

dr Karolina Pułka-Ziach
Uniwersytet Warszawski
Wydział Chemii
Pracownia Peptydów
Zakład Chemii Organicznej i Technologii Chemicznej
ul. Pasteura 1
02-093 Warszawa

**AUTOREFERAT DO WNIOSKU O PRZEPROWADZENIE PROCEDURY
HABILITACYJNEJ**

**„Helikalne foldamery oligomocznikowe jako strukturalne i funkcjonalne
mimetyki peptydów i białek”**



Warszawa, 28.01.2019

Spis treści

1.	Imię i nazwisko.	3
2.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.	3
3.	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.	3
4.	Wskazanie osiągnięcia:	4
	a) tytuł osiągnięcia naukowego	4
	b) wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego	4
	c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.	5
5.	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych	30

1. Imię i Nazwisko: **Karolina Pułka-Ziach (nazwisko panieńskie Pułka)**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2007 r. - doktor nauk chemicznych, z wyróżnieniem, Wydział Chemii UW, rozprawa doktorska *„Synteza i zastosowanie cyklicznych pochodnych tryptofanu do otrzymywania analogów peptydów biologicznie czynnych”*, promotor prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik.

2002 r. - magister chemii, z wyróżnieniem, Kolegium Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych UW, praca magisterska *„Badanie agregacji fragmentu 109-126 białka prionowego”*, promotor prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

09. 2007 – do chwili obecnej - adiunkt, Wydział Chemii UW (w tym: maj 2011r. – wrzesień 2013r. – urlop bezpłatny związany z wyjazdem na staż podoktorski; listopad 2014r. – lipiec 2016r. – zwolnienie oraz urlop macierzyński)

04. 2007 – 09. 2007 - samodzielny pracownik naukowo-techniczny, Wydział Chemii UW

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

„Helikalne foldamery oligomocznikowe jako strukturalne i funkcjonalne mimetyki peptydów i białek”

b) wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

[H1] C. Douat-Casassus, **K. Pulka**, P. Claudon, G. Guichard “Microwave-enhanced solid-phase synthesis of *N,N'*-linked aliphatic oligoureas and related hybrids.”

***Organic Letters*, 2012, 14, 3130-3133. IF = 6.142**

[H2] G. W. Collie, **K. Pulka-Ziach**, C. M. Lombardo, J. Fremaux, F. Rosu, M. Decossas, L. Mauran, O. Lambert, V. Gabelica, C. D. Mackereth, G. Guichard “Shaping quaternary assemblies of watersoluble nonpeptide helical foldamers by sequence manipulation.”

***Nature Chemistry*, 2015, 7, 871-878. IF = 27.893**

[H3] G. Collie, **K. Pulka-Ziach**, G. Guichard “Surfactant-facilitated crystallisation of water soluble foldamers.”

***Chemical Science*, 2016, 7, 3377-3383. IF = 8.668**

[H4] G. Collie, **K. Pulka-Ziach**, G. Guichard “In situ iodination and Xray crystal structure of a foldamer helix bundle.”

***Chemical Communications*, 2016, 52, 1202-1205. IF = 6.319**

[H5] G. W. Collie, R. Bailly, **K. Pulka-Ziach**, C. M. Lombardo, L. Mauran, N. Taib-Maamar, J. Dessolin, C. D. Mackereth, G. Guichard “Molecular recognition within the cavity of a foldamer helix bundle: encapsulation of primary alcohols in aqueous conditions.”

***Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139, 6128–6137. IF = 13.858**

[H6] **K. Pulka-Ziach**, S. Sęk “ α -Helicomimetic foldamers as electron transfer mediators.”

***Nanoscale*, 2017, 9, 14913-14920. IF = 7.367**

[H7] **K. Pulka-Ziach**, S. Antunes, C. Perdriau, B. Kauffmann, M. Pasco, C. Douat, G. Guichard “Postelongation strategy for the introduction of guanidinium units in the main chain of helical oligourea foldamers”

***Journal of Organic Chemistry*, 2018, 83, 2530-2541. IF = 4.849**

[H8] **K. Pulka-Ziach** “Influence of reaction conditions on the oxidation of thiol groups in model peptidomimetic oligoureas.”

***Journal of Peptide Science*, 2018, 24, e3096. DOI: 10.1002/psc.3096. IF = 1.972**

[H9] **K. Pulka-Ziach**, A. K. Puszek, J. Juhaniwicz-Debinska, S. Sek „Electron transport and a rectifying effect of oligourea foldamer films entrapped within nanoscale junctions”

***The Journal of Physical Chemistry C*, 2019, 123, 1136-1141. IF = 4.484**

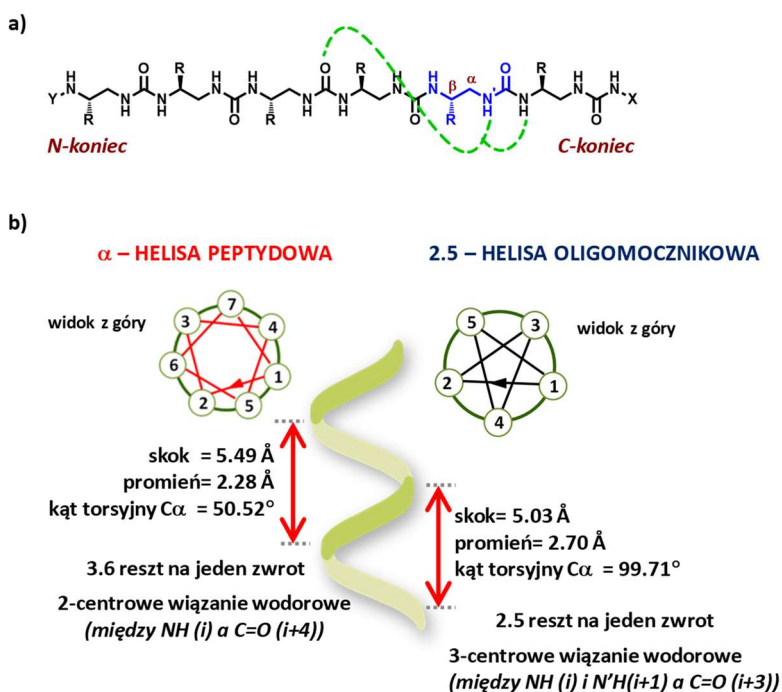
Sumaryczny IF (zgodnie z rokiem opublikowania) = 81.552

Średni IF na publikację 9.061

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Proces zwijania naturalnych oligomerów (białka, kwasy nukleinowe) odgrywa niezwykle ważną rolę w przyrodzie, ponieważ struktura przestrzenna biomolekuł determinuje ich funkcje, a jakiegokolwiek nieprawidłowości prowadzić mogą do utraty aktywności biologicznej lub poważnych zaburzeń w ich funkcjonowaniu. Na globalną strukturę biomolekuł składa się kilka poziomów organizacji, i tak struktura I-rzędowa, a więc sekwencja poszczególnych reszt (tj. aminokwasów lub nukleotydów) determinuje strukturę II-rzędową, z której dalej wynika kolejna organizacja, a mianowicie struktura III- oraz IV-rzędowa. Poznanie zatem czynników mających wpływ na proces zwijania i samoorganizacji jest fundamentalnym zagadnieniem z pogranicza chemii i biologii. W nurt tych badań doskonale wpisują się badania nad foldamerami. Termin „foldamer” został wprowadzony do literatury naukowej 20 lat temu przez S. H. Gellmana,¹ celem usystematyzowania terminologii dotyczącej nienaturalnych oligomerów inspirowanych przez Naturę. Do grupy foldamerów należą oligomery przyjmujące dobrze zdefiniowane, stabilne i przewidywalne struktury II-rzędowe, z których najpowszechniej przyjmowaną jest helisa.²⁻⁵ Łańcuch główny foldamerów tworzony może być przez β - oraz γ -peptydy, aromatyczne poliamidy, aza-aromatyczne oligomery, oligomoczniki i inne jednostki budulcowe.⁴

Oligomoczniki o wzorze ogólnym $[-CH(R)-CH_2-NH-CO-NH]_n$ (**Rysunek 1a**) należą do grupy peptydomimetyków, gdyż możliwe jest wprowadzenie łańcuchów bocznych wszystkich naturalnych aminokwasów. Jednak to co odróżnia foldamery oligomocznikowe od peptydów, to odporność na degradację proteolityczną, a także zdolność do przyjmowania stabilnej, helikalnej struktury II-rzędowej.



Rysunek 1. Foldamery oligomocznikowe: a) wzór ogólny oligomeru oligomocznikowego (kolorem niebieskim zaznaczono jedną resztę mocznikową, natomiast kolor zielony pokazuje wiązania wodorowe stabilizujące helisę); b) porównanie podstawowych parametrów helisy typu α i 2.5.

