

dr hab. Aneta Szymańska, prof. UG

Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 22.09.2017 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr MAŁGORZATY NATALII PIESZKO

pt. *„Synteza i charakterystyka triazolowych ligandów regulatorowych
struktur RNA wirusa HIV-1”*

Pomimo wielu lat badań i znacznego postępu w tej dziedzinie, jak dotychczas nie udało się otrzymać szczepionki czy w pełni skutecznego leku na zakażenie wirusem HIV-1. Obserwowane „wyciszenie” problemu HIV i AIDS na świecie wynika raczej ze wzrastającej świadomości społeczeństw, zwłaszcza rozwiniętych, na temat sposobu zapobiegania zakażeniu czy spowalniania rozwoju choroby niż jej leczenia. W krajach niżej rozwiniętych, np. afrykańskich problem jednak istnieje i nie daje się łatwo opanować. Oddzielnym zagadnieniem jest też duża zmienność genetyczna samego wirusa i występowanie wielu jego wariantów, co nie ułatwia planowania i prowadzenia skutecznej terapii. Dlatego też wszelkie prace mające na celu poszukiwania nowych leków, które mogłyby wzbogacić bazę już istniejącą dając nową nadzieję osobom zakażonym, są jak najbardziej godne zauważenia. Zaliczyć do nich można rozprawę doktorską mgr Małgorzaty Pieszko.

Została ona wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką naukową dr hab. Piotra Muchy, prof. UG, od lat związanego naukowo z tematyką wirusa HIV-1, a w szczególności z białkiem Tat, odgrywającym kluczową rolę w procesie replikacji. Praca doktorska mgr Pieszko, skoncentrowana na poszukiwaniu nowych związków zdolnych do oddziaływania i modyfikowania kluczowych w procesie namnażania się wirusa HIV-1 struktur regulatorowych, wpisuje się bardzo dobrze w nurt poszukiwania nowych terapeutyków z grupy inhibitorów replikacji wirusa.

Praca ma układ klasyczny. Otwiera ją bardzo szczegółowy spis skrótów, symboli i oznaczeń, po którym następuje przegląd literaturowy. Jest on dość krótki w stosunku do całej objętości pracy, zawarty jest bowiem na 33 stronach druku. Cała praca, wraz ze spisami rysunków, tabel i literaturą liczy stron 187, a mogłaby więcej, ponieważ część danych dołączono do rozprawy w postaci plików na płycie CD. 122 strony poświęcone części eksperymentalnej zdecydowanie wskazują, na co Doktorantka położyła główny akcent podczas redagowania swojej pracy.

Wspomniany wyżej przegląd literaturowy składa się z dwóch części. W pierwszej z nich Autorka przedstawiła w bardzo skondensowany sposób informacje na temat różnych sposobów i rodzajów modyfikacji kwasów nukleinowych, poświęcając kolejno uwagę poszczególnym elementom budowy tych biomolekuł: zasadom azotowym, reszcie cukrowej czy wiązaniu międzynukleotydomu. Duża część omawianych modyfikacji przedstawiona została w kontekście ich wpływu na aktywność biologiczną otrzymanych analogów, co dobrze koresponduje z tematyką pracy własnej Doktorantki. Pewien niedosyt związany jest jedynie z tym, że część informacji pochodzi z dosyć starych (kilkunasto-, a nawet kilkudziesięcioletnich) źródeł. Być może celem Autorki było przedstawienie samej „klasyki”, jednak kilka nowinek mogłoby być jej ciekawym uzupełnieniem. Pokazałoby też, że Doktorantka jest obeznana z najnowszą literaturą w tematyce jej badań.

