

Prof. dr hab. Krzysztof Rolka
KIEROWNIK KATEDRY BIOCHEMII MOLEKULARNEJ

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
tel. +48-58-5235088
e-mail: krzysztof.rolka@ug.edu.pl

Gdańsk, dnia 29 kwietnia 2019 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Hanny Jędrzejewskiej
p.t. „*Synteza dynamicznych peptydowo-rezorcynarenowych kapsuł*
***oraz badanie ich właściwości*”**

Kontenery molekularne to związki chemiczne lub układy supramolekularne, które zdolne są do akomodacji wewnątrz swoich struktur, małych cząsteczek. Rozmiar, kształt i charakter powierzchni luki determinuje, które z nich (cząsteczek) mogą lokować się we wnętrzach kontenerów. Z uwagi na potencjalnie duże walory aplikacyjne, projektowanie, synteza i badanie właściwości takich związków jest przedmiotem zainteresowania wielu grup badawczych. Przekonuje o tym bogate piśmiennictwo, w tym także artykuły przeglądowe podsumowujące dotychczasowe osiągnięcia. W nurt tych badań wpisuje się recenzowana dysertacja mgr inż. Hanny Jędrzejewskiej. Celem, jaki realizowała w ramach pracy doktorskiej było otrzymanie supramolekularnych kontenerów molekularnych w formie kapsuł będących dimerami, w których każdą z półsfery stanowiła cząsteczka rezorcynarenu związana kowalencyjnie z czterema krótkimi łańcuchami peptydowymi. Rozprawa ma rzadziej spotykaną w wypadku prac doktorskich, formę monotematycznego cyklu publikacji opatrzoną 20 stronicową dyskusją otrzymanych wyników. Temat dysertacji oceniam jako bardzo ambitny, a nowatorskie podejście (o czym poniżej) zasługuje na wysoką ocenę, zarówno w kontekście podjętej problematyki, jak też uzyskanych wyników, w całości opublikowanych w prestiżowych czasopismach z listy JCR.

Cztery prace składające się na recenzowaną rozprawę doktorską to trzy publikacje oryginalne, które ukazały się w: *Angewandte Chemie International Edition* (IF₂₀₁₇ 12,102) (I),

Chemical Science (IF₂₀₁₇ 9,063) (II) i Chemical Communications (IF₂₀₁₇ 6,29) (III) oraz artykuł przeglądowy opublikowany w Chemical Reviews (IF₂₀₁₇ 52,613) (IV). Prace te opublikowano w latach 2014 – 2019. Wszystkie wymienione czasopisma zaliczane są do najbardziej prestiżowych z dziedziny nauk chemicznych. Wszystkie cztery prace, przed akceptacją, przeszły gęste sito selekcji w redakcjach czasopism. Już tylko ten fakt wskazuje na wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań. Dwie z prac oryginalnych liczą po kilka stron tekstu. Towarzyszą im jednak bardzo obszerne suplementy, w których zawarte są szczegóły syntetyczne oraz analizy fizykochemiczne otrzymanych związków. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a udział współautorów spoza Jej jednostki macierzystej sprowadzał się przeprowadzenia niektórych analiz (rentgenostrukturalnych i rejestracji widm NMR). Można więc bez ryzyka postawić tezę, że wszystkie prace cyklu to efekt badań Kandydatki i Promotorki rozprawy dr hab. Agnieszki Szumnej, prof. nadzw. Załączone oświadczenia dowodzą, że Doktorantka odgrywała w nich rolę wiodącą, a udział Promotorki, poza zapewne wyborem koncepcji badań, sprowadzał się do bieżących konsultacji i redakcji manuskryptów. Lektura opisu uzyskanych wyników stanowiącego komentarz do załączonych prac przekonuje, że Kandydatka potrafi redagować tekst naukowy w języku polskim. Szata graficzna oraz strona językowa opracowania jest na wysokim poziomie. Nie mam uwag merytorycznych, a jedynie kilka redakcyjnych. Większość z C-końcowych reszt aminokwasowych badanych peptydów zawierały ugrupowanie *N*-metyloamidowe, stosowane w pracy określenia „amidów metylowych aminokwasów/peptydów” mogą błędnie sugerować, że badaniom poddano (*N*- lub *C*-metyloaminokwasy). Numeracja związków w dyskusji wyników jest inna (choć wg tego samego systemu) niż w pracach. To nieco utrudnia lekturę tekstu, podobnie jak ten sam system numeracji peptydów i kawitandów (np. **L-4a** – peptyd, **L-8a** – kawitand). Reasumując stwierdzam, że forma rozprawy doktorskiej pozwala na pełną ocenę merytoryczną pracy wykonanej przez Doktorantkę.