Oligomoczniki zwijają się w helisę typu 2.5, co oznacza, że jeden zwrot helisy tworzony jest przez dwie i pół reszty.⁶ Helisa ta stabilizowana jest przez 3-centrowe wiązania wodorowe, zamykające 12- i 14-członowy pseudo-pierścień pomiędzy grupami $NH(i)$ i $N'H(i+1)$ oraz $C=O(i+3)$. Obecność dodatkowego, w stosunku do peptydów, wiązania wodorowego stabilizującego helisę, powoduje, że nawet krótkie oligomery (od czterech reszt mocznikowych) zwijają się w helisę 2.5 stabilną w ciele stałym oraz w roztworze.⁷ Dodatkowo, zdolność do zwijania jest cechą łańcucha głównego i nie zależy od rodzaju łańcuchów bocznych reszt mocznikowych, co odróżnia oligomoczniki od peptydów, gdzie łańcuchy boczne poszczególnych reszt aminokwasowych w dużym stopniu determinują przyjmowaną przez peptydy strukturę II-rzędową. Podstawowe parametry α -helisy oraz helisy typu 2.5 są zbliżone, co sprawia, że foldamery oligomocznikowe mogą stanowić doskonałe mimetyki strukturalne peptydów (**Rysunek 1b**).

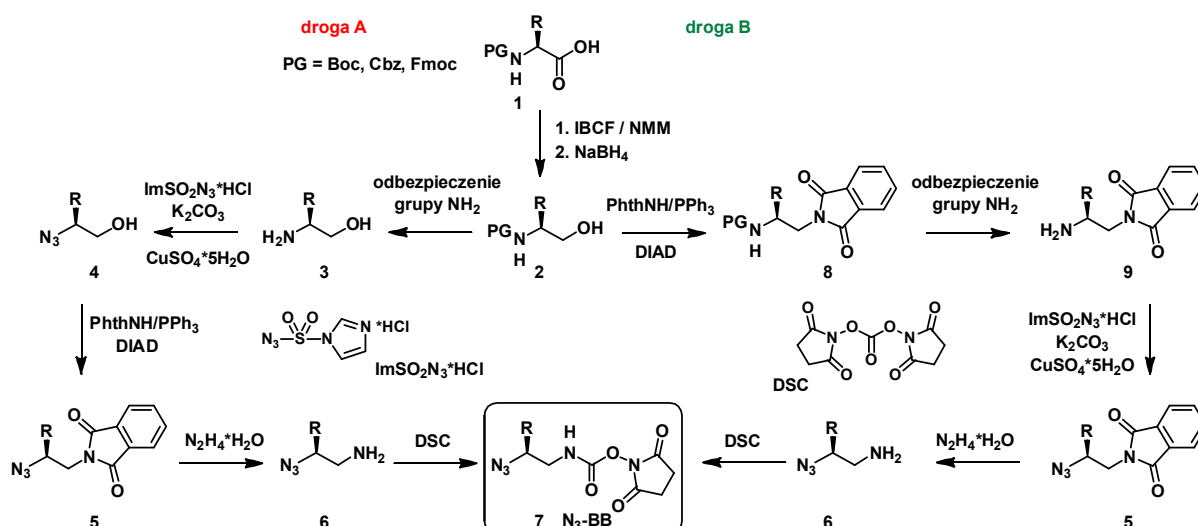
Badania nad syntezą i zastosowaniem foldamerów oligomocznikowych i ich pochodnych są głównym celem naukowym mojego projektu habilitacyjnego. Interesowało mnie zoptymalizowanie syntezy nowych bloków budulcowych, które z powodzeniem mogą być wykorzystane w syntezie oligomerów mocznikowych na nośniku stałym w środowisku mikrofal. Ponadto zajęłam się także opracowaniem syntezy takich pochodnych oligomoczników, w których jedna lub kilka grup mocznikowych zostało zastąpionych wiązaniami γ -amidowymi lub grupami guanidyniowymi. Kolejnym celem było zastosowanie oligomoczników do badania zjawisk i procesów fizyko-chemicznych do tej pory zarezerwowanych dla peptydów i ich pochodnych. Te procesy obejmują samoorganizację do struktur przestrzennych wyższego rzędu, samoorganizację w postaci monowarstw na powierzchni oraz transport elektronów.

Synteza foldamerów oligomocznikowych i ich pochodnych

Do syntezy N,N' -dipodstawionych alifatycznych oligomoczników wykorzystuje się aktywowane bloki budulcowe, oparte na monoblokowanej pochodnej etylenodiaminy. Syntezę oligomeru prowadzić można w roztworze lub na nośniku stałym (SPoUS-Solid Phase oligoUrea Synthesis). Od wielu lat prowadzone są intensywne badania nad optymalizacją syntezy na nośniku stałym, ponieważ pozwala to znacznie skrócić czas otrzymywania długich oligomoczników, a często także prowadzi do otrzymania finalnych związków z wyższą wydajnością niż w roztworze.

W literaturze znanych jest kilka sposobów wprowadzania wiązań mocznikowych, przy wykorzystaniu aktywowanych bloków budulcowych, takich jak np. pochodne izocyjanianowe,⁸ czy karbaminiany *p*-nitrofenylowe⁹⁻¹¹ lub sukcydimidowe.^{6,12}

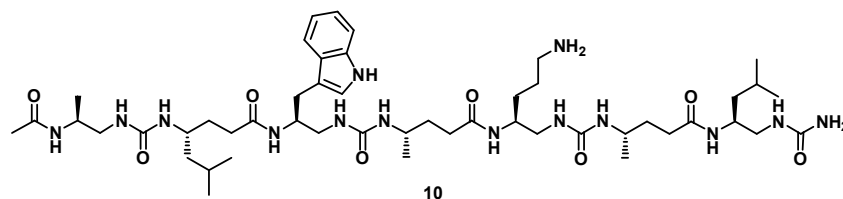
Badania dotyczące otrzymywania aktywnych bloków budulcowych, a następnie wykorzystanie ich do syntezy na nośniku stałym w środowisku mikrofal, co znacznie skraca czas otrzymywania pożądaných związków, zostały opisane w publikacji **H1**. Jako bloki budulcowe do wprowadzania jednostek mocznikowych postanowiłam wykorzystać pochodne etylenodiaminy, w których jedna grupa aminowa została zamaskowana w postaci grupy azydkowej $-N_3$, natomiast druga grupa aminowa została przekształcona w aktywny karbaminian sukcydimidowy. Do otrzymywania bloków budulcowych zastosowałam dwie ścieżki syntetyczne **A** i **B** pokazane na **Schemat 1**. Jak łatwo zauważyć ścieżki te różniły się kolejnością poszczególnych etapów. W przypadku obydwu dróg syntezy, związkami wyjściowymi były α -aminokwasy z odpowiednio zabezpieczoną grupą α -aminową. Zastosowałam pochodne z grupami zabezpieczającymi Boc oraz Cbz; w publikacji **H2** także grupę zabezpieczającą Fmoc.



Schemat 1. Otrzymywanie karbaminianowych bloków budulcowych z grupą -N₃

Pierwszy etap w obydwu przypadkach polegał na redukcji grupy karboksylowej do grupy hydroksylowej w dwuetapowej reakcji: w pierwszym etapie wobec chloromrówczanu izobutyli (IBCF) tworzył się mieszany bezwodnik, który ulegał redukcji za pomocą NaBH₄ do pożądanego aminoalkoholu **2**. Otrzymany aminoalkohol **2** poddawałam następnie kolejnym reakcjom. I tak, otrzymując blok budulcowy według ścieżki **A**, najpierw odbezpieczałam grupę aminową (za pomocą TFA, gdy zabezpieczeniem była grupa Boc lub w reakcji wodorowania przy zastosowaniu grupy Cbz), a następnie poddawałam ją reakcji tzw. diazotransferu (ang. *diazotransfer reaction*), w wyniku czego powstawał azydoalkohol typu **4**. Do reakcji tej wykorzystywałam odczynnik ImSO₂N₃⁺HCl,¹³ będący pochodną imidazolu. Związek ten jest krystaliczny i charakteryzuje się znacznie wyższą stabilnością niż powszechnie używany azydek trifluorometanosulfonowy. Kolejny etap to reakcja Mitsunobu z wykorzystaniem ftalimidu jako nukleofila. W wyniku tej reakcji grupa hydroksylowa w związku typu **4** ulegała podstawieniu grupą aminową zabezpieczoną grupą ftaloilową i powstawał związek typu **5**. Kolejne dwa etapy to usunięcie ftaloilowej grupy zabezpieczającej za pomocą N₂H₄·H₂O i reakcja z węglanem disukcynimidylowym (DSC), w wyniku której powstaje żądany blok budulcowy typu **7** (N₃-BB). W publikacji **H1** opisana została synteza kilku bloków budulcowych. Pochodne Phe, Tyr oraz Orn zostały otrzymane na drodze **A** z dobrymi całkowitymi wydajnościami (> 30% po 6 etapach). Kiedy natomiast próbowałam w taki sam sposób otrzymać blok budulcowy, pochodną Leu, otrzymałam bardzo niską wydajność (< 10%) całkowitą pożądanego bloku budulcowego typu **7**. Spowodowane to było wysoką lotnością dwóch związków pośrednich, mianowicie azydoalkoholu typu **4** oraz azydoaminy typu **6**. W związku z tym zamieniłam kolejność etapów (ścieżka **B**) i tak najpierw przeprowadziłam reakcję Mitsunobu, otrzymując związek typu **8**, który kolejno poddałam usuwaniu grupy zabezpieczającej i reakcji z ImSO₂N₃⁺HCl, w wyniku czego otrzymałam związek typu **5**. Kolejne dwa etapy zostały przeprowadzone w ten sam sposób, co na ścieżce **A**, z jednym wyjątkiem, mianowicie po przerobieniu mieszaniny poreakcyjnej zawierającej azydoaminę typu **6**, rozpuszczalnik nie był odparowywany do sucha, żeby uniknąć strat związku **6**. Pozwoliło to na otrzymanie bloków budulcowych, pochodnych Ala i Leu, a także Trp z dobrymi wydajnościami całkowitymi (27-43% po 6 etapach). Kolejny etap pracy polegał na optymalizacji warunków syntezy oligomerów na nośniku stałym w środowisku mikrofal. Do redukcji grupy -N₃ do grupy -NH₂ wybraliśmy reakcję Staudingera z użyciem PMe₃ w środowisku wodnym. Zastosowanie wody jako reagenta (i rozpuszczalnika) zawęziło wybór żywicy do polimeru hydrofilowego, o dobrych właściwościach pęcznienia w spektrum

rozpuszczalników, także w środowisku wodnym. Zastosowana została żywica amidowa Rinka typu NovaPEG, z której gotowe oligomery odszczepiane są kwasem trifluoroctowym.

