



Poznań, 2 września 2024 roku

Prof. UAM dr hab. Tomasz Pospieszny  
Zakład Produktów Bioaktywnych

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. MASROORA AHMEDA KHANA**  
**pt. „*Synteza bioluminogenych substratów lucyferaz świetlika i NanoLuc® oraz walidacja***  
***ich odpowiedzi na analyty zaangażowane w homeostazę redoks*”**  
**(„*Synthesis of bioluminogenic substrates of firefly and NanoLuc® luciferases and***  
***validation of their response to analytes involved in redox homeostasis*”)**  
**wykonanej w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk**  
**pod kierunkiem dr. hab. Jacka Kolanowskiego,**  
**promotor pomocniczy dr Dorota Jakubczyk**

Prace syntetyczne w obszarze chemii organicznej wciąż są niezwykle interesujące i aktualne. Badania przeprowadzane w obszarach takich dziedzin nauki jak chemia, farmacja czy medycyna są skupione – i co za tym idzie uzasadnione – na poszukiwaniu nowych aktywnych biologicznie związków chemicznych. Opracowanie wygodnej, szybkiej i taniej syntezy nowych związków chemicznych jest podstawą tych poszukiwań. Niestety w wielu przypadkach jest to proces czasochłonny. Jednakże wyznaczenie i opracowanie kolejnego (często nowego) celu syntetycznego zawsze prowadzi do udoskonalenia wcześniejszych prac. Wszystko to sprawia, że znaczna część zagrożeń związanych z czynnikami patogennymi w obecnej dobie cywilizacyjnej zostaje rozwiązanych bądź zminimalizowanych. Należy jednak wciąż mieć na uwadze rozwój ewolucyjny mikroorganizmów, który prowadzi do ich znacznej oporności na opracowane i stosowane środki biobójcze. W tym zakresie „walka” ludzkości z czynnikami patogennymi wciąż trwa.

Jednym z istotnych i niezwykle ciekawych aspektów takiej walki może być bioluminescencja polegająca na emisji światła w wyniku utlenienia cząsteczki lucyferyny przez enzym lucyferazę. Jest to czuła, nieinwazyjna i monitorowania w czasie rzeczywistym metoda. Bioluminescencję można z powodzeniem stosować do wykrywania analitów

biorących udział w procesach fizjologicznych, w tym patologicznych, za pomocą sond opartych na reakcji chemicznej z analitem. Dlatego, w moim odczuciu, cel pracy obrany przez Pana mgr. Masroora Ahmeda Khana polegający na opracowaniu syntezy i scharakteryzowaniu sond bioluminescencyjnych z zamiarem rozszerzenia palety narzędzi bioluminescencyjnych do jednoczesnego wykrywania wielu analitów wydaje się w pełni uzasadniony.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest pracą liczącą 190 stron i ma typowy układ dla tego typu opracowań, na który składają się: Abstract (3 strony); Streszczenie w języku polskim (3 strony); Abbreviations (3 strony); Introduction (15 stron); Objectives (1 strona); Results and Discussion (54 strony); Conclusions and Perspectives (2 strony); Materials and Methods (31 stron); Bibliography (10 stron, 107 pozycji); Supplementary Information (57 stron) oraz List of Publication (1 strona). Szkoda, że Autor nie zestawił listy tabel, rysunków i schematów, co niewątpliwie ułatwiłoby ich odszukiwanie w tekście.

Na dorobek naukowy Doktoranta składają się 2 opublikowane prace: (1) review w *Postęпах Biochemii* (2024) oraz (2) praca oryginalna w *Antibiotics* (2019). Warto podkreślić, że praca z 2019 roku nie była wykonana w zespole dr. hab. Jacka Kolanowskiego. Ponadto jedna praca jest obecnie w recenzji (czasopismo *Frontiers in Chemistry*). Warto również zaznaczyć, że prace badawcze były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki – grant SONATA nr 2017/26/D/NZ1/01234. Niestety nie znalazłem żadnych informacji związanych z udziałem Doktoranta w konferencjach krajowych lub zagranicznych, o prezentowanych posterach czy też komunikatach ustnych. Chciałbym w tym miejscu zapytać czy Doktorant brał czynny udział w konferencjach. Jeśli tak to w jakich i w jakiej roli? Jestem przekonany, że interesująca z eksperymentalnego punktu widzenia tematyka badawcza może w przyszłości być dalej realizowana przez Doktoranta. Z pewnością wpłynie to na zwiększenie Jego dotychczasowych wyników bibliograficznych