Projektowanie kontenerów molekularnych to, jak już wspomniałem, bardzo atrakcyjna i intensywnie rozwijana problematyka badawcza. W literaturze opisano wiele przykładów wykorzystania do ich konstrukcji tetrafunkcjonalizowanego rezorcynarenu. Nowością naukową badań prowadzonych w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej jest wykorzystanie krótkich peptydów, jako elementów selektywnie spinających półsfery. Peptydy, z uwagi na ich praktycznie nieograniczone możliwości modyfikacji chemicznej, prowadzone pod kątem otrzymania związków o potencjalnych walorach aplikacyjnych (praktyka medyczna, nanotechnologia), stanowią bardzo atrakcyjne obiekty badań. W projektowaniu biomateriałów peptydowych wykorzystuje się zdolności krótkich, odpowiednio zaprojektowanych sekwencji

do asocjacji oraz samo-organizowania się między innymi w nanorurki, nanowłókna, nanopęcherzyki, czy hydrożele. Tego typu nanomateriały są z powodzeniem stosowane w inżynierii tkankowej. Można je modyfikować, trudno jednak wykorzystać do transportu lub przechowywania małych cząsteczek. Takie właśnie zadanie było przedmiotem badań Doktorantki. Punktem wyjścia było otrzymanie z zespołem badawczym Promotorki rozprawy teteaformylorezorcyn[4]arenu oraz wykazanie, że reagujące z aminami pierwszorzędowymi grupy aldehydowe tworzą odpowiednie iminy z równowagą tautomeryczną przesuniętą w kierunku keto-enamin, determinując chiralność tworzących się związków chemicznych. W wypadku zastosowania amin zawierających asymetryczny atom węgla powstawały diastereoizomery, a użycie mieszaniny racemicznej substratów prowadzi do ich chiralnego sortowania. Doktorantka włączyła się w badania nad możliwością wykorzystania teteaformylorezorcyn[4]arenu jako bloku budulcowego w syntezie kapsuł.

Pierwszy etap badań (praca I) obejmował syntezę serii 14 kawitandów zawierających pochodne aminokwasu (L- lub D-Phe) lub krótkie, di- i tetrapeptydy składające się z reszt Gly oraz L- lub D-Phe. Poza niektórymi pochodnymi Phe, pozostałe związki zawierały na C-końcu ugrupowania amidowe. W wyniku reakcji pomiędzy grupami α -aminowymi Phe/peptydów i aldehydowymi rezorcynarenu tworzyły się odpowiednie iminy. Również w tym wypadku równowaga tautomeryczna przesunięta była w kierunku keto-enamin. Tak funkcjonalizowane rezorcynareny Doktorantka poddała badaniom pod kątem ich zdolności do tworzenia kapsuł. Uzyskane wyniki są bardzo interesujące, a jednocześnie zaskakujące. Jak wykazała, kawitandy zawierające enancjomery metyloamidu Phe (ale nie estry metylowe) tworzą spontanicznie i selektywnie kapsuły w postaci dimerów heterochiralnych. W jednej półsferze obecne są pochodne L-Phe a w drugiej D-Phe. Ten sam produkt otrzymano, gdy reakcji poddano mieszaninę racemiczną Phe-NMe i teteaformylorezorcyn[4]arenu. Biorąc pod uwagę jak wiele teoretycznie stereoizomerów może powstać, tak duża efektywność chiralnego sortowania, jest zaskakująca. Podobne wyniki uzyskano z udziałem peptydów. W wypadku enancjomerycznych form Phe-Gly-NMe tworzą się spontanicznie kapsuły homochiralne, zarówno w wyniku asocjacji półsfer, jak i chiralnego sortowania. Kolejne bardzo ciekawe spostrzeżenie to fakt występowania w kapsułach półsfer (zawierających L-Phe) różnych form tautomerycznych. W procesie tworzenia się kapsuł decydującą rolę odgrywają międzycząsteczkowe oddziaływania pomiędzy odpowiednimi resztami aminokwasów. Nie obserwowano tworzenia się dimerów gdy zastosowano odwrócone sekwencje lub na C-końcu obecne było ugrupowanie inne niż metyloamidowe. Kapsuły nie tworzyły się także, prawdopodobnie z uwagi na zawadę steryczną

grupy metylowej, gdy resztę Gly na zastąpiono L- lub D-Ala, co niestety ogranicza możliwość modyfikacji wnętrza kapsuły.

