ingerowania w te procesy również w aspekcie terapeutycznym. Zastosowania terapeutyczne są bodajże najważniejszą siłą napędową badań nad modyfikowanymi pochodnymi (pro)nukleotydowymi oraz oligonukleotydowymi i na tym polu naukowcy mogą pochwalić się spektakularnymi sukcesami w opracowaniu leków przeciwko chorobom nowotworowym, wirusowym, czy przeciwko rdzeniowemu zanikowi mięśni. Ostatnie miesiące upływające w cieniu pandemii koronawirusa sprawiły, że chyba już nikt nie kwestionuje potrzeby powstawania nowych terapeutyków.

Motywacja do wprowadzania modyfikacji do (oligo)nukleotydów jest różnorodna, lecz najczęściej jest powiązana ze zmianą pewnych właściwości biologicznych, przy zachowaniu funkcjonalności w warunkach komórkowych. W związkach modyfikowanych w grupie fosforanowej najczęściej chodzi o zwiększenie trwałości w warunkach komórkowych lub zwiększenie przenikalności przez błony biologiczne. Niezależnie jednak od motywacji modyfikowania nukleotydów, czy nawet bardziej ogólnie, związków chemicznych dla przyszłych zastosowań tych związków kluczowe wydają się

dwie kwestie: zapewnienie wydajnej metody syntezy, poznanie mechanizmów według, których związki te powstają oraz zrozumienie ich reaktywności, co pozwala później na racjonalne projektowanie nowych związków do konkretnych zastosowań. Poznanie reaktywności pozwala też przewidywać losy tych związków nawet w tak złożonym środowisku jakim jest żywy organizm. Warto podkreślić, że takie badania mechanistyczne to zadanie niezwykle trudne, a czasem wręcz niewdzięczne i być może dlatego w chemii nukleotydów coraz rzadsze. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani Justyny Gołębiewskiej, wykonana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem Prof. Jacka Stawińskiego i dr Joanny Romanowskiej, to doskonały przykład badań z tego nurtu. Dotyczy ona badania reaktywności funkcji boranowej nukleozydo boranofosfonianów, znanych w literaturze również jako boranofosforany. W swej pracy Kandydatka w szczególności zbadała reaktywność boranofosfonianów wobec zróżnicowanych strukturalnie N-nukleofili w warunkach utleniających.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa Pani mgr Justyny Gołębiewskiej została przygotowana w formie cyklu 3 publikacji opatrzonej 25 stronicowym komentarzem. Na zbiór prac, składa się dwie publikacje w renomowanym *J. Org. Chem.* (IF2019 = 4.335), oraz jednej o charakterze popularnonaukowym opublikowanej w lokalnym czasopiśmie (*Wiadomości Chemiczne*). We wszystkich trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, w jednej z nich obok Promotora jedynym, odpowiedzialnym za wszystkie wyniki eksperymentalne. Ponadto mgr Gołębiewska jest współautorem trzech kolejnych prac, które nie zostały włączone do doktoratu (*Eur. J. Med. Chem.* oraz dwie prace popularnonaukowe opublikowane w cyklu „Na Pograniczu Chemii i Biologii”) oraz zgłoszenia patentowego dokonanego w Urzędzie Patentowym RP.

Pewną inspiracją do podjęcia badań przez Doktorantkę w ramach projektu doktorskiego była praca z laboratorium M. Caruthersa opublikowana w *JACS*, a dotycząca reaktywności grupy boranowej w oligonukleotydach zawierających nukleozydy boranofosfonianowe, które następnie przekształcano w różnego rodzaju pochodne fosforanowe (np. amidofosforany, tiofosforany i C-fosfoniany). Wątpliwości u doktorantki i zapewne jej promotorów wzbudził jednak mechanizm tych przekształceń zaproponowany Caruthersa i współpracowników. W celu weryfikacji, a właściwie obalenia tego mechanizmu Doktorantka zaplanowała eksperyment stereochemicznej analizy korelacyjnej, z wykorzystaniem modelowego dinukleozydo (3'-5') H-fosfonianu, co przede wszystkim miało posłużyć weryfikacji stereochemii tego procesu (Caruthers i współpracownicy postulowali retencję konfiguracji). Należy tu docenić odwagę Doktorantki, nie tylko dlatego, że badania mechanistyczne są trudne, ale również, dlatego że pozytywny efekt tych badań oznaczał zmierzenie się z autorytetem naukowym autora kwestionowanego mechanizmu jak i prestiżem czasopisma w którym mechanizm ten został ogłoszony. Doktorantka wychodząc z mieszaniny stereoizomerów modelowego H-fosfonianu otrzymała produkty dwiema metodami, stosując badaną reakcję oraz na drodze oksydatywnej kondensacji H-fosfonianów z aminami, której stereochemia jest znana (zachodzi z