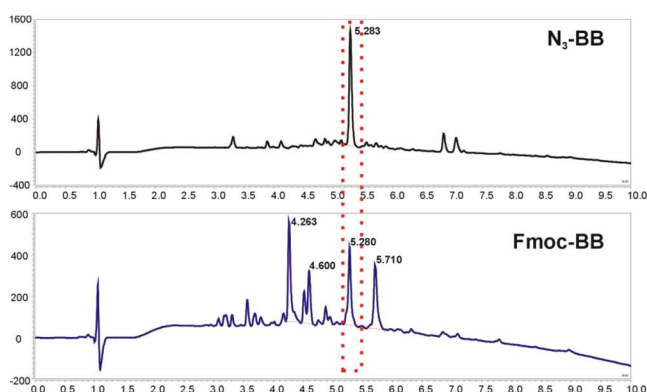


Rysunek 2. Hybryda mocznikowo- γ -amidowa otrzymana na nośniku stałym w środowisku mikrofal

Warunki syntezy foldamerów optymalizowaliśmy z uwzględnieniem oligomerów, których łańcuch główny zbudowany jest tylko z jednostek mocznikowych oraz hybryd mocznikowo- γ -amidowych, w których co druga jednostka mocznikowa została zastąpiona izostrukuralną resztą γ -aminokwasu (**Rysunek 2**). Najlepsze wydajności i czystości zaplanowanych oligomerów otrzymaliśmy stosując poniższe warunki reakcji:

- sprzężanie karbaminianowych bloków budulcowych z grupą N_3 (N_3 -BB):* 1,5 ekw. N_3 -BB, 2,5 ekw. DIPEA, DMF, 70°C, 25W, 2 x 15 min.
- redukcja grupy N_3 do grupy NH_2 :* 10 ekw. PMe_3 w THF (1M), 7:3 1,4-dioksan : woda, 70°C, 25W, 2 x 30 min.
- sprzężanie Fmoc- γ -aminokwasów:* 1,5 ekw. Fmoc- γ -AA, 1,5 ekw. HBTU, 1,5 ekw. HOBt, 5 ekw. DIPEA, DMF, 50°C, 50W, 2 x 12 min.
- usuwanie grupy zabezpieczającej Fmoc:* 20% roztwór piperidyny w DMF, 50°C, 50W, 1 x 4 min., 1 x 8 min.

Dodatkowo, aby pokazać skuteczność opracowanej przez nas metody syntezy przy zastosowaniu promieniowania MW, otrzymałam hybrydę mocznikowo- γ -amidową **10** przy zastosowaniu karbaminianowych bloków budulcowych z grupą zabezpieczającą Fmoc (Fmoc-BB) w temperaturze pokojowej, bez zastosowania promieniowania mikrofalowego. Synteza trwała znacznie dłużej, a czystość otrzymanego związku była ponad 3 razy niższa niż przy użyciu N_3 -BB i promieniowania mikrofalowego. Oprócz właściwego związku, powstawały też oligomery krótsze, z brakującą jedną lub dwiema jednostkami mocznikowymi (**Rysunek 3**).



Rysunek 3. Porównanie efektywności metod syntezy hybrydy mocznikowo- γ -amidowej **10** ($\lambda=200$ nm) przy zastosowaniu azydowych bloków budulcowych (N_3 -BB, czarny chromatogram) oraz bloków budulcowych z grupą zabezpieczającą Fmoc (Fmoc-BB, niebieski chromatogram). Zaznaczono pik pochodzący od właściwego związku.

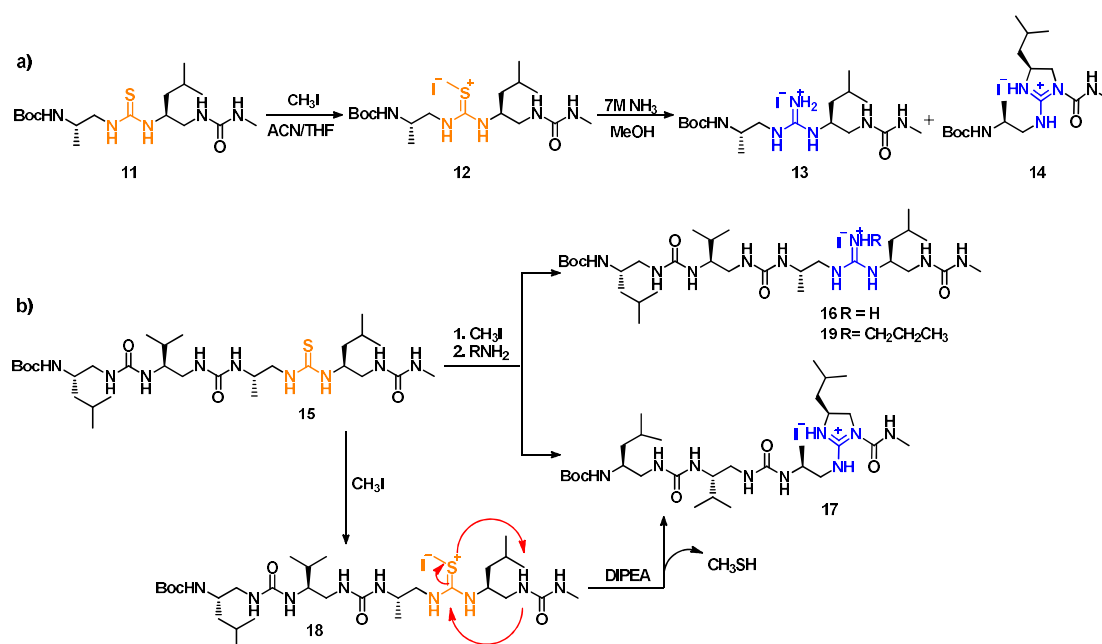
Opracowaną przeze mnie metodę syntezy karbaminianowych bloków budulcowych oraz foldamerów oligomocznikowych i ich pochodnych na nośniku stałym wobec promieniowania mikrofalowego,

opisaną w publikacji **H1**, stosowałam następnie do otrzymywania bloków budulcowych (w sumie otrzymałam 18 bloków budulcowych) i oligomerów, opisanych w publikacjach **H2-H5** oraz w innych projektach, w których uczestniczyłam i które obecnie prowadzę.

Jak wspominałam wyżej, foldamery oligomocznikowe traktowane mogą być jak mimetyki peptydów. Praktyką często stosowaną w poszukiwaniu nowych peptydomimetyków są podstawienia w obrębie wiązania peptydowego. Podobne podejście stosowane było w przypadku oligomoczników, gdzie poszczególne grupy mocznikowe zastępowane były wiązaniami γ -amidowymi,^{14,15} karbaminianowymi¹⁶ Nie zdefiniowano zakładki.,¹⁶ czy tio- i selenomocznikowymi.¹⁷ Następnie dla nowych pochodnych hybrydowych określano wpływ tych podstawień na strukturę II-rzędową. Analizując dane literaturowe okazało się, że brakuje doniesień na temat takich pochodnych hybrydowych, w których jedna z grup mocznikowych została zastąpiona grupą guanidynową. Pochodne guanidynowe wykazują właściwości silnie zasadowe i ulegają protonowaniu w szerokim zakresie pH. Ciekawym zatem wydawało się sprawdzenie, jaki wpływ na helikalność łańcucha oligomocznikowego będzie miało wprowadzenie reszty guanidyniowej, gdyż w wyniku takiego podstawienia zmianie ulegają właściwości donorowo-akceptorowe.

Otrzymywanie oraz badania konformacyjne mimetyków oligomoczników z resztą guanidyniową są przedmiotem pracy **H7**. Opracowanie sposobu otrzymywania nowych oligomerów prowadziłam stosując strategię syntezy w roztworze, gdyż daje to większą kontrolę nad przebiegiem reakcji. Postanowiłam wykorzystać znaną z literatury metodę otrzymywania pochodnych guanidyniowych, wykorzystującą tiomoczniki jako związki wyjściowe.¹⁸⁻²¹

Dimer **11** (**Schemat 2a**) poddałam reakcji w różnych warunkach znanych z literatury,¹⁸⁻²¹ a postęp kontrolowałam za pomocą metody RP-HPLC.