Cześć druga poświęcona jest reakcji „click” czyli podstawowemu narzędziu, jakie Doktorantka zamierzała wykorzystać do otrzymania zaplanowanych oligomerów triazolowych. Również i ten fragment jest bardzo zwięzły, jednak tutaj ta oszczędność słowa i miejsca budzi nieco wątpliwości. Zawarto w nim bowiem tylko podstawowe informacje na temat ogólnego mechanizmu reakcji cykloaddycji alkin-azydek (AAC) katalizowanej metalami przejściowymi (miedź i ruten). Brakuje nieco bardziej krytycznego przeglądu literatury, zwłaszcza tej nowszej, co być może pozwoliłoby uniknąć niektórych niepowodzeń czy planowania eksperymentów z góry skazanych na niepowodzenie. Tym bardziej, że na podstawie tego fragmentu pracy, zwłaszcza przy podkreśleniu na jego wstępie zalet metody „click” jak szybkość, łatwość oczyszczania produktów, wysoka wydajność, stereoselektywność – by wymienić tylko te najbardziej pożądane przez każdego chemika-syntetyka, recenzent spodziewa się raczej spektakularnych wyników pracy doktorantki. Niestety, jak refleksyjnie ujęła to Autorka - „rzeczywistość weryfikuje taki pogląd”, a teoria i praktyka to czasem dwa różne wszechświaty.

Wszechświaty te zderzyły się w części doświadczalnej. Doktorantka postawiła przed sobą bardzo ambitny plan syntetyczny. Postanowiła zbudować swój projekt od samych niemalże podstaw tzn. opracować wydajną metodę syntezy i otrzymać szereg pochodnych nukleozasad, zawierających podstawnik azydkowy lub propynylowy oraz komplementarnych do nich substratów niezbędnych do przeprowadzenia reakcji syntezy pierścienia triazolowego z zastosowaniem metody „click”. Następnym etapem była weryfikacja założenia o użyteczności otrzymanych substratów w syntezie dwóch rodzajów monomerów triazolowych kwasów nukleinowych (TKN) w oparciu o reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena. Monomery te miały być następnie wykorzystane do otrzymania krótkich fragmentów analogów kwasów nukleinowych wykazujących komplementarność do struktur regulatorowych RNA wirusa HIV-1. Doktorantka zaplanowała również przeprowadzenie analiz oddziaływania otrzymanych związków z odpowiednimi fragmentami RNA wirusa za pomocą technik spektroskopowych i elektroforetycznych. Tu właściwie można by postawić kropkę, ponieważ przedstawiony przez mgr Pieszko plan jest logiczny i zamyka się w spójną całość. Doktorantka postanowiła jednak ambitnie jeszcze rozszerzyć zakres swojego projektu o syntezę trzech analogów aminokwasów zawierających w szkieletcie cząsteczki pierścienia triazolowego (TzIAA). Tu mała uwaga –

stosowanie nazwy „triazolowe pochodne aminokwasów” może być nieco mylące ponieważ każde oczekiwać pochodnej α - albo może co najwyżej β -aminokwasu z ugrupowaniem triazolowym w funkcji łańcucha bocznego, Tymczasem otrzymane związki są na tej samej zasadzie aminokwasami jak jest nimi kwas aminofenylooctowy czy (aminometylo)fenylooctowy. Rozumiem, że zastosowano tu pewne uproszczenie ponieważ związki wykazują właściwości charakterystyczne dla aminokwasów (zwłaszcza reaktywność grupy aminowej i karboksylowej), a w dodatku Doktorantka zastosowała je później do otrzymania oligomerów TKN w warunkach syntezy na nośniku stałym, charakterystycznych dla klasycznej syntezy peptydów z użyciem klasycznych aminokwasów. Jakby tego było mało mgr Pieszko postanowiła również otrzymać za pomocą metody „click” mały dendrymer oparty na szkielecie triazolowym z podstawnikiem guaninowym jako potencjalny inhibitor struktur regulatorowych wirusa HIV-1. Zaplanowane zadania badawcze były imponujące i zdecydowaną większość z nich udało się Doktorantce zrealizować. Sukcesem zakończyła się m.in. synteza większości zaplanowanych substratów „click”. Co ciekawe, zasada „brzytwy Ockhama” sprawdza się również w syntezie organicznej, ponieważ najlepsze efekty osiągnięto przy zastosowaniu prostych procedur z portfolio chemii organicznej – reakcji N-alkilowania za pomocą dihalogenoalkanu w obecności zasady (K_2CO_3 czy NaH) a następnie substytucji nukleofilowej atomu halogenu grupą azydkową, czy N-alkilowania za pomocą 3-bromoprop-1-ynu. Próby zastosowania bardziej wyrafinowanych substratów i metod zawiodły. Opisy wszystkich syntez podane są w sposób bardzo szczegółowy i przedstawione jak osiągnięcie własne Doktorantki, tymczasem część z nich jest powtórzeniem lub modyfikacją syntez już opisanych. W opisach czy dyskusji brakuje wyraźnego zaznaczenia, które syntez zostały oryginalnie opracowane przez Doktorantkę, a które są adaptacją czy powtórzeniami procedur literaturowych. Sama szczegółowość opisów syntez i procedur, a szczególnie ich powtarzalność, jest nieco nużąca. W przypadku syntezy wielu analogów w oparciu o podobny schemat, a z takim mamy tu do czynienia, można zaproponować tzw. ogólny tok syntezy a różnice wykazać w podsumowaniu danego cyklu w formie np. tabeli. Zabieg taki stosuje się często publikacjach, a i sama Autorka zastosowała go w dalszej części pracy przy opisie pochodnych triazolowych. Przyniosłoby to zdecydowaną oszczędność w zużyciu papieru oraz czasu czytelnika, nie umniejszając bynajmniej nakładu pracy Autorki.

