



Prof. dr hab. Wojciech Kamysz

Gdańsk, 24.04.2019

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej

Wydział Farmaceutyczny

Gdański Uniwersytet Medyczny

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „Synteza i badania fizykochemiczne pochodnych 1,2-Bis(pirydylo)etylenu jako potencjalnych, termowrażliwych znaczników fluorescencyjnych”,

wykonanej przez Panią magister Agnieszkę Witkowską.

Podczas planowania ścieżki syntezy chemicznej pożądanym jest by każdy z etapów był dobrze zdefiniowany, przebiegał selektywnie i możliwie z najwyższą wydajnością. Często podczas syntezy reakcja zachodzi z udziałem jednej grupy funkcyjnej (typu grup), która ulega odpowiednim przekształceniom. Sytuacja bywa złożona jeśli w danej cząsteczce występuje więcej niż jedna grupa danego typu, która potencjalnie mogłaby brać udział w reakcji będącej podstawą jednego z wielu zaplanowanych etapów na ścieżce do upragnionego produktu końcowego. Zbagatelizowanie tego problemu prowadzić może do otrzymania mieszaniny podobnych do siebie produktów. Izolowanie interesującej nas molekuly byłoby w takim przypadku bardzo pracochłonne, kosztochłonne i znacząco wpłynęłoby na obniżenie całkowitej wydajności syntezy a w skrajnych przypadkach mogłoby okazać się niemożliwe. Kolejnym aspektem, który warto wziąć pod uwagę podczas planowania syntezy jest usuwanie grup ochronnych w sposób selektywny, czyli taki który dotyczy jednej grupy (typu) i nie prowadzi do przedwczesnego pozbycia się pozostałych. W celu zwiększenia prawdopodobieństwa osiągnięcia zadowalających rezultatów danej syntezy stosuje się ortogonalne grupy ochronne, których warunki usuwania są różne (swoiste dla danego rodzaju grupy) i nie wpływają na stabilność innych grup. Rozwiązanie to stosowane jest m.in. w chemii peptydów, gdzie na cząsteczkę składa się zwykle wiele reszt aminokwasowych z reaktywnymi ugrupowaniami w łańcuchach bocznych. W zależności od rodzaju grupy ochronnej może być ona usuwana za pomocą np. kwasów, zasad, anionów fluorkowych, światła, czy też podwyższonej temperatury. Znaczniki należące do ostatniej z wymienionych grup stanowiły podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej.

Termolabilne grupy ochronne (TGO) najczęściej stosowane są w automatycznej syntezie kwasów nukleinowych do ochrony grupy fosforanowej. TGO zawierające układ



2-pirydynylowy (2-Py TGO) zarówno przed jak i po odszczepieniu od chronionego ugrupowania wykazują fluorescencję. 2-Py TGO przyłączona do chronionego ugrupowania ma budowę liniową zaś po odszczepieniu cykliczną, co wiąże się ze zmianami fluorescencji (widma emisyjnego) i może być w łatwy sposób wykorzystane do ich detekcji. Poza aspektem syntezy chemicznej nie bez znaczenia jest fakt, że owe grupy ochronne stanowią formę znacznika fluorescencyjnego, które znajdują szerokie zastosowanie w chemii kwasów nukleinowych, biologii i medycynie. Celem pracy było opracowanie nowych TGO będących analogami 1,2-bis(pirydylo)etylenu, wyznaczenia ich parametrów fizykochemicznych oraz określenie warunków przyłączania i odszczepiania od modelowego oligonukleotydu.

Praca doktorska Pani mgr Agnieszki Witkowskiej składa się z 229 stron, w tym streszczenia w języku angielskim, spisu treści, wykazu stosowanych skrótów, 68 rysunków, 49 schematów, 27 wykresów oraz 20 tabel. Praca została podzielona na wstęp, opis dorobku naukowego, opis celu i zakresu pracy, część literaturową, badania własne i dyskusję wyników, część eksperymentalną, opis najważniejszych wyników oraz bibliografię.

