



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
Polskiej Akademii Nauk

dr hab. Michał Sobkowski, prof. ICHB PAN
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

Poznań, 4.06.2018

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Bartosik

pt. „Badania nad syntezą oligorybonukleotydów zawierających 5-podstawione urydyny i 2-tiourydyny metodą post-syntetycznej modyfikacji RNA”

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Karoliny Bartosik dotyczy ważnego zagadnienia uzyskiwania oligorybonukleotydów zawierających modyfikowane zasady heterocykliczne. Kwasy nukleinowe, oprócz standardowego zestawu czterech zasad, zawierają także ich różnorodne pochodne i analogi, co jest szczególnie charakterystyczne dla transferowego kwasu rybonukleinowego oraz produktów transformacji epigenetycznych. Preparatyka oligorybonukleotydów zawierających modyfikowane zasady stanowi spore wyzwanie syntetyczne ze względu na trudności w przygotowaniu zróżnicowanych monomerów oraz nietrwałość modyfikowanych jednostek nukleotydowych w warunkach syntezy oligomeru. Należy tu zwrócić uwagę, że już synteza niemodyfikowanych oligorybonukleotydów jest znacząco trudniejsza niż oligodeoksyrybonukleotydów, a obecność kolejnych elementów strukturalnych w postaci modyfikowanych zasad heterocyklicznych dodatkowo komplikuje cały proces. Jedną ze strategii prowadzących do tego typu produktów jest postsyntetyczna modyfikacja oligorybonukleotydów zawierających w zaprojektowanych pozycjach odpowiednie grupy pozwalające na wprowadzenie w ich miejsce pożądaných grup funkcyjnych. Doktorantka w swojej pracy zastosowała to podejście w celu wprowadzania szerokiego wachlarza ugrupowań w pozycji 5 pierścienia heterocyklicznego urydyny i 2-tiourydyny.

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Bartosik na 175 stronach zawiera typowe części: określenie celu badań, część literaturową, omówienie uzyskanych wyników, część doświadczalną oraz spis literatury (113 pozycji). Ponadto wskazane są źródła finansowania pracy, zamieszczona jest lista publikacji Doktorantki i jej komunikaty konferencyjne, wykaz skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 61 852 85 03 sekretariat 61 852 89 19
faks: 61 852 05 32 e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327 NIP 777-00-02-062
<http://www.ibch.poznan.pl>

Część literaturowa wprowadza czytelnika w tematykę związaną z koncepcjami postsyntetycznych modyfikacji zasad heterocyklicznych oligorybonukleotydów. Podejście to polega generalnie na chemicznej syntezie oligorybonukleotydu, który w wybranym miejscu zawiera modyfikowaną jednostkę nukleotydową, będącą prekursorem dalszych reakcji. Po zakończonej syntezie oligomeru, poddaje się go dalszej obróbce chemicznej, która w zależności od przyjętej strategii może przebiegać jeszcze na podłożu stałym lub w roztworze. Na tym etapie następuje przekształcenie nukleozydowej jednostki prekursorowej w docelowy produkt. Zaletami takiego postępowania jest po pierwsze możliwość wprowadzania różnorodnych modyfikacji z wykorzystaniem jednego wyjściowego oligomeru, a po drugie, możliwość uzyskiwania produktów zawierających nietrwale ugrupowania, które nie przetrwałyby warunków syntezy i odblokowania oligorybonukleotyd. Wadą omawianego podejścia jest ograniczenie do wprowadzenia zasadniczo tylko jednego typu modyfikacji do danego łańcucha oligonukleotydu. Teoretycznie możliwe jest wprowadzenie dwóch lub więcej różnych grup funkcyjnych poprzez zastosowanie ortogonalnych metod modyfikacji postsyntetycznych (np. kombinacja substytucji nukleofilowej i reakcji „klik”), jednak wg mojej wiedzy koncepcja taka nie została dotąd opisana.