Schemat 2. Schemat dwuetapowej syntezy pochodnych guanidyniowych: a) pochodne dimeru **11**; b) pochodne tetrameru **15**

Ze wszystkich testowanych warunków, najlepsza okazała się metoda dwuetapowa, gdzie w pierwszym etapie następuje S-metylowanie za pomocą CH_3I , a następnie tak otrzymany jodek S-metylotiourowniowy **12** ulega nukleofilowemu podstawieniu za pomocą odpowiedniej aminy w podwyższonej temperaturze ($40\text{-}45^\circ\text{C}$), w moim przypadku był to NH_3 w postaci 7M roztworu w

CH₃OH (**Schemat 2a**). Okazało się, że w wyniku tej reakcji powstały dwa produkt: liniowy **13**, zgodny z założeniem oraz cykliczny **14** (N,N',N''-tripodstawiona pochodna guanidyniowa) będący wynikiem nukleofilowego ataku wewnątrzcząsteczkowego (**Tabela 1**). Warto również zauważyć, że w każdym przypadku pochodne guanidyniowe (zarówno cykliczne jak i liniowe) otrzymywane były w postaci soli jodkowych.

Kolejno, przeprowadziłam reakcję na dłuższym oligomerze, tetramerze **15**, w tych samych warunkach (**Schemat 2b**). Jako główny produkt powstawał produkt cykliczny **17** i w mniejszej ilości produkt liniowy **16** (**Tabela 1**).

Tabela 1. Wyniki reakcji guanidynyacji dla związków **11** i **15**.

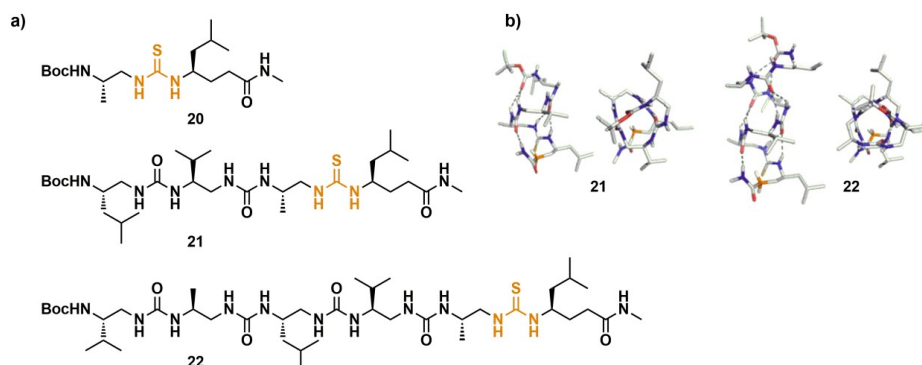
substrat	nukleofil	rozpuszczalnik ^a	czas [h]	stosunek produktów liniowy:cykliczny ^b
11	7M NH ₃	CH ₃ OH	48	33:67 (13:14)
15	7M NH ₃	CH ₃ OH	24	26:74 (16:17)
15	<i>n</i> -PrNH ₂	CH ₃ OH	24	15:85 (19:17)
15	<i>n</i> -PrNH ₂	CH ₃ CN	120	73:27 (19:17)
15	0,5M NH ₃ w 1,4-dioksanie	CH ₃ CN	120	85:15 (16:17)
15	0,5M NH ₃ w 1,4-dioksanie	THF	38	97:3 (16:17)

^a reakcje prowadzone były w temperaturze 40-45°C

^b określony za pomocą RP-HPLC; w nawiasach podano numery związków

Udowodniłam też, że produkt cykliczny powstaje z pochodnej S-metylotiouroniowej **18** ze względu na zasadowe warunki reakcji. Związek **18** rozpuszczony w CH₃OH wobec DIPEA ulegał po 24h przekształceniu do produktu **17** (**Schemat 2b**). Dodatkowo, przebadłam wpływ rozpuszczalnika na przebieg reakcji. Jako nukleofil zastosowałam *n*-PrNH₂ (CH₃(CH₂)₂NH₂). Okazało się, że rozpuszczalnik ma bardzo duży wpływ na wynik reakcji i tak w CH₃OH powstawał w przewadze produkt cykliczny **17**, natomiast w CH₃CN głównym produktem był pożądaný związek liniowy **19**, jednakże reakcja zachodziła wolniej. Wpływ rozpuszczalnika został przebadany także kiedy nukleofilem był NH₃ (stosowany jako 0,5 M roztwór w 1,4-dioksanie). Okazało się, że zarówno w CH₃CN, jak i w THF produkt liniowy **19** powstawał jako produkt główny (**Tabela 1**).

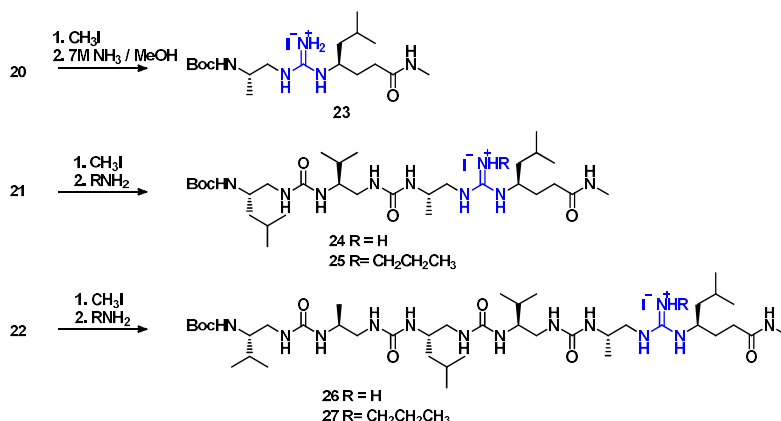
W kolejnym etapie prac skupiłam się na takim dobraniu budowy substratu, żeby otrzymywać jedynie pożądaný produkt liniowy.



Rysunek 4. Pochodne tiomocznikowe z resztą γ -aminokwasu: a) substraty do reakcji guanidynyacji; b) struktury krystaliczne związków **21** i **22**

Powstawanie produktu cyklicznego związane było z obecnością grupy mocznikowej poprzedzającej resztę S-metylotiouroniową, więc zasadnym zdawało się być zastąpienie tej reszty mocznikowej za

pomocą γ -aminokwasu (związki **20-22**, **Rysunek 4a**). Zarówno związek **21**, jak i **22** przyjmowały strukturę heliakalną typu 2.5 w ciele stałym, co zostało potwierdzone za pomocą analizy RAS (**Rysunek 4b**).



Schemat 3. Reakcja guanidynyacji foldamerów zawierających na C-końcu resztę γ -aminokwasu

Reakcja guanidynyacji odpowiednich pochodnych S-metylotiouroniowych z NH_3 jak i n -PrNH₂ z dobrą lub bardzo dobrą wydajnością prowadziła do otrzymania pochodnych guanidyniowych (**Schemat 3**) zawierających 2 (związek **23**), 4 (związki **24** i **25**) lub 6 (związki **26** i **27**) reszt w łańcuchu głównym (**Tabela 2**).

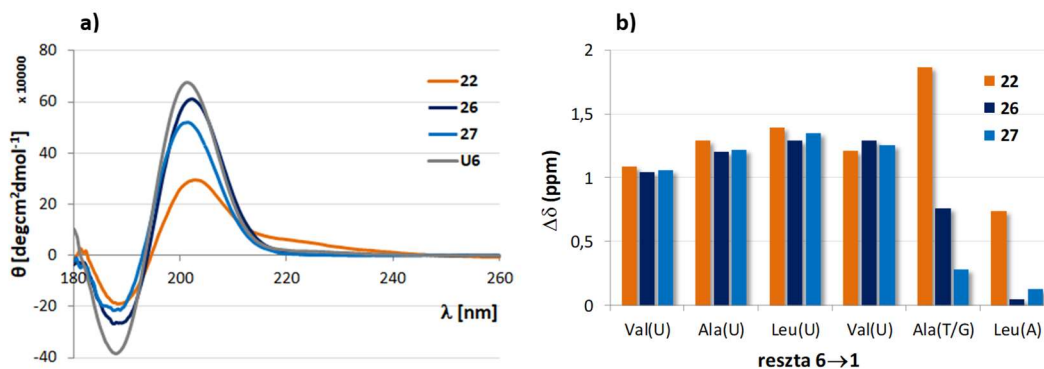
Tabela 2. Wyniki reakcji guanidynyacji dla związków **20-22**

substrat	nukleofil	rozpuszczalnik ^a	czas [h]	wydajność reakcji ^b [%]
20	7M NH ₃	CH ₃ OH	48	20 (23)
21	0,5M NH ₃ w 1,4-dioksanie	CH ₃ CN	90	55 (24)
21	0,5M NH ₃ w 1,4-dioksanie	THF	38	74 (24)
21	n -PrNH ₂	CH ₃ CN	90	46 (25)
22	0,5M NH ₃ w 1,4-dioksanie	CH ₃ CN	24	92 (26)
22	n -PrNH ₂	CH ₃ CN	60	60 (27)