Zderzenie teorii z rzeczywistością nastąpiło podczas realizacji kluczowego etapu projektu czyli syntezy monomerów triazolowych kwasów nukleinowych w oparciu o reakcję „click”. Już etap optymalizacji jej warunków okazał się bardzo rozczarowujący, ponieważ – pomimo wielu modyfikacji – Doktorantce nie udało się otrzymać z satysfakcjonującą wydajnością monomerów z grupy określonej jako TKN1 (reakcja między azydkową pochodną nukleozasady i kwasem 5-aminopen-3-ynowym w obecności jonów rutenu). Niepowodzenie tłumaczy głównie przeszkodami natury sterycznej („stłoczenie steryczne”) niewiele uwagi natomiast poświęca czynnikom elektronowym. Czy - analizując strukturę zaplanowanych substratów i mechanizm reakcji - nie można było spodziewać się takiego wyniku? Czy optymalizowano warunki syntezy poprzez np. zmianę kolejności dodawania reagentów? Dlaczego najpierw dodawano katalizator?

Zdecydowanie lepszymi wynikami zakończyła się synteza monomerów z drugiej grupy tzn. TKN2, które otrzymano z wydajnościami na tyle wysokimi (najniższa 69% dla czystego, jak zakładam, związku ponieważ informacji takiej brakuje), że możliwe było ich dalsze wykorzystanie w syntezie polimerów. Również ta część projektu zakończyła się sukcesem, ponieważ Doktorantka otrzymała zaplanowane fragmenty analogów kwasów nukleinowych i mogła je poddać dalszym badaniom. W tym miejscu Recenzent chce powiedzieć, że ma ogromny żal do Doktorantki, że tak „po macoszemu” potraktowała i nie rozwinęła dalej tak interesującego projektu, jakim była synteza homopolimerów (trimerów) TKN2 za pośrednictwem reakcji „click” na żywicy czy w roztworze ale na trimerze kwasu azydohomoalaniny. Sama Autorka stwierdza, że „zastosowana procedura pozwala na otrzymanie fragmentów TKN2 zbudowanych z takich samych monomerów w łatwy i szybki sposób. Ponadto, prowadząc reakcje „click” na żywicy omijamy etap oczyszczania produktu reakcji z nieprzereagowanego katalizatora (CuI oraz TBTA)”. Myślę, że Doktorantka nie doceniła potencjału zwłaszcza drugiej ścieżki reakcji, która potencjalnie pozwala również na syntezę heteropolimerów. Również wydajność produktu końcowego otrzymanego z zastosowaniem tej metody była wyższa niż dla metody wybranej jako docelowa. Być może mgr Pieszko nie zauważyła tego gdyż popełniła błąd obliczając tę wydajność. Według mnie powinno być to 58%, podczas gdy w pracy podane jest 29%.