Rozdział literaturowy w sposób wyczerpujący przedstawia tytułową tematykę modyfikacji postsyntetycznych. Podzielony został on na sekcje odpowiadające różnym strategiom wprowadzania pożądaných ugrupowań. Zaskoczeniem była dla mnie bardzo mała liczba – wynosząca trzy – zacytowanych doniesień literaturowych dotyczących postsyntetycznych transformacji modyfikowanych reszt purynowych/piramidynowych oligorybonukleotydów z wykorzystaniem niezwykle popularnej w ostatnich latach reakcji typu „klik”. Przeprowadzona kwerenda potwierdziła jednak, że nie jest to błąd. Wprawdzie stwierdziłem brak cytowania jednej z niedawnych prac dotyczących tej tematyki (M. Kerzhner i współpr., *Chem. Eur. J.* **22**, 12113, 2016), jednak nie zmienia to faktu ograniczonego wykorzystania tej strategii. W tym miejscu należy podkreślić duży wkład pracy mgr Karoliny Bartosik w przygotowanie przeglądu literaturowego dotyczącego modyfikacji na poziomie oligonukleotydów. W przeciwieństwie do chemii związków niskocząsteczkowych, trudne jest w takim przypadku korzystanie z chemicznych baz danych, np. Reaxysa, co powoduje konieczność mozolnego przeszukiwania literaturowych baz danych (np. Scopus lub Web of Science), w związku z czym przypadkowe pominięcie którejś z publikacji nie budzi zdziwienia.

Podsumowując, rozdział ten oceniam bardzo dobrze. Jest przygotowany starannie i wyczerpująco. Porządkuje obecny wiedzy odnośnie postsyntetycznych modyfikacji zasad heterocyklicznych oligorybonukleotydów.

Część dotyczącą badań własnych rozpoczyna wstęp wyjaśniający przesłanki, które skłoniły Doktorantkę do podjęcia badań nad postsyntetycznymi metodami wprowadzania do reszty urydyny bądź 2-tiourydyny grup funkcyjnych w pozycji 5, połączonych z pierścieniem heterocyklicznym za pomocą grupy metylenowej. Zwróciła ona uwagę na doniesienie zespołu Jacques'a van Booma z 2001 r., gdzie pojawiła się wzmianka wskazująca, że usuwanie grupy acetylowej chroniącej pozycję 5-hydroksymetylową modyfikowanej reszty cytozyny nie przebiega w pełni chemoselektywnie i oprócz

spodziewanego ataku na karbonylowy atom węgla prawdopodobnie następował konkurencyjny atak na atom węgla grupy metylenowej z odejściem octanu i wytworzeniem nowej pochodnej w pozycji 5. Doktorantka postawiła logiczną hipotezę, że zastąpienie grupy acetylowej silnie zawadzoną sterycznie grupą piwaloilową (tj. trimetyloacetylową) sprawi, że dotychczasowa reakcja uboczna stanie się jeśli nie jedynym, to przynajmniej głównym kierunkiem ataku nukleofilowego.

Dla potwierdzenia przyjętego założenia mgr Karolina Bartosik w pierwszym rzędzie słusznie przeprowadziła badania modelowe na poziomie nukleozydu. Przede wszystkim opracowała wydajne metody syntezy 5-piwaloilohydroksymetylowej pochodnej urydyny i 2-tiourydyny. Ponieważ substrat nukleozydowy do tych reakcji zawierał oprócz grupy 5-hydroksymetylowej drugą pierwszorzędową grupę hydroksylową w pozycji 5', nie było to zadanie trywialne. Jako docelową procedurę wybrane zostało regioselektywne piwaloilowanie grupy 5-hydroksymetylowej w kontrolowanych warunkach, tj. ze stopniowo dozowanym chlorkiem piwaloilu w obniżonej temperaturze, co pozwoliło na wyizolowanie pożądaných produktów z wydajnością bliską 50%. Dodatkowa porcja produktu uzyskana została przez odblokowanie pozycji 5'-O bispiwaloilowanego produktu ubocznego. Nasuwa się tu pytanie, czy prostszą i wydajniejszą metodą preparatywną nie byłoby przeprowadzenie od razu pełnego piwaloilowania, które zachodzi bardzo wydajnie, a następnie selektywne usunięcie jednej z grup, które – jak wykazała Doktorantka – jest możliwe i zachodzi z dobrą wydajnością. Trudny do uniknięcia bispiwaloilowany produkt uboczny stałby się wówczas pożądanym produktem pośrednim, a jak wynika z przedstawionych wyników, cała procedura byłaby chyba szybsza i mniej pracochłonna. Byłbym wdzięczny za komentarz w tej sprawie w trakcie obrony.