Tematyka pracy wpisuje się w wieloletnie badania nad termolabilnymi grupami ochronnym prowadzone w ramach działalności Zakładu Chemii Biopolimerów Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN pod kierownictwem dok. hab. Marcina Krzysztofa Chmielewskiego będącego jednocześnie promotorem pracy doktorskiej Pani magister Agnieszki Witkowskiej. Należy nadmienić, że badania nad znacznikami fluorescencyjnymi oraz TGO dotyczą aż czterech zgłoszeń patentowych, których Doktorantka jest współautorką. Ponadto Pani magister Agnieszka Witkowska kierowała grantem dla Młodych Naukowców w roku 2017, którego tematyka bezpośrednio dotyczy rozprawy doktorskiej. W części teoretycznej niniejszej pracy zostały omówione zagadnienia związane z grupami ochronnymi w chemii organicznej, pirydyną i jej pochodnymi, absorpcją i emisją promieniowania elektromagnetycznego przez związki organiczne ze szczególnym uwzględnieniem fluorescencji oraz z syntezą oligonukleotydów. Autorka obszernie opisała typy grup ochronnych oraz mechanizm odszczepiania grup 2-*N*-pirydynylowych oraz ich ortogonalność. Analiza literatury dokonana przez Panią magister Agnieszkę Witkowską na temat pirydyny i jej pochodnych związana jest bezpośrednio z pochodnymi 1,2-bis(pirydylo)etylenu będących podstawą niniejszej rozprawy, zaś przybliżenie teorii na temat zjawiska fluorescencji ułatwia przyswojenie kolejnych części rozprawy. Uważam, że cel i zakres pracy zostały przedstawione w sposób uporządkowany i zrozumiały. Umiejętne wykorzystanie licznych metod badawczych stosowanych podczas realizacji postawionych celów wskazuje na znaczne zdolności do pracy laboratoryjnej, które bez wątpienia przyczyniły się do wysokiej jakości badań prowadzonych przez Doktorantkę.



Włożony przez Doktorantkę wysiłek w efekcie doprowadził do opracowania metody syntezy 6-bromo-2-*N*-podstawionych pirydynylowych aminoalkoholi oraz pochodnych 1,2-bis(pirydylo)etylenu. Ponadto Pani magister Witkowskiej udało się zoptymalizować niektóre reakcje, jak na przykład sprzęganie Hecka w układach heterocyklicznych, czy syntezę odpowiedniego amidofosforynu oraz jego przyłączanie do oligonukleotydu.

Na szczególną uwagę zasługują badania dotyczące właściwości fluorescencyjnych otrzymanych związków obejmujące wyznaczenie takich wielkości jak molowe współczynniki absorpcji, wydajności kwantowe fluorescencji, pKa stanu podstawowego i wzbudzonego. Ponadto Autorka uwzględniła w swych badaniach wpływ rozpuszczalnika i zmiany pH na widmo absorpcyjne i emisyjne oraz czasy życia fluorescencji. Pani magister Agnieszka Witkowska umiejętnie wykorzystwała pomiary fluorescencji w czasie rzeczywistym do detekcji odłączania fluoroforu od oligonukleotydu. Ponadto określona została szybkość reakcji cyklizacji dla fluoroforu w funkcji czasu i temperatury, co jednoznacznie potwierdziło mechanizm opierający się na termicznym odszczepieniu opracowanej grupy ochronnej.

