



Prof. dr hab. Ryszard W. Adamiak,
Zakład Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych
Zespół Struktury i Funkcji RNA
tel. 61-8528503, fax. 61-8520532
e-mail adamiakr@ibch.poznan.pl

Poznań, 21 lutego 2014

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Ewy Radzikowskiej
pt. „Synteza oligodeoksyrybonukleotydów modyfikowanych w obrębie wiązań
internukleotydowych atomem azotu lub siarki”

Recenzję przedstawiam na prośbę Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Przekazana mi do recenzji praca doktorska mgr Ewy Radzikowskiej została wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMiM PAN, kierowanym przez prof. dr hab. Barbarę C. Nawrot, pod kierunkiem dr hab. Janiny Baraniak. Rozprawa dotyczy syntezy jednostek monomerycznych oraz stereozdefiniowanych $N3' \rightarrow P5'$ oligonukleotydów oraz optymalizacji preparatyki PS/PO oligomerów w serii DNA. Jest związana z rozwojem oryginalnej, opracowanej przez zespół profesora Wojciecha J. Steca, metody stereokontrolowanej syntezy PS-oligonukleotydów poprzez oksatiafosfolany (m.in. *Nucleic Acids Res.*, 1991).

Aktualne zapotrzebowanie na nowe inhibitory, potencjalne leki oligonukleotydowe o zdefiniowanej konfiguracji modyfikowanego centrum fosforowego, stawia przed chemikiem trudne wyzwania związane z syntezą nowych pochodnych ale także z optymalizacją, często opublikowanych już wcześniej, procedur syntetycznych. W ten typ badań wpisuje się rozprawa mgr Ewy Radzikowskiej – rozprawa ściśle powiązana z celami badawczymi Zakładu oraz jego zobowiązaniami w ramach projektu współpracy zagranicznej z firmą Geron Corp. (USA).

Osiągnięcie głównych celów preparatywnych pracy a mianowicie: (i) synteza jednostek monomerycznych pochodnych 2',3'-dideoksy nukleozydów niosących grupę 3'-aminową i ich włączenie w łańcuch $N3' \rightarrow P5'$ oligonukleotydowy, (ii) optymalizacja procesów rozdzielania chromatograficznego P-diastereoizomerów trzech typów 2-tiono-1,3,2-oksatiafosfolanowych deoksynukleozydów i ich inkorporacja w łańcuch chimerycznych PS/PO oligodeoksynukleotydów, wymagało od doktorantki bardzo dobrego opanowania chemii fosforu i protokołów syntezy oligonukleotydów.

Kilka uwag na temat redakcji rozprawy. Praca ma typowy układ treści. Tekst jest luźno sformatowany (razem 163 strony). Jakość rysunków oraz wzorów chemicznych jest wysoka. Pracę charakteryzuje dość swobodny styl relacjonujący przebieg badań i ich uwarunkowania. Stan wiedzy w dyscyplinie oraz treści działów omówienia wyników własnych badań oraz części eksperymentalnych znalazły swoje odbicie w bibliografii liczącej 110 referencji. Sposób cytowania „na stronie” ułatwia czytanie. Pełen spis bibliografii przedstawiono także na końcu pracy co ułatwia odszukanie publikacji cytowanej powtórnie lub wielokrotnie.

Doktorantka przedstawia obszerny liczący prawie 50 stron dział dotyczący studiów literaturowych na temat mechanizmów działania i zastosowania antysensowych oligonukleotydów kolejnych generacji i proponowanych modyfikacji chemicznych w tym pochodnych stereozdefiniowanych. Rozdział ten jest przejrzysto napisany. Doktorantka umiejętnie łączy historyczne już dane z aktualnym stanem wiedzy na temat technologii „antysense” ilustrując schematami podstawy preparatyki trzech generacji oligonukleotydów antysensowych. Część tych informacji koresponduje z artykułem przeglądowym kandydatki w *Wiadomościach Chemicznych* z 2013 roku. Wybrane, często obszerne, dane odnośnie aktualnego stanu wiedzy i dotyczące kierunków badań doktorantki znajdujemy także w dziale „Badania Własne”. W dziale „Część literaturowa” stykamy się z zagadnieniem właściwego doboru nomenklatury oraz polskich wersji nazw anglojęzycznych. Dla przykładu jedynie podam jeden z nich, budzący największą kontrowersję: dla reszt konformacyjnie usztywnionych nukleozydów typu LNA (ang. *locked nucleic acids*) doktorantka używa opisu „blokowane”, co definitywnie chemikowi kwasów nukleinowych kojarzy się z kwestią grup blokujących (ochronnych).