Badania na uzyskanych związkach modelowych w serii 2-okso i 2-tio potwierdziły, że reakcja czynników nukleofilowych z grupą $-CH_2OPv$ przebiega zgodnie z założeniem poprzez regioselektywny atak na grupę metylenową, a nie karbonylową. Przebadana została tu cała gama reagentów. Były to zarówno N-nukleofile (amoniak, aminy I- i II-rzędowe o różnej budowie, aminokwasy), O-nukleofil (jon metoksylowy), S-nukleofil (tiolan), jak i C-nukleofil (cyjanek) – łącznie 11 związków, dla których mgr Bartosik dokonała optymalizacji warunków reakcji. W zestawie tym zabrakło jedynie opisu reakcji pochodnej 2-tiourydyny z cyjankiem. Prosiłbym Doktorantkę o wyjaśnienie, dlaczego ten układ został pominięty.

W kolejnym etapie badań ustalona została reaktywność wspomnianych już pochodnych bispiwaloilowanych z tym samym zestawem czynników nukleofilowych. Okazało się, że także w tych reakcjach można selektywnie uzyskać nukleozydy zawierające omawiane modyfikacje w pozycji 5. Podczas gdy w pozycji 5,1-O podstawieniu ulegała grupa piwaloksylova, w pozycji 5'-O następowało usunięcie grupy piwaloilowej – bądź w warunkach reakcji, bądź po jej zakończeniu i dodaniu do mieszaniny reakcyjnej wodnego roztworu metyloaminy.

W opisach powyższych badań nieoczekiwane było podanie hydrolizy grupy piwaloilowej jako przyczyny reakcji $ROPv \rightarrow ROH$ obserwowanej w niektórych układach reakcyjnych, mimo że procesy były prowadzone w warunkach bezwodnych. Wnioski takie znajdują się na s. 68 i 70, i obejmują układy:

MeOH/K₂CO₃, MeOH/DBU, EtSNa/EtOH i KCN/EtOH. Założenie, że był to wynik błędów eksperymentalnych (zanieczyszczenie mieszaniny reakcyjnej wodą) jest mało satysfakcjonujące, a co więcej – niepotrzebne. Prosiłbym Doktorantkę o podanie propozycji alternatywnego, mechanistycznego wyjaśnienia powstawania zaobserwowanych produktów.

Po zakończeniu badań modelowych, mgr Bartosik wykorzystwała uzyskane wyniki do syntezy modyfikowanych oligonukleotydów. W pierwszym etapie tej części pracy określiła przydatność zaproponowanego podejścia do syntezy oligomerów zawierających podstawnik 5-piwaloiloksymetylowy, uzyskując bardzo dobre wyniki. Pozwoliło to na przystąpienie do kolejnego etapu – zbadania skuteczności opracowanej strategii syntetycznej do otrzymania pentanukleotydów, które po postsyntetycznych reakcjach aminolizy niosły zaprojektowane grupy funkcyjne w pozycji 5 urydyny i 2-tiourydyny. Eksperymenty te dały bardzo dobre i dobre wyniki. Spośród innych badanych wcześniej reagentów nukleofilowych Doktorantka opisała jedną próbę otrzymania pochodnej 5-cyjanometylowej w serii okso, która ujawniła częściową degradację oligonukleotydu pod wpływem KCN.