Doktorantka zastosowała wiele narzędzi badawczych, m.in.: NMR (^1H NMR, ^{13}C NMR, $1\text{H}-1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC i HMBC, $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC i HMBC, ^{31}P oraz ^{19}F), MS, TLC, HPLC, PAGE, spektrofotometrię, spektrofluorymetrię i dyfraktometrię, co pozwoliło na pełną charakterystykę związków. Ponadto Doktorantka wykazała się bardzo dobrym warsztatem w pracy laboratoryjnej podczas planowania i optymalizacji syntez, co doprowadziło do otrzymania szeregu obiecujących związków. Spośród osiągnięć chciałbym wyróżnić te, które moim zdaniem są godne uwagi:

- Opracowanie wydajnej metody syntezy 1,2-bis(pirydylo)etylenu ze wspomaganie mikrofalowym;
- Zbadanie mechanizmu reakcji termicznej cyklizacji opracowanej TGO;
- Włączenie fluoroforu do oligonukleotydu i potwierdzenie jego termowrażliwości z wykorzystaniem fluorescencji.

Istotnym zadaniem Recenzenta, poza dostrzeżeniem walorów ocenianej rozprawy jest także zwrócenie uwagi na mankamenty pracy, których nie sposób się ustrzec. Niedociągnięcia, które znajdują się w niniejszej rozprawie są następujące:

- Doktorantka wspomina o wykorzystaniu elektroforezy (PAGE) do analizy i oczyszczania oligonukleotydów, także tych zawierających znacznik fluorescencyjny, lecz nie prezentuje zdjęć żelu poliakrylamidowego będących dokumentacją analiz. W związku z tym trudno jest o ocenę tego w jakim stopniu dochodzi do przyłączenia znacznika.



Na podstawie analizy MALDI została potwierdzona masa właściwego związku (strona 155). Na widmie będącym wynikiem analizy „odblokowanego” oligonukleotydu (bez znacznika) za pomocą MALDI obserwujemy jednak tę samą masę co dla związku znakowanego (strona 157). Dodatkowo związki 49 oraz 51 w mojej ocenie nie zostały właściwie scharakteryzowane – brak analizy MS, ^1H NMR etc. Jedyne informacje jakie podaje Autorka to wartość współczynnika Rf oraz opis widma ^{31}P NMR, na którym widoczny jest jeden sygnał. W obu związkach posiada on identyczną wartość (146,46 ppm) przesunięcia chemicznego co jest zastanawiające biorąc pod uwagę różne otoczenie chemiczne atomów fosforu. Proszę o wyjaśnienie tych faktów.

- W pracy pojawiają się nieprecyzyjne określenia np. opis syntezy związku (10) – „duży nadmiar N-metyloetanoloaminy” (strona 180). Następnie w tym samym opisie Autorka wspomina o „liofilizacji z benzenu”. Czy istnieje możliwość zastąpienia go mniej toksycznym rozpuszczalnikiem?
- W pracy pojawiają się błędy edytorskie i stylistyczne, takie jak znaki interpunkcyjne w niewłaściwych miejscach, brakujące, przestawione lub nadmiarowe litery. Oto kilka przykładów:

- Na stronie 113 można przeczytać, że „problemy są wynikają”;
- Strona 45, rysunek 9 – „neurotransmitera” zamiast „neurotransmitera”;
- Strona 122 - „1,4-dioksanuu” zamiast „1,4-dioksanu”;
- Strona 74 - „układ skonigowanych wiązań podwójnych” jest anglicyzmem (conjugated double bonds), na miejsce którego można zastosować znane i popularne określenie „układ sprzężonych wiązań podwójnych” zresztą użyte później przez Autorkę na stronie 93;
- Strony 74-75 - „2-dicyjano-5-metylopirazyna” powinno być zastąpione przez „2,3-dicyjano-5-metylopirazyna”;
- Strona 158 - „diiestru”;
- Strona 122, tabela 10 – „Ttoluen”;