W części literaturowej Autor trafnie, rzeczowo i prawidłowo omawia zagadnienia dotyczące tematu jak m. in. zjawisko bioluminescencji, jej mechanizm oraz zastosowania w badaniach biologicznych, systemy lucyferyna-lucyferaza, zagadnienia dotyczące obrazowania bioluminescencji *in vivo* czy strategię projektowania sond bioluminescencyjnych. Uważam, że ta część pracy jest przedstawiona wyczerpująco, i co

ważniejsze, interesująco. Omawiane przykłady i zagadnienia zostały wybrane precyzyjnie. Może brakuje krótkiego wątku historycznego dotyczącego lucyferyny i lucyferazy, który związany chociażby z kwestią nazwy związków jest dość interesujący.

Cel pracy, stanowiący drugą i zarazem najważniejszą część rozprawy, zakładał zaprojektowanie i syntezę sond bioluminescencyjnych do jednoczesnego wykrywania wielu analitów zaangażowanych w homeostazę redoks. Podstawowym elementem budulcowym w serii syntez były struktury oparte na lucyferynie świetlika i furimazynie, substracie dla małej lucyferazy NanoLuc®. Doktorant skupił się na analitach związanych z homeostazą redoks, w szczególności żelazie, gamma-glutamylotransferazie (GGT) i nitroreduktazie (NTR), ponieważ, jak sam podaje, „znaczenie ich wzajemnego oddziaływania w chorobach takich jak nowotwory jest kluczowe i wciąż nie w pełni zrozumiane”. Praca Doktoranta polegała na opracowaniu:

- 1) sondy kompatybilnej ze strategią rozszczepionej lucyferyny do wykrywania jonów żelaza(II);
- 2) trzech sond reagujących na nitroreduktazę (NTR), kompatybilnych z systemem rozszczepionej lucyferyny, jak i NanoLuc®. Warto tutaj podkreślić opracowanie dwóch wariantów opartych na 2-cyjano-6-hydroksybenzotiazolu i D-cysteinie oraz otrzymano pierwszą bioluminescencyjną sondę opartą na furimazynie;
- 3) sondy dwuanalitowej opartej na szkielecie aminolucyferyny, która wykrywała jednocześnie obecności nitroreduktazy (NTR) i gamma-glutamylotransferazy (GGT).

Chciałbym w tym miejscu podkreślić, że przeprowadzane syntezy są niezwykle ciekawe (m. in. reakcje sprzęgania Suzuki, Negishiego czy reakcja Hornera–Wadswortha–Emmons), a opracowanie ścieżek syntetycznych nie zawsze należało do łatwych. Na uznanie zasługuje fakt, że Doktorant nie tylko podał charakterystykę spektroskopową związków (protonowy i węglowy magnetyczny rezonans jądrowy oraz spektrometria mas), ale także pokazał katalog widm magnetycznego rezonansu jądrowego i spektrometrii mas. Tutaj z obowiązku recenzenta muszę wyrazić pewien niedosyt. Szkoda, że Autor nie podał numeracji atomów w strukturach umieszczonych na widmach i skorelował ich z widocznymi sygnałami. Dałoby to pełen obraz analizy spektroskopowej. Chciałbym także dopytać

w jakim celu były wykonywane widma masowe? Czy chodziło tylko o określenie składu i czystości otrzymanych związków? Czy może były podejmowane próby zaproponowania i określenia ścieżek fragmentacji masowej wybranych związków przy użyciu innych technik jonizacji?