Przejdę teraz do omówienia zasługujących na podkreślenie wyników badań eksperymentalnych mgr Ewy Radzikowskiej. Podkreślę, że rozdział „Badania Własne” w którym doktorantka przedstawia i dyskutuje uzyskane wyniki nie jest łatwy w odbiorze. Wielowątkowość rozprawy, ukazywanie niektórych detalicznych rozwiązań, które zdają się nie mieć kontynuacji (np. wprowadzenie podstawnika 9-fluorenylometylowego w pochodnej triestrowej, w odniesieniu do kwestii rozdziału, str. 88) nie ułatwiło recenzji. Trzeba jednak podkreślić, że przedstawione wyniki znajdują pełne i szczegółowe udokumentowanie w bardzo dobrze przygotowanym rozdziale „Część Doświadczalna”.

Oto ocena najważniejszych wyników doktorantki, zgrupowanych w trzech najistotniejszych działach:

(i) Synteza oligodeoksyrybonukleozydo ($N3' \rightarrow P5'$) amidotiofosforanów w oparciu o metodę oksatiafosfolanową

Mgr Ewa Radzikowska istotnie poszerzyła naszą wiedzę odnośnie możliwości zastosowania podejścia oksatiafosfolanowego do syntezy oligodeoksyrybonukleotydów niosących centrum ($N3' \rightarrow P5'$) amidotiofosforanowe. Punktem wyjścia badań doktorantki była synteza wszystkich czterech, blokowanych 3'-amino-2',3'-dideoksy nukleozydów. Od samego początku doktorantka nie stosuje ochrony funkcji laktamowej reszty guaninowej. W oparciu o dotychczasowe doświadczenie macierzystego Zakładu, doktorantka wybiera trzy typy odczynników fosfitylujących celem rozstrzygnięcia, które z P-diastereomerycznych pochodnych 3'-N-(2-tiono-1,3,2- oksatiafosfolanowych) 5'-O-DMT-3'-amino-2',3'-dideoksy nukleozydów będą tworzyły się z największą wydajnością, dadzą się wydajnie rozdzielić chromatograficznie i co najważniejsze będą najwydajniej prowadziły do syntezy internukleotydowego wiązania ($N3' \rightarrow P5'$) amidotiofosforanowego. To bardzo ciekawy element rozprawy, szczególnie w świetle zgromadzonej w macierzystym Zakładzie wiedzy dotyczącej serii deoksy i rybonukleozydów. Trzeba podkreślić, że doktorantka opiera się na klasycznym procesie rozdziału chromatograficznego na kolumnie silikażelowej i trudno recenzentowi ocenić czy obserwowane wyniki (wydajność, możliwość rozdziału i czystość izomerów) mogłyby być korzystniejsze w przypadku zastosowania kosztownej, preparatywnej HPLC. Analiza wyników przedstawionych w Tabelach 2 i 3 (str. 60 i 62 odpowiednio) wyraźnie wskazują na to, że na tym obszarze preparatyki modyfikowanych DNA, eksperymentator winien dysponować całą paletą pochodnych dla optymalnej syntezy oligomeru. Dla przykładu, dla poszczególnych czterech nukleozasad tylko określone pochodne 3'-N-(2-tiono-1,3,2- oksatiafosfolanowe) dawały się rozdzielać. Inny przykład: dobrze rozdzielane 4,4-spiro-pentametylenowe pochodne w serii 3'-amino ddG wykazywały najniższe wydajności kondensacji. W pracy doktorantki pojawił się też inny interesujący wątek – optymalizacja samego procesu kondensacji. Doktorantka odnotowuje wpływ

dodatkowej aminy towarzyszącej DBU w reakcji kondensacji. Mechanizm tego wpływu wydaje się być nie do końca wyjaśniony - w tym względzie prosiłbym doktorantkę o dodatkowe informacje w trakcie publicznej obrony Jej rozprawy. Na str. 68 rozprawy doktorantka krótko opisuje wyniki dotyczące stereospecyficzności reakcji kondensacji, a więc najistotniejszej cechy stereokontrolowanej syntezy modyfikowanych oligonukleotydów poprzez oksatiafosfolany. Powołując się na wcześniejsze prace zespołu dotyczące stereospecyficzności reakcji podstawienia oksatiafosfolanowych pochodnych amin (*J. Am. Chem. Soc.* 114, 10197, 1992), doktorantka, wobec braku odpowiednich pochodnych krystalicznych, bazuje na porównaniu widm ^{31}P NMR. To właściwe podejście. Interesuje mnie jednak fakt opierania wyводу o stereospecyficzności odnośnie kondensacji jedynie wobec DBU (patrz Schemat 27), ale bez wariantu uwzględniającego stosowaną w praktyce trietyloaminę. Proszę o wyjaśnienie.