^a reakcje prowadzone były w temperaturze 40-45°C

^b określona po wydzieleniu właściwego produktu; w nawiasach podano numery związków

Otrzymane foldamery z jedną resztą guanidyniową zostały następnie przebadane pod kątem wpływu grupy guanidyniowej na konformację oligomeru. Położenie reszty guanidyniowej w łańcuchu głównym zostało celowo wybrane w pobliżu tzw. C-końca oligomeru, aby jak najmniej destabilizować konformację całego foldameru. Porównanie widma dichroizmu kołowego (CD) hybryd mocznikowo-guanidyniowych (oligomery **26** i **27**) z widmem homooligomocznika (**U6**) pokazuje, że hybrydy te wykazują tendencję do zwijania w helisę (**Rysunek 5a**). Dokładna analiza widm NMR, a w szczególności porównanie przesunięć chemicznych protonów grup mocznikowych, a także różnicy w przesunięciach chemicznych diastereotopowych protonów grup α -CH₂ (**Rysunek 5b**) oraz szybkości wymiany proton/deuter (H/D) protonów grup mocznikowych pozwala jednak zauważyć, że o ile pierwsze cztery reszty (licząc od N-końca) przyjmują stabilną konformację heliakalną, o tyle dwie ostatnie reszty (w tym guanidyniowa) charakteryzuje znacznie niższa stabilność konformacyjna.

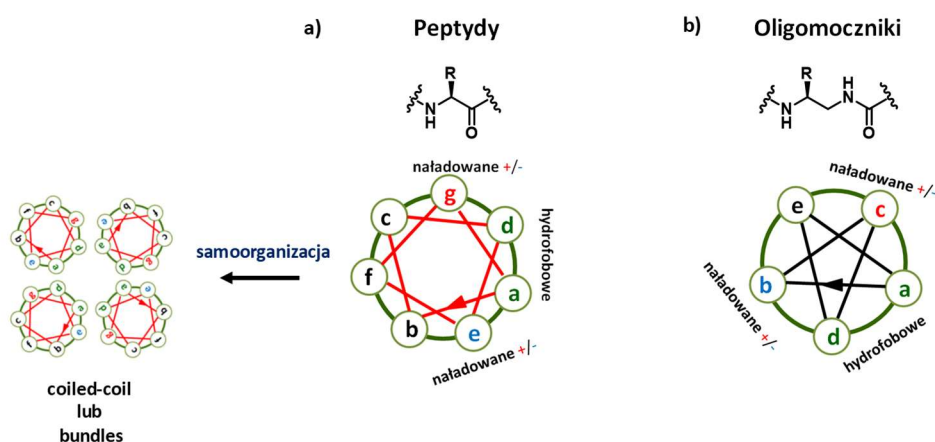


Rysunek 5. Badania konformacyjne heksamerów zawierających grupę guanidyniową: a) widma CD tiomocznika **22** i odpowiednich pochodnych guanidyniowych w porównaniu z widmem homooligomocznika (**U6**, kolor szary); b) porównanie różnicy przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) protonów grup α -CH₂

Przedstawione w pracy **H7** wyniki pozwoliły mi zaprojektować nowe foldamery, które są przedmiotem prowadzonego przeze mnie projektu Sonata Bis.

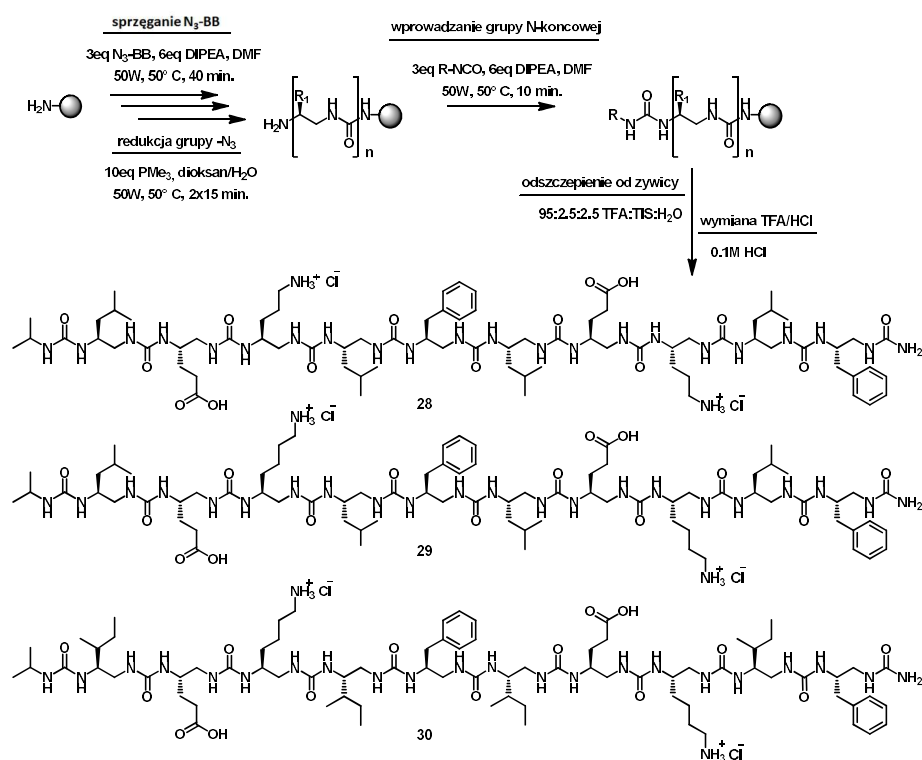
Foldamery jako strukturalne mimetyki peptydów i białek

Struktura III- i IV-rzędowa białek determinuje ich funkcje, a jakiegokolwiek nieprawidłowości prowadzić mogą do utraty ich aktywności biologicznej lub poważnych zaburzeń w ich funkcjonowaniu. Jednym z często występujących motywów struktur wyższego rzędu w przypadku białek są tzw. superhelisy (ang. *coiled coil*),²² określane także jako „pęczki helis” (ang. *helix bundles*, w dalszej części autoreferatu będę używała nazwy angielskiej). Złożone są z dwóch do czterech (ale również więcej) amfifilowych α -helis i są wyraźnie wyodrębnione w cząsteczkach białek.²³ W miejscach kontaktu helis ze sobą znajdują się reszty aminokwasów hydrofobowych (najczęściej Leu, Ile, Val). Hydrofobowe reszty aminokwasowe zajmują zwykle pozycję **a** i **d** w 7-aminokwasowym powtarzającym się motywie, określanym jako *heptad repeat abcdefg* (**Rysunek 6a**).²⁴ Pozycje **e** i **g** zajmowane są przez reszty aminokwasów naładowanych. Kombinacja oddziaływań hydrofobowych i jonowych decyduje o orientacji helis względem siebie, a więc o topologii całych struktur (**Rysunek 6a**). Jako, że te elementy strukturalne znajdują się w białkach naturalnych, zatem dotyczą związków rozpuszczalnych w wodzie. Dlatego też od kilku lat prowadzone są intensywne badania nad wodorozpuszczalnymi foldamerami, zdolnymi do tworzenia struktur wyższego rzędu (III- i IV-rzędowych).²⁵⁻³⁰



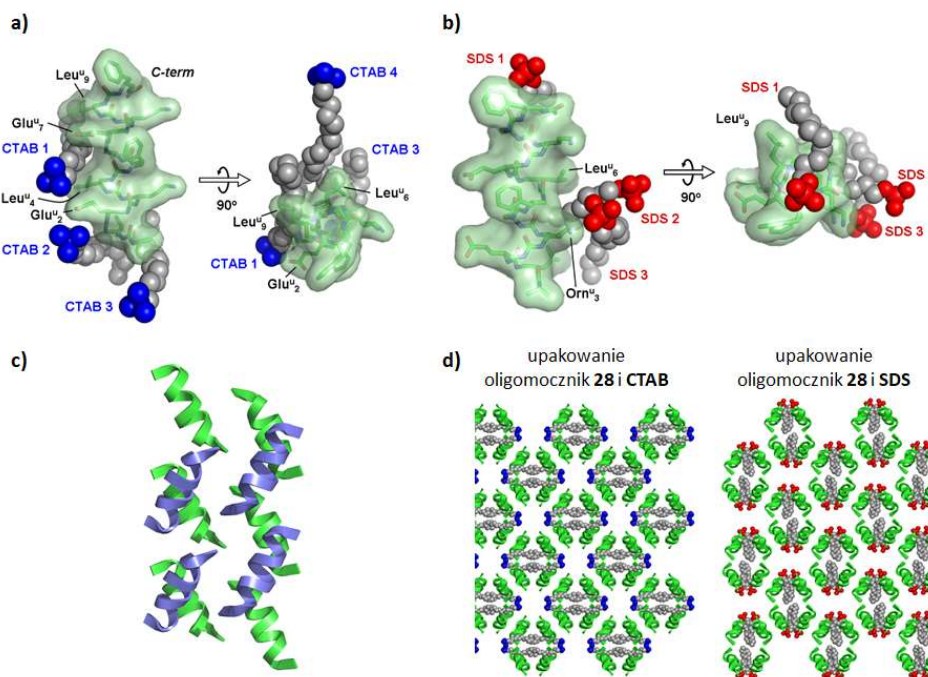
Rysunek 6. Schematyczne przedstawienie helis: a) peptydowej, z pokazaniem tzw. *heptad repeat* oraz zasady samoorganizacji do struktur IV-rzędowych; b) oligonucleotydowej