Sukcesem zakończyły się również pozostałe zaplanowane syntezy oligomerów zbudowanych z triazolowych analogów aminokwasów (TzIAA). Zsyntezowane oligomery zostały przez Doktorantkę zbadane pod kątem ich zdolności do hybrydyzacji do komplementarnych fragmentów RNA wirusa HIV-1 kluczowych w procesie replikacji.

Ta część pracy budzi nieco wątpliwości i prowokuje do kilku pytań. Jako pierwszą z metod weryfikacji występowania (lub nie) oddziaływań pomiędzy otrzymanymi związkami a ich receptorami zastosowano elektroforezę kapilarną. Na podstawie analizy wyników Doktorantka stwierdza, iż **obserwowała** hybrydyzację trimeru określanego jako AAA-NH₂ z nicią TAR UUU. Tworzącemu się kompleksowi przypisuje nawet czas retencji (ok. 5 min – przy okazji na jakiej podstawie przypisano ten czas do kompleksu?). Dalej twierdzi jednak, że obserwuje pojawianie się tego pików dopiero przy wzroście stężenia ligandu (trimeru) do wartości 50-krotności stężenia komplementarnego RNA. Nie obserwowała go natomiast przy proporcji 1:10 (RNA:ligand). W tych warunkach obserwowała „jedynie silną redukcję intensywności pików pochodzącego od wolnego TAR UUU) i przesunięcie jego czasu jego migracji (z ok. 6.5 min do ok. 5.7 min)”. Czym, jeśli nie tworzeniem kompleksu tłumaczy zatem Doktorantka tę obserwację? Jak można wyjaśnić dalsze przesuwanie się pików na elektroforegramie i zmianę ich kształtu w miarę wzrostu stężenia ligandu? Czy możliwa jest inna interpretacja?

W dalszych eksperymentach – analizie oddziaływań pomiędzy badanymi cząsteczkami za pomocą dichroizmu kołowego – doktorantka wykorzystuje proporcję 1:10 do określenia wpływu ligandów na stabilność termiczną fragmentów RNA. Czy – wobec stwierdzonego wcześniej braku kompleksu w tych warunkach – eksperyment ten ma znaczenie? Tym bardziej, że obserwowane zmiany są tak subtelne, że mogą być rozpatrywane w kategoriach błędów eksperymentalnego. Poza tym wydaje się,

że Autorka ma pewien problem z wartościowaniem tych zmian. Czasem zmiana eliptyczności o 0.7 oznacza „niewielki wzrost”, 0.3 to „prawie niezauważalna różnica”, 1 to „niewiele” a 2 to już „wzrost duży” (znaczący). Analiza danych nie ułatwia niewielki rozmiar rysunków przedstawiających widma CD oraz ich częste porozdzielanie na dwie sąsiadujące strony. Czasem przeniesiona jest część podpisu pod rysunkiem. Są to błędy edycyjne, łatwe do wyeliminowania przy nieco innej redakcji tej części rozprawy, np. przy wprowadzeniu podrozdziałów dotyczących poszczególnych układów (np. TAR UUU i AAA-NH₂, TAR-UUU i TCCCAH-NH₂ itd.).

Pewien problem mam z również z eksperymentami, w których mgr Pieszko analizuje oddziaływania znakowanych fluoresceiną fragmentów RNA z wybranymi ligandami. Doktorantka twierdzi, iż mierzyła „anizotropię fluorescencji” i na jej podstawie wyznaczała stałą dysocjacji. Tymczasem na przedstawionych rysunkach przedstawiona jest - według mnie - zmiana **intensywności fluorescencji** pod wpływem miareczkowania ligandem. Bardzo proszę o komentarz w tej sprawie.