W oparciu o powyższe ustalenia mgr Ewa Radzikowska prowadzi syntezy krótkich modelowych oligonukleotydów niosących wiązania ($N3' \rightarrow P5'$) amidotiofosforanowe. Jako monomery stosuje jednorodny zestaw pochodnych 3'-N-(2-tiono-4,4-dimetylo-1,3,2-oksatiafosfolanowych). W przypadku dimerów, trimerów i heptameru istotnym było wykorzystanie protokołu DMT-OFF dla uniknięcia procesu rozdziału finalnego produktu od produktów degradacji w związku z potencjalną labilnością wiązania ($N3' \rightarrow P5'$) amidotiofosforanowego w środowisku kwaśnym. Synteza krótkich oligomerów w warunkach zautomatyzowanej syntezy DNA na podłożu stałym oraz dalsze etapy odblokowania i oczyszczania oligomerów odsłoniło trudności pracy z tymi pochodnymi. W przypadku nieco dłuższych oligotymidylanów procedura DMT-ON pozwoliła łatwiej wydzielić pożądany produkt, zarówno typu „mix” jak i o zdefiniowanej stereochemii. Już na tym etapie doktorantka obserwuje ograniczoną skuteczność preparatyki, wobec zbyt niskich wydajności kondensacji.

Trudności te potęgują się w przypadku 13-meru DNA (kod. GNR163), potencjalnego inhibitora ludzkiej telomerazy (współpraca z firmą Geron Corp. USA), który winien zawierać stereozdefiniowane wiązania ($N3' \rightarrow P5'$) amidotiofosforanowe. Przed podjęciem projektu, wobec braku metody stereozdefiniowanej syntezy, oligomer ten był dostępny jedynie w postaci mieszaniny P-diastereoizomerów (Gryaznov, metoda amidofosforynowa). Doktorantka przeprowadziła próby syntez 13-meru zawierającego 4 stereozdefiniowane wiązania ($N3' \rightarrow P5'$) amidotiofosforanowe w regionie reszt G, stanowiących miejsca oddziaływania z telomerazą. W odróżnieniu od syntez modelowych, w przypadku syntezy GNR163, doktorantka była zmuszona wykorzystać dobrze rozdzielające się 2-tiono-4,4-spiro-pentametylenowe pochodne 3'-amino ddG, które jak było wiadomo, wykazywały najniższe wydajności kondensacji (izomery *fast* są bardziej reaktywne od *slow*). Doktorantka obserwowała bardzo niskie wydajności kondensacji (w obecności DBU i trietyloaminy), a przedłużanie czasu tej reakcji (15 min / krok) doprowadziły, jak się zdaje, do powiększenia puli produktów ubocznych w związku z reaktywnością niechronionego systemu laktamowego reszt guaninowych (str. 78, opis „grupy O^6 -ketonowej” jest błędny). W rezultacie kosztowna próba syntezy GNR163 zakończyła się niepowodzeniem. Można mieć tylko nadzieję, że doktorantka w swej przyszłej pracy wyciągnie odpowiednie wnioski przygotowując się do syntezy oligonukleotydów trudno zawiązujących wiązania internukleotydowe, a jednocześnie niosących reaktywne (niechronione) grupy laktamowe nukleozasad.

(ii) Synteza oligonukleotydów niosących wiązania ($N3' \rightarrow P5'$) amidotiofosforanowe w oparciu o proces wewnątrzcząsteczkowej katalizy nukleofilowej.

Wobec powyższego mgr Ewa Radzikowska skierowuje swoją uwagę na opublikowane wcześniej pracę dwóch grup badawczych: (i) Efimowa (m.in. *Nucleic Acids Res.* 1985) dotyczące syntezy oligonukleotydów metodą fosfortriestrową z wykorzystaniem N-tlenków aryloamin jako katalizatorów oraz – w konsekwencji – z zastosowaniem monomerycznych bloków fosfortriestrowych zawierających ugrupowanie N-tlenkowe np. pikoliny. Ugrupowanie to było aktywne w reakcji wewnątrzcząsteczkowego ataku na centrum fosforowe wobec jednostki 5'-OH i

czynnika kondensującego; (ii) Stawińskiego (*Chem. Commun.*, 2004), który z powodzeniem rozwinął proces wewnątrzcząsteczkowej katalizy w, opartej o chemię fosfonianów, stereospecyficznej syntezie PS-oligotymidyli. Podejście to, po modyfikacjach, było w kolejnych latach kontynuowane dla dłuższych DNA i RNA w grupie Efimowa.