Zwieńczeniem pracy było uzyskanie dłuższych oligonukleotydów – heptadekamerów zawierających grupy 5-metyloaminometylowe i 5-taurynometylowe w serii okso i tio. Pożądane oligomery stanowiły 60–80% wszystkich produktów zarejestrowanych na HPLC. W ten sposób Doktorantka wykazała słuszność zaproponowanego podejścia i dowiodła, że w opracowanych warunkach można wydajnie otrzymywać oligorybonukleotydy zawierające 5-modyfikowane reszty urydyny i 2-tiourydyny.

Obowiązkiem recenzenta jest też przedstawienie uwag krytycznych. Chciałbym jednak mocno podkreślić, że mają one na celu jedynie zwrócenie uwagi Doktorantki na pewne aspekty pisania rozprawy naukowej i konieczność czasem bardziej krytycznego podchodzenia do uzyskiwanych wyników.

Od strony językowej i redakcyjnej mam niewiele zastrzeżeń, gdyż praca przygotowana jest bardzo starannie i wyróżnia się poprawnym językiem. Od czasu do czasu zdarzają się literówki czy złe numery związków, lecz są to drobne, praktycznie nie do uniknięcia błędy, a właściwe znaczenie wynika jednoznacznie z kontekstu. Nie udało się jednak Doktorantce uniknąć pewnych anglicyzmów, jak np. użyty już w tytule termin „post-syntetycznej”, które to słowo w języku polskim powinno być pisane bez łącznika, czy stosowanie terminu „deprotekcja” (zamiast „odblokowanie”) lub oddzielanie przecinkiem okolicznika od dalszej części zdania, co jest charakterystyczne dla języka angielskiego, lecz niepoprawne w języku polskim. Błędem merytorycznym jest stosowanie anglosaskiej kropki w funkcji polskiego przecinka dziesiętnego. Znaczenie kropki i przecinka w liczbach w języku polskim i angielskim jest dokładnie odwrotne i nie należy ich mieszać. Wszystkie powyższe błędy są niestety szeroko rozpowszechnione we współczesnej literaturze naukowej, tym niemniej ciągle są to błędy.

Jeśli chodzi o budowę rozprawy, to za nieco kontrowersyjne uważam umieszczenie w rozdziale zatytułowanym „Badania własne” dwóch obszernych przeglądów literaturowych zajmującymi odpowiednio 7 i 5 stron (sekcje II.2 i II.5). Taki układ nie wydaje się być zbyt szczęśliwy, gdyż czytelnik oczekuje w tej części opisu badań własnych, a nie drugiego i trzeciego przeglądu literatury. Znacznie

lepszym rozwiązaniem byłoby umieszczenie tych sekcji jako niezależnych podrozdziałów właściwej części literaturowej. Biorąc pod uwagę wielowątkowość podjętej tematyki, nie byłoby nic złego w takiej konstrukcji.

Innym pewnym mankamentem jest poświęcanie zbyt dużej uwagi sprawom oczywistym. Doktorantka w niektórych miejscach pracy niepotrzebnie opisuje szczegółowo dobrze znane reakcje i procedury. Np. obszerny opis otrzymywania amidofosforanu **51a** z uzyskanej 5-piwaloiloksy-metylourydyny (s. 72–74) jest zupełnie zbędny, gdyż są to rutynowe reakcje, znane i powszechnie stosowane od lat. W dodatku w tym fragmencie znalazły się dwa błędne odnośniki literaturowe: podana procedura wprowadzania grupy *tert*-butylodimetylosililowej do ochrony funkcji 2'-OH została opisana przez Kelvina K. Ogilviego w 1974 r., podczas gdy podana w przypisie praca Carole Chaix i wsp. z 1998 jest niewątpliwie pomyłką. Jeśli zaś chodzi o zastosowaną metodę fosfitylacji, to opiera się ona na procedurze opisanej w 1984 r. przez Huberta Köstera, a wskazana w dysertacji publikacja grupy P. Herdewijna jest jedynie prostą implementacją.