- Liczebniki porządkowe zapisujemy z kropką, i tak na przykład lata sześćdziesiąte XX wieku zapiszemy – w latach 60. XX wieku, a nie w latach 60-tych XX wieku (strona 57), zaś o latach siedemdziesiątych napiszemy – lata 70. XX wieku, a nie lata 70’ XX wieku (strona 77);
- Ponadto zastosowano błędne nazwy jak „reakcja Chichibabina” zamiast „reakcja Cziczibabina” (strona 61) od Aleksieja Cziczibabina;
- Na stronie 92 znajdujemy, że zastosowano „węglanu cezu (II)”, podczas gdy cezu jest (I) wartościowy;
- Da się zauważyć nieprecyzyjność w stosowanym nazewnictwie - grupa „dimetoksytrytylowa” zamiast poprawnej nazwy „4,4’-dimetoksytrytylowa” (wykaz

- stosowanych skrótów, oraz strona 38, rysunek 5); grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa podpisana jest jako „chloromrówczan 9-fluorenylometylu” (strona 39, rysunek 7); jon pseudomolekularny powstający podczas jonizacji (ESI, jonizacja dodatnia, przyłączenie protonu) jest nazwany jodem molekularnym (strona 94); określenie na stronie 28 - „na końcu 5' nukleozydu” jest błędne, ponieważ nukleozydy nie mają końców (łańcuchy oligonukleotydów owszem);
- Niestety nie wyjaśniono też kilku wprowadzonych skrótów/symboli – SD (strona 115) czy też EN/T (strona 192, tabela 20), który po dokonaniu studium literatury okazał się być inaczej zapisywany (N – w indeksie górnym i T w indeksie dolnym; E_T^N) a niektórych nie wprowadzono do spisu np. *N,N*-diizopropylometyloamina (DIPEA), która jest bardzo często wspominana w pracy.
 - Jeżeli praca jest napisana w języku polskim to wszystkie jej elementy powinny być pod tym względem spójne. Dotyczy to także wykorzystanych obrazów, które powinny zawierać polskie podpisy.
 - Jak należy przekształcić PyVnPy aby z jednej strony zachować właściwości termolabilne a z drugiej przesunąć fluorescencję w kierunku światła widzialnego/podczerwonego?

Uwzględniając wszystkie niedostatki niniejszej pracy z przekonaniem stwierdzam, że nie umniejszają one w sposób istotny wartości rozprawy doktorskiej Pani magister Agnieszki Witkowskiej. Zaprezentowane wyniki oraz ich analiza dokonana przez Doktorantkę wskazują na ogrom włożonej pracy, która doprowadziła do pełnej realizacji postawionych sobie celów. Niewątpliwym sukcesem jest opracowanie nowych TGO będących analogami 1,2-bis(pirydylo)etylenu i przyłączenie wybranej grupy do oligonukleotydu, a także zaproponowanie mechanizmu termocyklizacji. Docenić należy także trud włożony w wyznaczenie parametrów fizykochemicznych dla wybranych związków. Przyznać należy, że zaadaptowanie koncepcji termicznego usuwania do znaczników fluorescencyjnych oraz wykorzystanie fluorescencji do monitorowania tej zmiany jest bardzo ciekawym rozwiązaniem. Wysoki potencjał aplikacyjny podkreślony jest przez fakt, iż Pani magister Agnieszka Witkowska jest współautorką czterech zgłoszeń patentowych związanych z tematyką poruszaną w niniejszej rozprawie doktorskiej. Na szczególne uznanie zasługuje opracowanie metod otrzymywania związków, podczas wykonywania których wykorzystany został bogaty warsztat syntezy organicznej. Ponadto potwierdzeniem wysokiej jakości badań prowadzonych przez Doktorantkę jest fakt opublikowania rezultatów prowadzonych prac w renomowanych czasopiśmie naukowych z tzw. listy filadelfijskiej. Ponadto wyniki badań prezentowane były na licznych konferencjach naukowych.



Przedłożona mi do recenzji praca doktorska spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Na tej podstawie składam do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk prośbę o przyjęcie wniosku o dopuszczenie Pani magister Agnieszki Witkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie mając na uwadze ogrom wykonanej pracy wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy.

Wojciech Kamryn
24.04.2019