W oparciu o doniesienia tych zespołów, doktorantka podjęła próbę opracowania nowej drogi syntezy oligonukleotydów niosących wiązania ($N3' \rightarrow P5'$) amidotiofosforanowe. Istotą metody miała być synteza na podłożu stałym umożliwiającą wydłużanie łańcucha oligomeru w dwóch kierunkach, a więc zarówno od strony 3' jak i (nietypowej) 5'. Dla realizacji tego ogólnego podejścia doktorantka opracowała metody preparatyki dwóch typów pochodnych 3'-amino-2',3'-dideoksy nukleozydów w serii T i G, zawierających ugrupowanie *N*-tlenkowe czy to na końcu 5'-OH (wiązanie tiofosforanowe) czy na końcu 3'-amino (wiązanie amidotiofosforanowe). W obydwóch przypadkach punktem wyjścia były dobrze znane doktorantce reakcje 2-tiono-1,3,2-oksatiaofofolanowych pochodnych oraz możliwość wykorzystania wcześniej otrzymanych bloków syntetycznych. Blokada funkcji 3' aminowej resztą trytylową nie pozwoliła na rozdział tworzących się 5' izomerów blokowanych tiofosforanów. W przypadku bloku 3', doktorantka dysponuje także mieszaniną NPS-diastereoizomerów. Chociaż w obydwóch przypadkach synteza bloków monomerycznych przebiegała z wysokimi wydajnościami, od tego etapu, doktorantka jest zmuszona pracować na mieszaninie P-diastereoizomerów. Sytuacja ta znacząco obniżała wagę przyszłych wyników. Chcę jednak podkreślić, że mgr Ewa Radzikowska konsekwentnie przeprowadziła syntezy pilotowe (poziom dimeru) pozwalające na ustalenie przebiegu i wydajności procesów kondensacji celem syntezy $T_{NPS}T$ i to w obydwóch kierunkach wydłużania łańcucha. Niestety obraz kondensacji w typowym kierunku 3'-5' był wysoce niekorzystny: dla 5 z 6 różnych czynników kondensujących (str. 92, Tabela 11), a więc w przypadku chlorków arylosufonylowych oraz chlorku piwaloilu otrzymywane z wyd. ok. 70% (dla tego drugiego 30%) dimery miały strukturę $T_{NP}T$ (eliminacja atomu siarki), a tylko wobec działającego wg. innego mechanizmu NEPCI otrzymywano $T_{NPS}T$ z wyd. 7%. Doktorantka przedstawia przekonywujący wywód na temat zróżnicowanego mechanizmu działania tych dwóch typów czynników kondensacyjnych.

Znacznie lepsze rezultaty doktorantka obserwuje dla bloku 5' podczas prób syntezy modelowego dimeru $T_{NPS}T$ w kierunku 5'-3'. Pierwszy etap kondensacji był wysokowydajny i nie dochodziło do utraty atomu siarki. Niestety próby syntezy dłuższych łańcuchów nie wskazywały na wystarczający poziom wydajności kondensacji aby móc oczekiwać praktycznego wykorzystania tego podejścia w zautomatyzowanej syntezie na podłożu stałym. Na podkreślenie zasługuje fakt wykazania przez doktorantkę potencjału tego typu kondensacji dla wariantu syntezy w roztworze, który przy odmiennej aranżacji grup ochronnych daje szansę wydzielenia indywidualnych P-diastereoizomerów dinukleozydo-($N3' \rightarrow P5'$)-amidotiofosforanów (uwaga słownictwo: nie dinukleotydów, str. 98). Podejście to wymaga jednak dopracowania.