W literaturze znane są foldamery peptydowe, takie jak β -peptydy²⁵⁻²⁷ i hybrydy α/β -peptydowe²⁸⁻³⁰ zdolne do tworzenia struktur typu *bundles*. W nurt tych badań doskonale wpisują się foldamery oligomocznikowe. Jak wspomniałam na początku tego autoreferatu możliwe jest wprowadzenie do łańcucha oligomocznika łańcuchów bocznych wszystkich naturalnych aminokwasów. Sprawia to, że związki te są doskonałymi kandydatami do poszukiwania rozpuszczalnych w wodzie sekwencji, zdolnych do kontrolowanego organizowania się w struktury IV-rzędowe. Bazując na opisanych powyżej wymaganiach strukturalnych koniecznych do samoorganizacji obserwowanej w białkach, przystąpiliśmy do zaprojektowania sekwencji foldamerów oligomocznikowych (**Rysunek 6b**), tak by zawierały w odpowiednich położeniach hydrofobowe łańcuchy boczne (Leu) oraz łańcuchy boczne aminokwasów naładowanych (Glu, Lys lub Orn). Badania samoorganizacji zamierzaliśmy prowadzić w cieple stałym (krystalizacja) oraz w roztworze. Pierwsze zaprojektowane sekwencje zawierały na N-końcu reszty *p*-bromofenyłową lub *p*-bromobenzylową. Mimo obecności łańcuchów bocznych zawierających grupy karboksylowe i aminowe, związki te nie rozpuszczały się w środowisku wodnym. Wodorozpuszczalność uzyskaliśmy dopiero dla związków zawierających na N-końcu resztę izopropylową. Pierwsze zaprojektowane wodorozpuszczalne foldamery oligomocznikowe są przedmiotem pracy **H3**. Wszystkie oligomery zsyntezowałam metodą na fazie stałej (SPoUS) przy wykorzystaniu otrzymanych uprzednio przeze mnie karbaminianowych bloków budulcowych z grupą $-N_3$ (praca **H1**). Synteza na fazie stałej przebiegała w środowisku mikrofal (**Schemat 4**), a warunki poszczególnych etapów zostały nieco zmodyfikowane w stosunku do tych, opisanych w pracy **H1**. Spowodowane to było obecnością odpowiednio zabezpieczonych grup funkcyjnych w łańcuchach bocznych poszczególnych bloków budulcowych. Gotowe związki **28-30** odszczepiałam od żywicy za pomocą kwasu trifluorooctowego, a oczyszczanie prowadziłam za pomocą semi-preparatywnego RP-HPLC. Po liofilizacji czyste związki otrzymywane były w postaci trifluoroocjanów. Przeprowadziliśmy szereg prób krystalizacji takich pochodnych, jednak żadna z nich nie zakończyła się sukcesem. Dlatego też zdecydowaliśmy się wymienić przeciwjon na anion chlorkowy (**Schemat 4**).



Schemat 4. Otrzymywanie wodorozpuszczalnych foldamerów oligomocznikowych **28-30**

Zostało sprawdzonych kilkaset warunków krystalizacji (gotowe, komercyjne zestawy), jednak żadne z nich nie dały zadowalających rezultatów. Dopiero zastosowanie surfaktantów (detergentów) takich jak CTAB (bromek heksadecylotrimetyloamoniowy) oraz SDS (dodecylosiarczan sodu), jako składników mieszaniny do krystalizacji (0,5M NaCl, 10mM MgCl₂, 100mM bufor HEPES oraz 10mM CTAB lub SDS) pozwoliło na otrzymanie kryształów związków **28-30** nadających się do badań RAS. Okazało się, że poszczególne helisy w kryształach, kontaktując się ze sobą tworzą superhelisę (Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.c).

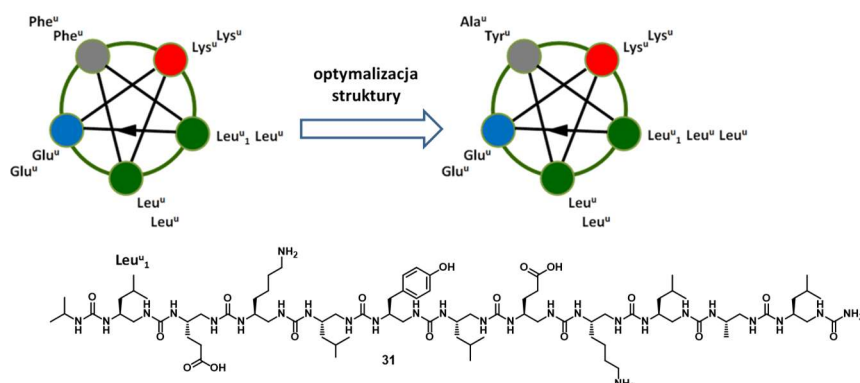


Rysunek 7. Struktury krystaliczne uzyskane dla oligomoczników wobec surfaktantów: a) oligomocznik **28** wobec CTAB; b) oligomocznik **28** wobec SDS; c) superhelisa utworzona z poszczególnych helis (dla jasności rysunku nie pokazano cząsteczek detergenta); d) upakowanie oligomoczników i detergentów w sieci krystalicznej

Dodatkowo, okazało się, że surfaktant, zarówno dodatnio jak i ujemnie naładowany, pełnił rolę spoiwa, „kleju molekularnego” cząsteczek foldamerów w sieci krystalicznej. W przypadku CTAB dodatnio naładowana trimetyloamoniowa „głowa” usytuowana była w pobliżu grup karboksylowych reszt Glu^u (gdzie u oznacza resztę mocznikową), natomiast alifatyczny „ogon” CTAB hydrofobowo oddziaływał z łańcuchami bocznymi reszt Leu^u (Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.a,d). W przypadku SDS, ujemnie naładowana grupa siarczanowa lokowała się w pobliżu dodatnio naładowanych grup aminowych w łańcuchach bocznych cząsteczki oligomocznika (Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.b,d). Porównanie parametrów helisy, uzyskanej w wyniku krystalizacji ze środowiska wodnego wobec surfaktantów, z parametrami helisy uzyskanej w wyniku krystalizacji z rozpuszczalników organicznych, pokazuje że warunki krystalizacji mają znikomy wpływ na geometrię helisy.

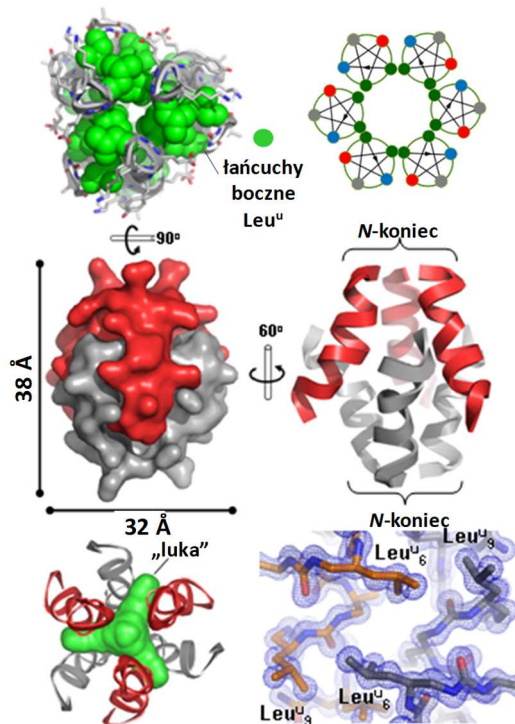
Równoległe prowadzone były badania nad optymalizacją struktury pierwszorzędowej, żeby otrzymać związki zdolne do samoorganizacji do struktur IV-rzędowych typu *bundles*. Badania nad tym zagadnieniem są przedmiotem pracy **H2**, **H4** oraz **H5**. Związkiem wyjściowym do wprowadzania modyfikacji strukturalnych był związek **29**. Jak pokazałam na **Rysunek 8**, postanowiliśmy wydłużyć łańcuch główny o dodatkową resztę Leu^u w celu zwiększenia ilości oddziaływań hydrofobowych, przy czym w opisanych powyżej strukturach krystalicznych taką rolę pełnił łańcuch hydrofobowy

detergenta. Dodatkowo zamieniliśmy jedną z reszt Phe^u na Tyr^u w celu polepszenia rozpuszczalności związku w wodzie, natomiast drugą na Ala^u z krótkim łańcuchem bocznym. Nowy oligomer **31** został otrzymany na fazie stałej, z N₃-BB w warunkach podanych na **Schemat 4**, a jon trifluoroocjanowy został wymieniony na anion chlorkowy.