inwersją konfiguracji). Produkty powstałe w obydwu reakcjach zostały zbadane przy użyciu  $^{31}\text{P}$  NMR i okazało się, że są identyczne, co wskazuje na inwersję konfiguracji w obydwu procesach i co tym samym oznaczało błędną interpretację opisaną w pracy Caruthersa w JACS. Inwersja konfiguracji ma oczywiście również implikacje dla mechanizmu wg. którego proces przebiegał, co słusznie zauważyła w swojej pracy Doktorantka. Ta konkluzja doprowadziła do zaproponowania innego mechanizmu uwzględniającego stereochemię procesu, oraz fakt, że w procesie tym zużywane są dwa ekwiwalenty jodu. Rezultatem tych badań była praca opublikowana w *J. Org. Chem* w roku 2018.

Niejako kontynuacją tej pracy było zbadanie reaktywności boranofosfonianów z aminami 3-trzeciorzędowymi oraz heteroaromatycznymi w obecności jodu. Zainteresowanie tymi reakcjami wynikało zapewne z obserwacji, że produkty reakcji były zasadniczo różne od reakcji amin pierwszo- i drugorzędowych w takich samych warunkach. Autorka zaobserwowała tworzenie produktów zawierających ugrupowanie P-B-N. To tym bardziej ciekawe, że tego typu związki okazały trwałe w warunkach zastosowanych metod ich oczyszczania. Zachęciło to Doktorantkę do badań nad mechanizmem tego procesu, a wystarczająca trwałość związków pozwalała również na zbadanie ich podstawowych właściwości. W pierwszej kolejności podjęto próbę zbadania co było faktycznym czynnikiem utleniającym w układzie jod/pirydyna, jednak wyniki tych badań nie doprowadziły do jasnej konkluzji. Dzięki zastosowaniu spektroskopii  $^{31}\text{P}$  i  $^{11}\text{B}$  NMR udało się sformułować ogólny mechanizm reakcji diestrów boranofosfonianowych z aminami pierwszo-, drugo-, trzeciorzędowymi oraz heteroaromatycznymi za pośrednictwem jodu. Kluczowym etapem było wytworzenie ubogiego w elektrony związku pośredniego  $\lambda^3$ -boranofosfonianu który reagował z aminą tworząc związek zawierający ugrupowanie P-B-N. Zaobserwowano istotne różnice w reaktywności boranofosfonianów w badanych reakcjach w zależności od użytego rozpuszczalnika. Przykładowo w acetonitrylu istotną część mieszaniny produktów stanowiła pochodna pirofosforanowa, powstała w wyniku rozerwania wiązania P-B. Potwierdzenie mechanizmu wymaga dalszych badań, przy czym sami autorzy pracy nie wykluczają alternatywnych mechanizmów. Podsumowanie tych badań opisano w kolejnej pracy opublikowanej w br w *J. Org. Chem*. Badania te poszerzają wiedzę o reaktywności związków zawierających wiązanie P-B, a zrozumienie reaktywności tego typu związków pozwala racjonalnie projektować struktury docelowych związków oraz ich wydajną syntezę.