Sposobem na powiększenie wnętrza kapsuły (wyniki opisane w pracy (II)), było połączenie cząsteczek peptydu i rezorcynarenu ugrupowaniem semikarbazonowym, tworzonym przez grupy aldehydowe makrocyklu i hydrazynu (reszta azaglicyny, AzaGly) przyłączonego do grupy aminowej Phe-NH₂, Phe-NHMe lub odpowiedniego peptydu. Odmienne niż w wypadku wcześniej opisanych związków, produkt reakcji Phe-NHMe i rezorcynarenu nie tworzył kapsuł. Takie Doktorantka zidentyfikowała w strukturze krystalicznej. Przy czym w każdej z półsfer wiązania amidowe miały inną geometrię. Wyraźnie większą tendencję do tworzenia kapsuł wykazał kawitand z ugrupowaniem amidowym, stąd jego obecność w serii syntetyzowanych związków zawierających, oprócz reszty azaglicyny, di- i tetrapeptydy o sekwencjach L/D-Phe-L/D-Ala. Przeprowadzone badania wykazały, że sekwencja Phe-D-Ala umożliwia tworzenie dimerycznych kapsuł, przy czym w roztworze łańcuchy boczne aminokwasów skierowane są na zewnątrz, a w kryształach pierścienie aromatyczne do jej wnętrza. Wydłużenie C-końca o D-Ala prowadzi do tworzenia w roztworze takich struktur z grupami metylowymi skierowanymi do wnętrza. Również w tej serii związków Doktorantka obserwowała proces chiralnego sortowania. Jego efektywność zwiększała się wraz z wydłużeniem łańcucha peptydowego kawitandów. Przeprowadzone badania pozwoliły Kandydatce na postawienie tezy, że za proces ten odpowiedzialne są oddziaływania głównych łańcuchów peptydowych, a stabilizują je wiązania wodorowe, których tworzenie determinuje właściwa chiralność poszczególnych reszt aminokwasowych. Sortowanie chiralne miało też miejsce podczas tworzenia kapsuł na drodze dynamicznej chemii kowalencyjnej. W wyniku reakcji z teteaformylrezorcyn[4]arenu z mieszaniną diastereoizomerów AzaGly-L/D-Phe-Ala powstawały heterodimery, co ciekawe taki układ supramolekularny nie tworzy się z mieszaniny odpowiednich kawitandów. Zakończone sukcesem próby powiększenia objętości kapsuł (w odróżnieniu od kapsuł z łącznikami iminiowymi, w ich wnętrzu mieszczą się grupy metylowe) poprzez zastosowanie łącznika semikarbazonowego, skłoniło mgr inż. H. Jędrzejewską do podjęcia próby tworzenia kapsuł z wykorzystaniem aminokwasów zawierających boczne grupy funkcyjne (Ser, L/D-Asp, Orn). Te jednak nie zakończyły się sukcesem.

Kolejnym zagadnieniem jakie podjęła Kandydatka była analiza chiralności inherentnej tetrapodstawionego rezorcynarenu (praca (III)). Obiektami badań były związki będące produktami reakcji teteaformylrezorcyn[4]arenu z metyloamidami L- lub D-aminokwasów. Powiązanie wyników ich analiz uzyskanych metodami NMR, elektronowego dichroizmu

kołowego, rentgenograficzną oraz obliczeniami kwantowo-mechanicznymi pozwoliło Kandydatce na ustalenie, że w wyniku asocjacji kawitandów dochodzi do zmiany ich chiralności inherentnej. Diastereoizomer *M* w ciągu kilkadziesiąt sekund, jak oszacowała Kandydatka, przekształca się w diastereoizomer *P*. To kolejny bardzo interesujący wynik. Dowodzi on jednocześnie jak wiele czynników wpływa na, będący przedmiotem badań Doktorantki dynamiczny, samoorganizujący i stereoselektywny mechanizm tworzenia się kapsuł peptydowo-rezorcynarenowych, w których łańcuchy peptydowe tworzą motywy przestrzenne zbliżone do β -beczek. W podsumowaniu stwierdzam, że mgr inż. Hanna Jędrzejewska uzyskała bardzo ciekawe i oryginalne wyniki, które opublikowane w znakomitych czasopismach z listy JCR spotkały się z zainteresowaniem środowiska naukowego; liczba cytowań, bez autocytowań wynosi 64 (wg bazy WoS na dzień 29/04/19). Oryginalnym osiągnięciem Kandydatki jest otrzymanie kapsuł peptydowo-rezorcynarenowych. Siłą napędową procesu ich tworzenia jest samoasocjacja łańcuchów peptydowych, która umożliwia chiralne sortowanie substratów i selektywne tworzenie struktur supramolekularnych, także gdy w reakcjach chemicznych uczestniczą mieszaniny racemiczne substratów. Niepowodzeniem zakończyły się natomiast próby funkcjonalizacji wnętrza kapsuł. W tym kontakcie rodzi się pytanie o perspektywę ich wykorzystania jako kontenerów molekularnych – prosiłbym o komentarz.