Rysunek 8. Optymalizacja struktury I-rzędowej w kierunku samoorganizacji do struktur wyższego rzędu

Okazało się, że stosunkowo niewielkie zmiany w strukturze I-rzędowej miały bardzo duże konsekwencje jeśli chodzi o samoorganizację do struktur wyższego rzędu, co zostało opisane w pracy **H2**. Warto tutaj zaznaczyć, że do krystalizacji (20% izopropanol, 200mM CaCl₂ oraz 100mM bufor CH₃COONa o pH 4,6) związku **31**, a także związków opisanych poniżej, nie wymagany był dodatek detergentu. Struktura krystaliczna związku **31** pokazała tworzenie kapsuły typu *helical bundle*, złożonej z 6 niezależnych helis oligomocznikowych, układających się w trzy dimery, z których każdy składa się z helis ułożonych antyrównolegle względem siebie. Kapsuła posiada hydrofobowe wnętrze, utworzone przez łańcuchy boczne Leu^u, natomiast naładowane łańcuchy boczne Lys^u i Glu^u znajdują się na zewnątrz (**Rysunek 9**). Zmierzona objętość wnętrza kapsuły („luka” na **Rysunek 9**) wynosi 495Å³.

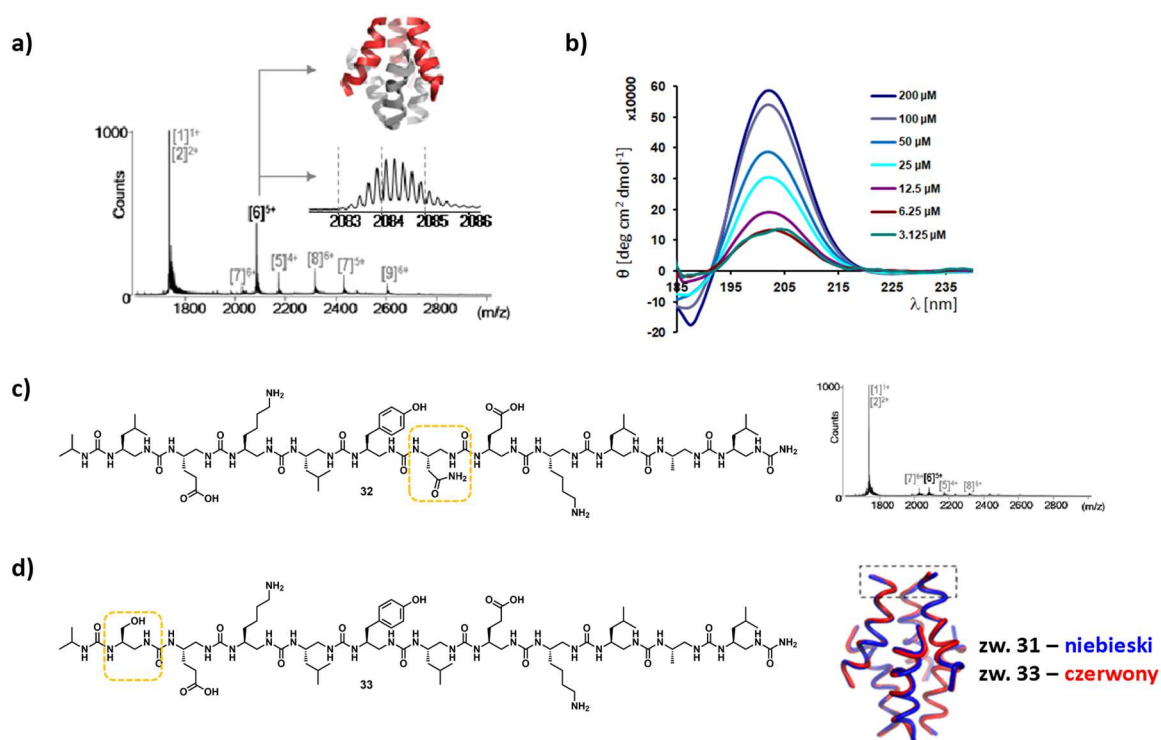


Rysunek 9. Samoorganizacja i struktura krystaliczna oligomocznika **31**

Oprócz badań w ciele stałym, tworzenie dobrze zorganizowanej struktury IV-rzędowej zostało także potwierdzone w roztworze za pomocą szeregu metod, takich jak natywna spektrometria masowa (natywna ESI-MS), dichroizm kołowy czy spektroskopia wysokopolowego jądrowego rezonansu magnetycznego (700 i 800MHz).

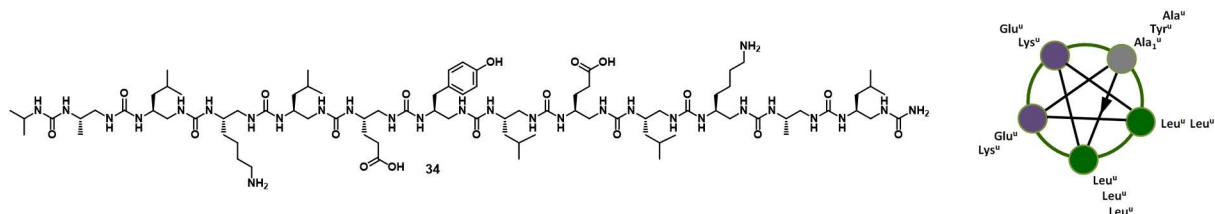
Natywna ESI-MS pokazała, że pik odpowiadający strukturze heksamerycznej związku **31**, ma najwyższą intensywność spośród wszystkich pików obserwowanych dla struktur multimerycznych (**Rysunek 10a**). Celem potwierdzenia, że dane uzyskane za pomocą ESI-MS wynikają z tworzenia struktury IV-rzędowej, a nie tylko jonów klasterowych, został otrzymany związek **32** (kontrola negatywna), w którym centralna reszta Leu^u, została podstawiona Asn^u (**Rysunek 10c**). Zgodnie z założeniem związek **32**, nie powinien organizować się do struktury IV-rzędowej, ze względu na brak hydrofobowego łańcucha bocznego centralnej reszty Leu^u koniecznego do stabilizacji kapsuły. Rzeczywiście, za pomocą ESI-MS nie udało się zaobserwować prawie żadnych pików, poza pikiem odpowiadającym pojedynczej helisie (**Rysunek 10c**). Dodatkowo, nie udało się również otrzymać kryształów związku **32**.

Eksperymenty CD przeprowadzone dla związku **31** także potwierdziły tworzenie kapsuł. Z literatury wiadomo,³¹ że im wyższe stężenie związku, który potencjalnie może organizować się do struktur wyższego rzędu, tym eliptyczność molowa powinna być wyższa, co zaobserwowaliśmy dla związku **31** (**Rysunek 10b**). Kolejnym otrzymanym związkiem była pochodna **33** (**Rysunek 10d**), w której reszta Leu^u na *N*-końcu została podstawiona resztą Ser^u. Okazało się, że związek ten, podobnie jak związek **31**, ulegał samoorganizacji do heksamerycznej kapsuły, jednak stabilność tej struktury, badana m.in. za pomocą CD, była nieco niższa niż dla związku **31**.



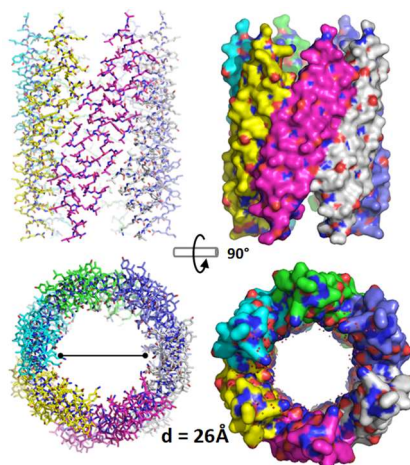
Rysunek 10. Badania samoorganizacji helis w środowisku wodnym: a) widmo ESI-MS foldameru **31**; b) pomiary CD w zależności od stężenia dla związku **31**; c) sekwencja foldameru **32** (z zaznaczonym miejscem modyfikacji) oraz widmo ESI-MS; d) sekwencja foldameru **33** (z zaznaczonym miejscem modyfikacji) oraz nałożenie struktury krystalicznej związków **31** i **33**

Oprócz modyfikacji hydrofobowego fragmentu helisy (związki **32** i **33**) wprowadziliśmy także modyfikacje w naładowanym fragmencie hydrofilowym. Otrzymałam związek **34** różniący się od związków opisanych powyżej wzajemnym rozłożeniem reszt naładowanych i hydrofobowych (**Rysunek 11**). Okazało się, że taka modyfikacja struktury I-rzędowej prowadziła do zupełnie innego sposobu samoorganizacji (**Rysunek 12**).



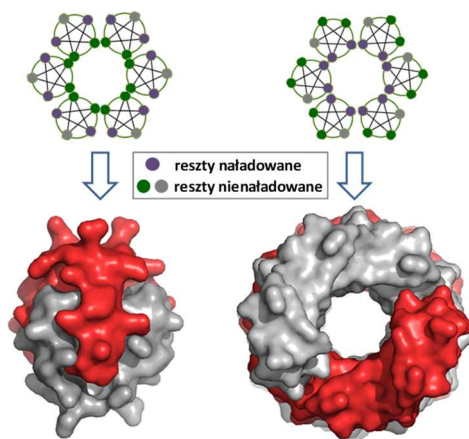
Rysunek 11. Sekwencja związku **34**

Struktury krystaliczne związku **34** pokazały, że tworzyły się superhelikalne kanały (złożone z 6 superhelis), w których wewnątrz znajdowały się reszty naładowane, a zewnątrz składało się z reszt hydrofobowych. Wnętrze kanałów wypełnione było cząsteczkami wody.