Przy opisywaniu analizy HPLC mieszanin reakcyjnych po syntezy modyfikowanych oligonukleotydów Doktorantka używa określenia „wydajność” dla opisanego stosunku powierzchni pików pożądanego produktu do powierzchni pozostałych pików. Nie jest to poprawne, gdyż nie ma żadnej gwarancji, że sumaryczna ilość produktów zintegrowanych na chromatografie odpowiada ilości substratu, a to właśnie do substratu należy odnosić pojęcie wydajności. Dlatego termin „wydajność” w nietypowym znaczeniu warto w takiej sytuacji wziąć w cudzysłów i podać jego nietypową definicję stosowaną w pracy.

Ponadto w pracy napotkałem w dwie intrygujące kwestie i proszę o komentarz na ich temat:

S. 72 i 81 – do utleniania Doktorantka użyła roztwór jodu, dla którego nie stwierdziła desulfuryzacji 2-tiourydyny. Tymczasem na s. 76–77 przedstawiła doniesienia literaturowe własnego zespołu, zgodnie z którymi taki sam roztwór jodu powodował szybką desulfuryzację – 50% w ciągu 2 min. Skąd ta diametralnie różna podatność na działanie jodu?

S. 84 – w przeciwieństwie do pełnej stabilności grupy $-CH_2OPv$ wobec wodnego roztworu amoniaku podczas badań modelowych na poziomie nukleozydów (s. 72), na poziomie oligonukleotydów grupa ta uległa znaczącej amonolizie, gdy znajdowała się na reszcie uracylu. Dla oligonukleotydu zawierającego pochodną 2-tiourydyny nie stwierdzono natomiast utraty blokady piwaloilowej. Taki nieoczekiwany wynik wymaga jednak potwierdzenia. Czy zostały wykonane powtórzenia ww. reakcji? Podejrzenia, że był to wynik spowodowany błędem eksperymentalnym potwierdza fakt, że podczas analogicznej reakcji z dłuższym oligomerem (s. 95) podobna degradacja nie została zaobserwowana.

Przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają w żadnej mierze wysokiej wartości naukowej rozprawy, a raczej świadczą, jak rozmaite, nowatorskie i frapujące zagadnienia poruszone są w tej dysertacji. Szereg zadanych powyżej pytań wynika z faktu, że praca mgr Karoliny Woźniak jest bardzo ciekawa i wielowątkowa, a takie właśnie teksty są najbardziej wartościowe i skłaniają do dyskusji. Nie ulega wątpliwości, że Doktorantka przeprowadziła bardzo rozległe badania, poczynając od dogłębnej

weryfikacji założonych koncepcji syntetycznych na poziomie związków modelowych, po implementację uzyskanych wyników do otrzymywania zaplanowanych modyfikowanych oligonukleotydów. O wysokiej jakości dokonań mgr Karoliny Woźniak świadczy przyznanie jej przez NCN grantu „Preludium”, a wcześniej 3 grantów dla młodych naukowców oraz grantu Rady Kół Naukowych. Wyniki mgr Karoliny Woźniak zostały opisane w artykułach w dwóch renomowanych czasopismach naukowych (*Tetrahedron Letters* i *Organic & Biomolecular Chemistry*) i były prezentowane na 6 konferencjach naukowych (w tym 4 zagranicznych). Mgr Karolina Bartosik jest też współautorką kolejnych 2 publikacji z listy JCR i 4 komunikatów konferencyjnych, które nie były związane z tematem niniejszej rozprawy.

Mgr Karolina Bartosik wykazała się pracowitością, starannością i sumiennością w prowadzonych pracach, a przede wszystkim pokazała, że potrafi prawidłowo zaprojektować, prowadzić i rozwiązać niełatwy problem badawczy, czego dowodem jest przedstawiona praca doktorska. Dlatego z pełnym przekonaniem wnioskuję o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Karoliny Bartosik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