Otrzymane sondy były badane *in vivo*, a sonda otrzymana na bazie D-cysteiny wykazała znaczącą aktywność *in vitro*. Z kolei sonda dwuanalitowa oparta na szkielecie aminolucyferyny, wykrywająca jednocześnie obecność nitroreduktazy (NTR) i gamma-glutamylotransferazy (GGT) dała możliwość wykorzystania pojedynczej sondy molekularnej do jednoczesnego monitorowania wielu analitów. Jak pisze Autor rozprawy „Dodatkowo opracowano wariant D-lucyferyny tej sondy dwuanalitowej, zawierający motyw responsywny na dwa anality – NTR i GGT, jako związek pośredni, który może być sprzężony z innymi fluoroforami lub bioluminoforami. Te wyniki poszerzają dostępny zestaw narzędzi molekularnych z grupy wieloanalitowych sond bioluminescencyjnych”. Można więc stwierdzić, że recenzowana rozprawa doktorska należy do prac, w których założony cel został zrealizowany. Doktorant zaprojektował i przeprowadził syntezę nowych sond bioluminescencyjnych stosowanych do wykrywania różnych analitów związanych z homeostazą redoks. Otrzymane sondy z całą pewnością wzbogacają warsztat badawczy biologów czy chemików, w którym badania skomplikowanych zjawisk biologicznych są często oparte na skomplikowanych oddziaływaniach analitów.

W tym miejscu chciałbym zadać Doktorantowi kilka pytań:

- 1) w jaki sposób można zinterpretować obecność sygnałów w widmie masowym związku **22** (Rysunek 4.21, str. 67) usytuowanych przy  $m/z$  279,0909 oraz 557,1746?;
- 2) czy mechanizm reakcji przedstawiony na Schemacie 4.27 (str. 79) może mieć również przebieg alternatywny?;
- 3) jak można wytłumaczyć brak pozytywnego rezultatu dla dwóch pierwszych reakcji przedstawionych w Tabeli 4.34 (str. 88);
- 4) czym można wytłumaczyć niskie wydajności związków **17** (17%), **18** (28%), **29** (7%), **34** (7%)?

- 5) czy podejmował Pan próby modelowania molekularnego badanych związków przy użyciu metod semiempirycznych?
- 6) czy próbował Pan badań *in silico*?
- 7) co uważa Pan za największy sukces w swojej pracy?

Jeśli chodzi o formalną stronę przedstawionej do recenzji pracy chciałbym podkreślić jej przejrzystość oraz dobre zilustrowanie wywodzonych tez rysunkami, schematami i tabelami. Z obowiązku Recenzenta muszę wymienić zauważone błędy i niedoskonałości pracy. I tak:

- 1) w pracy błędnie zastosowano zapis podstawników  $R^1$ ,  $R^2$ , etc. Zawsze liczebnik piszemy w indeksie górnym, a nie dolnym np. str. 22, Schemat 2.2; str. 26, Schemat 2.3;
- 2) w Tabeli 2.4 na str. 28–30 w kolumnie Ref. można podać tylko numer pozycji;
- 3) na Schematach 4.13 (str. 54) i 4.14 (str. 55) przy podanym mechanizmie reakcji brakuje protonów, które pojawiają się w końcowym produkcie;
- 4) Rysunek 4.17 (str. 60) jest mało wyraźny;
- 5) Schemat 4.19 (str. 65) zawiera dwa istotne błędy: (1) zasada (B) powinna oderwać proton z atomu azotu, a nie odwrotnie (jak pokazuje to strzałka na rysunku) oraz (2) atom tlenu obdarzony ładunkiem ujemnym powinien zaatakować elektrofil (E) a nie odwrotnie. W mechanizmach reakcji to ładunek ujemny (całkowity czy cząstkowy) stanowi czynnik atakujący;
- 6) nie znalazłem analizy spektroskopowej związku **4** (synteza związku została opisana na str. 97), natomiast na str. 142 i 143 znajdują się widma  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR.

Jednocześnie pragnę podkreślić, że wymienione powyżej uwagi w żaden sposób nie wpływają na moją pozytywną ocenę pracy.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy



wprowadzając ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 28/2024/Internet z dnia 20 marca 2024 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr. Masroora Ahmeda Khana do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Prof. UAM dr hab. Tomasz Pospieszny