(iii) Synteza chimerycznych, stereozdefiniowanych PS/PO-oligonukleotydów

Dział ten, obejmujący syntezę oligodeoksyrybonukleotydów zawierających reszty PO i PS z wykorzystaniem chemii amidofosforynowej oraz oksatiaofofolanowej, kończy rozprawę z pozytywnymi wynikami, szczególnie co do przebiegu reakcji utleniania P(III) do P(IV). Doktorantka z powodzeniem adaptuje, wprowadzony na innym obszarze przez zespół Salomończyka (*Tetrahedron Lett.* 2002), *tert*-butylo-nadtlenotrójmetylosilan podczas etapu utleniania w syntezie chimerycznych PS/PO oligodeoksyrybonukleotydów. Widma MS potwierdziły obecność wiązań PS. Doktorantka w osobnych eksperymentach wykazała też, że reagent ten nie desulfuryzuje dinukleozydo-($N3' \rightarrow P5'$)-amidotiofosforanów.

W obrębie tego działu rozprawy mgr Ewa Radzikowska zaproponowała też nowy wariant procesu chromatografii na silikażelu bloków 2-tiono-1,3,2-oksatiaofofolanowych podstawowych deoksynukleotydów, niezbędnych do przeprowadzenia powyższych syntez.

Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Ewy Radzikowskiej są bezpośrednio związane ze zgłoszeniem patentowym z 2012 roku dotyczącym sposobu wytwarzania PS/PO oligonukleotydów oraz przesłaną do druku pracą eksperymentalną. Doświadczenie doktorantki jest także odzwierciedlone dwiema nie związanymi bezpośrednio z rozprawą publikacjami eksperymentalnymi (*Antiv. Chem. Chemother.*, 2011, *Bioorg. Med. Chem.* w druku), publikacją konferencyjną (*Collection Symp. Ser.*, 2008). Cieszy duża aktywność naukowa mgr Ewy Radzikowskiej – doktorantka jest w większości przypadków pierwszym autorem trzech artykułów przeglądowych (*Wiadomości Chemiczne*, 2008, 2011, 2013) oraz 14 posterów na krajowych i zagranicznych konferencjach w latach 2008-2013.

Czas na podsumowanie. Przed doktorantką postawiono trudne cele syntetyczne. Było to jednak konieczne dla rozpoznania zakresu stosowności oryginalnej metody opracowanej w macierzystym Zakładzie. Z jednej strony mgr Ewa Radzikowska musiała skonfrontować własne wyniki z tymi uzyskanymi w zespole wcześniej (PS/PO oligonukleotydy) i ten dział rozprawy przyniósł interesujące, ugruntowujące metodę, zadawające wyniki dotyczące etapu utleniania i metody rozdziału 2-tiono-1,3,2-oksafosfolanów. Z drugiej strony należało ustalić, czy metoda stereokontrolowanej syntezy P-modyfikowanych oligonukleotydów poprzez oksafosfolany daje się rozszerzyć na obszar NPS-oligonukleotydów. Mimo zakłócenia ogólnego obrazu syntezy - przez możliwość reakcji ubocznych na resztach guaniny - doktorantka udowodniła, że zbyt niska reaktywność centrum fosforowego, wyraźnie widoczna dla 2-tiono-4,4-spiro-pentametylenowej pochodnej 3'-amino ddG, nie pozwala na efektywną syntezę stereozdefiniowanych NPS-oligonukleotydów. Problem niskiej reaktywności wybranych jednostek monomerycznych może też stanąć na przeszkodzie efektywnej syntezy tej rodziny oligonukleotydów z wykorzystaniem tzw. wewnątrzcząsteczkowej katalizy nukleofilowej.

Widocznym jest, że w odniesieniu do wszystkich trzech działów badań opisanych w rozprawie, doktorantka opanowała trudną metodykę syntezy P-modyfikowanych oligonukleotydów i ich zaawansowaną analizę fizykochemiczną, dysponuje dużym doświadczeniem, a osiągnięte przez nią wyniki z pewnością pozwolą na planowanie dalszych badań w dyscyplinie.

Przedstawione wyniki, poziom wiedzy oraz wskazana pod koniec recenzji aktywność naukowa mgr Ewy Radzikowskiej, pozwalają mi stwierdzić, że Jej rozprawa spełnia w pełni wymogi stawiane w tej mierze pracom doktorskim* i wnoszę do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi o desygnowanie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

* W swojej ocenie kierowałem się wytycznymi zawartymi w Ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 z późniejszymi zmianami wprowadzonymi w art. 251 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym z dnia 27 lipca 2005 r., w Rozporządzeniu Ministra Edukacji Narodowej i Sportu z dnia 15 stycznia 2004 oraz w zaleceniach Centralnej Komisji do Spraw Tytułu Naukowego i Stopni Naukowych z dnia 20 maja 2002 r. i z dnia 14 października 2005.