Autorski komentarz do cyklu prac będących przedmiotem recenzowanej pracy jest krótki, w pewnym sensie jest to spowodowane tym, że Autorka skupia się w nim na podsumowaniu osiągnięć własnych. Natomiast stan wiedzy dotyczący obszaru badawczego, bezpośrednio związanego z dysertacją zamieszczono w pracy przeglądowej opublikowanej w *Wiadomościach Chemicznych*. W przeglądzie tym Doktorantka w klarowny sposób najpierw przedstawia metody otrzymywania nukleozydo boranofosfonianów, dzieląc je ze względu na rodzaj zastosowanej chemii, znane z syntezy oligonukleotydów metody amidofosforynowe oraz H-fosfonianowe, wyodrębniając z tych grup

dotychczasowe metody wykorzystujące specjalne odczynniki boranofosfonylujące. W kolejnym rozdziale pracy przeglądowej Doktorantka opisała syntezę oligonukleotydów (głównie fragmentów DNA), uwzględniając wśród opisanych metod takie pozwalające na otrzymywanie oligonukleotydów o zdefiniowanej stereochemii grup boranofosfonianowych. W drugiej części przeglądu przedstawiono wybrane właściwości biologiczne pochodnych nukleozydo i oligonukleozydo boranofosfonianów, przedstawiając przykłady zastosowania tego typu związków do tworzenia proleków przeciwwirusowych i modyfikowanych oligonukleotydów do terapii polegającej na wyciszaniu genów. W gruncie rzeczy badań właściwości związków boranofosfonianowych w literaturze nie ma aż tak wiele, aby była konieczność dokonywania wyboru. Szkoda, że Doktorantka, nie podjęła się bardziej przekrojowego opisu zastosowań boranofosfonianów. Jest to o tyle ważne, że tego typu przykłady stanowią mocne uzasadnienie dla rozwijania metod syntetycznych oraz po części motywację do podejmowania badań mechanistycznych, jak już podkreślałem w recenzji, stanowiących często nie lada wyzwanie. W związku z powyższym będę zobowiązany jeśli Doktorantka podczas publicznej obrony przedstawi kilka innych, nie ujętych w pracy, zastosowań tej grupy związków, pokazujących ich biologiczną wartość.

Mimo, że sam komentarz do prac oryginalnych jest krótki to daje on próbkę zdolności pisarskich doktorantki, które oceniam pozytywnie. W komentarzu tym Doktorantka logicznie podsumowuje uzyskane wyniki starając się wskazać najistotniejsze jej zdaniem osiągnięcia. Komentarz napisany jest poprawnym, profesjonalnym językiem poza nielicznymi, niefortunnymi sformułowaniami jak np. na stronie 26 „labilizacja wiązania P-B”. Zamieszczone schematy wykonane są przejrzysto i ułatwiają zrozumienie toku rozumowania Doktorantki. Nieliczne uwagi związane z edytorską stroną pracy to mieszanie języka angielskiego i polskiego na schematach (np. Schemat 5a i 5b) oraz pewna dowolność w używaniu skrótów np. na Schemacie 10 raz pirydyna jest oznaczona pełnym słowem, raz skrótem „py”, a z kolei na Schemacie 11 „Py”.

Bogaty materiał doświadczalny, uzyskany podczas realizacji pracy obejmuje zarówno rozwijanie metod syntezy chemicznej modyfikowanych nukleotydów i oligonukleotydów, jak również analizę spektroskopową uzyskanych produktów. Rozprawa wnosi istotny wkład w badania nad boranofosfonanowymi analogami nukleotydów i z całą pewnością może w przyszłości znaleźć odzwierciedlenie w tworzeniu narzędzi o pożądanym właściwościach. Dorobek Kandydatki uważam za istotny, szczególnie dwie pierwszoautorskie prace w J. Org. Chem. uważam za dowód jej dojrzałości jako młodego naukowca. Dodatkowo, w ocenie aktywności naukowej Doktorantki warto zwrócić uwagę na skuteczność w pozyskiwaniu grantów badawczych. Mgr Gołębiowska była m. in. kierownikiem projektu NCN Preludium.

W konkluzji, uważam że przedstawiona mi do oceny rozprawa stanowi bogaty i oryginalny materiał doświadczalny, cenny z punktu widzenia dalszych prac nad nukleozydo boranofosfonianami



o znaczeniu terapeutycznym, diagnostycznym jak również poznawczym. Rozprawa wnosi istotny wkład w badania nad szerokim zagadnieniem jaki stanowią modyfikacje fosforanowe w nukleotydach. W związku z powyższym z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa Doktorska spełnia wszelkie warunki określone w stosownej Ustawie i wnioskuję do do Rady Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Justyny Gołębowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Janek Jemielniak