Ostatni praca cyklu (IV) to znakomicie napisany artykuł przeglądowy opublikowany w bardzo prestiżowym czasopiśmie (Chem. Rev.), w którym Doktorantka wraz z Promotorką rozprawy referują przykłady chiralnego sortowania cząsteczek, zarówno tych występujących w naturze (DNA, białka, peptydy) jak i syntetycznych (układy makrocycliczne, heterocycliczne, policykliczne węglowodory aromatyczne, foldamery). Dyskutowane tu zagadnienie wiąże się bezpośrednio z problematyką badań prowadzonych w ramach recenzowanej rozprawy. Szczegółowo omówione zostały układy supramolekularne oraz rodzaje oddziaływań warunkujących ich tworzenie. Artykuł ten można z powodzeniem potraktować jako przegląd literatury klasycznie zredagowanej pracy doktorskiej. Trzeba jednak podkreślić, że prezentowane tu zagadnienia wybiegają daleko poza te związane z realizacją badań Doktorantki. Z załączonych oświadczeń wynika, że wkład H. Jędrzejewskiej w powstanie opracowania był wiodący, co jeszcze bardziej podnosi ocenę pracy Kandydatki.

Jak już w wspomnianym, szczegółowy opis prowadzonych eksperymentów oraz analiz znajduje się w suplementach prac. Nie mam uwag do części syntetycznej badań. Peptydy syntetyzowane były klasyczną metodą w roztworze. Także kolejne etapy, syntezy kawitandów i tworzenie kapsuł nie nastęrczały problemów, o czym przekonują zamieszczone analizy

fizykochemiczne produktów (analizy NMR, HR MS, elementarna, pomiar skręcalności właściwej). Końcowe produkty wyodrębniane były poprzez wytrącenie. Wszyscy, którzy mierzą się konicznością oczyszczania związków metodami chromatograficznymi doceniają jak przyjazne, od strony syntetycznej, są obiekty badane przez Doktorantkę. W niczym nie obniża to mojej wysokiej oceny merytorycznej prowadzonych badań. Bardzo ciekawe, wręcz zaskakujące, wyniki uzyskane przez Doktorantkę były efektem szczegółowych badań z wykorzystaniem praktycznie wszystkich, stosowanych w tego typu badaniach, technik analitycznych: ^1H NMR, ^{13}C NMR, HR MS, ECD, rentgenograficznej oraz obliczeń kwantowo-mechanicznych.

Na podstawie lektury rozprawy doktorskiej mgr inż. Hanny Jędrzejewskiej stwierdzam, że jest Ona znakomicie wykształconym chemikiem, zarówno od strony teoretycznej jak też praktycznej. Kandydatka udowodniła, że jest bardzo dobrze przygotowana do prowadzenia badań naukowych. Temat podjęty przez Doktorantkę jest bardzo atrakcyjny z punktu widzenia naukowego i aplikacyjnego. Bardzo wysoko oceniam poziom merytoryczny i zakres badań wykonanych przez Doktorantkę. Przeprowadzone eksperymenty wymagały od Kandydatki biegłości w posługiwaniu się technikami syntetycznymi, analitycznymi nowoczesnej chemii organicznej oraz chemii teoretycznej. Uzyskane przez Nią zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach z listy JCR. Dorobek naukowy Kandydatki jest znakomity; uzupełniają go 4 prace z listy JCR Jej współautorstwa, dwie opublikowane w innych wydawnictwach oraz 7 prezentacji konferencyjnych. Recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania ustawowe (Ustawa o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami (Dz. U. 1789 z 27 września 2017 roku) oraz rozporządzenia MNiSzW (w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 19 stycznia 2018 r. (Dz. U. poz. 261 z dnia 30 stycznia 2018 roku) oraz zwyczajowe, dlatego też wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Organicznej PAN o dopuszczenie mgr inż. Hanny Jędrzejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uwzględniając moją bardzo pozytywną ocenę poszczególnych aspektów recenzowanej dysertacji, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Krzysztof Ralho