Chciałabym również prosić o rozwinięcie dyskusji na temat wpływu czynników sterycznych, wiązań wodorowych oraz oddziaływań elektrostatycznych na stabilność tworzonego kompleksu oraz to, jakie znaczenie ma porównywanie dwóch układów różniących się miejscem wiązania lub o nieznanym miejscu wiązania (jak dla (TzIAAA)₃)?

Pod względem redakcyjnym rozprawa opracowana jest starannie. Napisana jest poprawnym, zrozumiałym, ale jednocześnie fachowym językiem. Zdarzają się drobne lapsusy językowe wynikające głównie ze stosowania żargonu laboratoryjnego, tzw. „skrótów” myślowych” czy zbyt dosłownego tłumaczenia tekstu z języka angielskiego, ich liczba nie jest jednak szczególnie duża, zwłaszcza biorąc pod uwagę objętość pracy. Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie przytoczyć te z nich, które najbardziej wpływały na odbiór tekstu:

- „modyfikacja nie **wywołuje** zawady przestrzennej” (czy nie **wprowadza** zawady przestrzennej?)
- str. 23 – „posiadają mały wpływ” – wywierają niewielki / znikomy wpływ
- str. 27. „zwiększyć stabilność oligomeru **na** nukleazy” - czy **wobec** nukleaz?
- str.30. „**wysoce** rozpuszczalne w wodzie” - żargon
- str.67. „Dzieje się tak, ponieważ amidy (a taki charakter wykazują kwaśne protony w zasadach pirymidynowych) stanowią jedną z typowych grup NH-kwasów stosowanych w tej reakcji” (chodzi o reakcję Mitsunobu) – niezrozumiałe
- str.105 – nazwy monomerów TKN1 – Doktorantka stosuje konsekwentnie formę t-butylu....octan. W nomenklaturze polskiej stosuje się formę octan t-butylu.
- str.118 – „częściowa deprotekcja acetylu” – żargon! czy acetyl jest chroniony?

- str.156 – „Zmiany te **skorelowane** są ze wzrostem T_m wartości oznaczonej krzywej mięknięcia CD” - Krzywa mięknięcia CD ma wartość T_m ? Co jest skorelowane z czym? Co to znaczy – skorelowane? Co doktorantka rozumie przez skorelowane w tym kontekście?
- str. 56. Opis kolumn chromatograficznych „dr Maisch” jest niewystarczający. Brakuje informacji na temat rodzaju złoza, wielkości porów itp. jak również pełnej nazwy kolumny (ReproSil Pur???)
- str. 58. Nieprawidłowe odniesienie do Rys. 41. Czytelnik spodziewa się chromatogramu HPLC a dostaje bardzo uproszczony schemat reakcji. Podobnie jest z większością schematów otwierających poszczególne rozdziały z opisem syntez. Ich zakotwiczenie w tekście mogłoby być bardziej precyzyjne.

Poczynione wyżej uwagi krytyczne nie umniejszają jednak pozytywnego odbioru rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Pieszko. Docenić należy przede wszystkim ogromną pracowitość Doktorantki i jej skrupulatność. Mgr Pieszko przeprowadziła kilkadziesiąt syntez w roztworze i na fazie stałej, oczyściła i scharakteryzowała otrzymane produkty. Dużą część syntez przeprowadziła w skali mikro, co jest dużym wyzwaniem i wymaga staranności i dyscypliny pracy. Doktorantka wykazała się uporem w dążeniu do celu - pomimo wszystkich napotkanych po drodze niepowodzeń, biegłością w pracy laboratoryjnej, umiejętnością planowania i prowadzenia kilkietapowych eksperymentów. Dzięki temu zrealizowała postawione przed sobą cele badawcze, a jej praca z pewnością przyczyni się do powiększenia istniejącego stanu wiedzy. Reasumując - stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska **mgr Małgorzaty Natalii Pieszko pt. „Synteza i charakterystyka triazolowych ligandów regulatorowych struktur RNA wirusa HIV-1”** spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455, z 2014 r. poz. 1198) i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Małgorzaty Pieszko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Aneta Szymańska