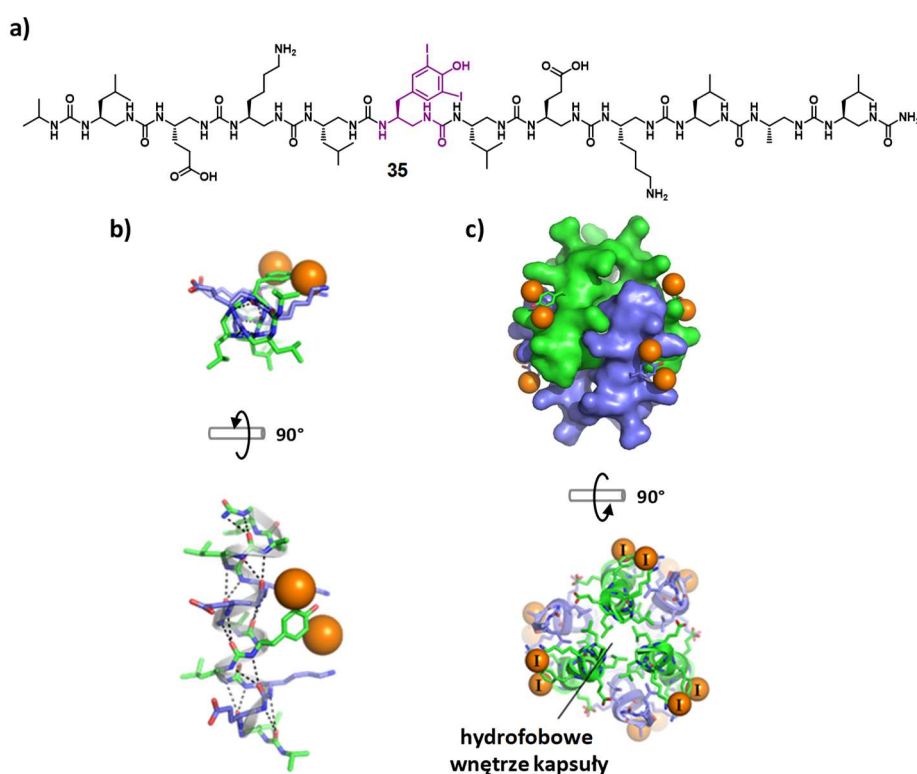
Rysunek 12. Superhelikalne kanały tworzone przez oligomocznik **34**

Widać zatem, że odpowiednio dobierając strukturę I-rzędową, można sterować sposobem samoorganizacji poszczególnych molekuł. Dodatkowo, niewielkie zmiany w sekwencji, podstawienia lub przesunięcia poszczególnych reszt, prowadzą albo do utraty zdolności samoorganizacji, albo do tworzenia zupełnie różnych struktur wyższego rzędu (kapsuły lub kanały, **Rysunek 13**).



Rysunek 13. Zależność struktury IV-rzędowej od struktury I-rzędowej

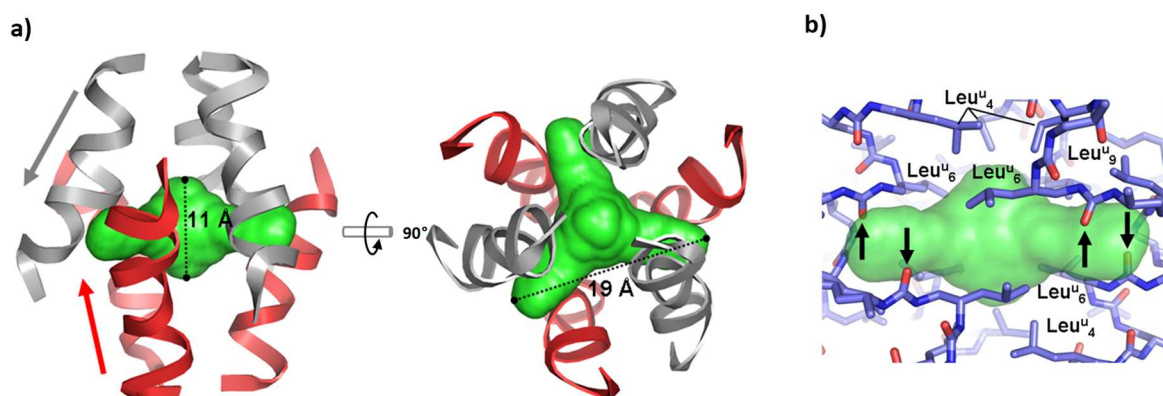
Wykorzystując fakt, że foldamer **31** tworzy kapsuły (**Rysunek 9**) przystąpiliśmy do kolejnego etapu badań, który polegał na próbie zamknięcia cząsteczki gościa we wnętrzu kapsuły. Badania dotyczące tego zagadnienia są przedmiotem pracy **H5**, a po części także **H4**. Jako, że wnętrze kapsuły jest hydrofobowe (łańcuchy boczne reszt Leu^U), początkowo jako cząsteczkę gościa wybraliśmy I₂ (praca **H4**). Badania rozpoczęliśmy od prób krystalizacji, do mieszaniny krystalizacyjnej dodając roztwór jodu (roztwór związku **31** o stężeniu 10 mg/ml, 15% izopropanol, 100mM bufor CH₃COONa o pH 4,6, 200mM CaCl₂ oraz 0,75mM I₂). Okazało się, że I₂ nie ulegał zamknięciu we wnętrzu kapsuły, ale przebiegała reakcja chemiczna ze związkiem **31**. Pierścień aromatyczny reszty mocznikowej Tyr^U ulegał w warunkach krystalizacji (*in situ*) reakcji podwójnej substytucji elektrofilowej w pozycjach *orto* w stosunku do grupy hydroksylowej. Prowadziło to do otrzymania związku **35** (**Rysunek 14a**). Kolejno, okazało się, że podstawienie w pierścieniu aromatycznym Tyr^U nie ma wpływu na strukturę II-rzędową i związek **35** związał się w helisę typu 2.5 (**Rysunek 14b**). Dodatkowo helisy te organizowały się w kapsułę niemal identyczną do tej, otrzymanej dla związku **31** (**Rysunek 14c**). Pierścień Tyr^U znajduje się na zewnątrz kapsuły, dlatego chemiczna ingerencja w tym miejscu nie miała negatywnych skutków jeśli chodzi o proces samoorganizacji do struktury IV-rzędowej.



Rysunek 14. Foldamer **35**: a) sekwencja związku, resztę di-jodo Tyr^U zaznaczono kolorem fioletowym; b) pojedyncza helisa, atomy jodu zaznaczono kolorem pomarańczowy; c) kapsuła utworzona przez 6 helis związku **35**

W pracy **H5** udało nam się udowodnić, że możliwe jest wprowadzenie gościa do kapsuły oligomocznikowej. W literaturze znane są przykłady kapsuł foldamerowych wiążących cząsteczki gościa, najczęściej jednak są to pojedyncze helisy, które „zawijają” się na gościu działającym jak templat.³²⁻³⁵ Do badań kompleksowania wykorzystaliśmy ponownie związek **31**. Dokładna analiza wnętrza otrzymanej kapsuły pokazała, że składa się z niemal sferycznej komory i trzech „tuneli” ułożonych pod kątem 120° (**Rysunek 15a**). Mieszanina do krystalizacji zawierała w składzie izopropanol. Udało się otrzymać kryształy z cząsteczkami tego alkoholu, jako gościa, we wnętrzu

kapsuły. Wnętrze to, jak już wspomniałam kilkakrotnie powyżej, jest hydrofobowe, jednak w każdym „tunelu” znajdują się dwie grupy karbonylowe reszt Leu^u, potencjalnie będące akceptorami wiązań wodorowych (**Rysunek 15b**).



Rysunek 15. Kapsuła złożona z 6 helis związku **31**: a) z zaznaczeniem pustej przestrzeni w środku; b) reszty Leu^u (czarnymi strzałkami zaznaczono potencjalne miejsca akceptorowe wiązań wodorowych)

W kryształach związku **31** z izopropanolem, grupy -OH cząsteczki alkoholu tworzą wiązania wodorowe z tlenem grupy karbonylowej Leu^u, a łańcuch alifatyczny umieszczony jest w „tunelu”. Stosunek oligomocznika do alkoholu wynosił 2:1. Te wstępne badania zachęciły nas do sprawdzenia, jak będą zachowywać się alkohole o dłuższych, nierozgałęzionych łańcuchach alifatycznych. Badania prowadziliśmy wobec odpowiednich alkoholi w roztworze za pomocą metody CD oraz w ciele stałym przy użyciu RAS. Za pomocą CD wyznaczyliśmy tzw. temperatury topnienia, pokazujące trwałość danej struktury przestrzennej (**Tabela 3**). Im wyższa temperatura topnienia, tym bardziej stabilna struktura.

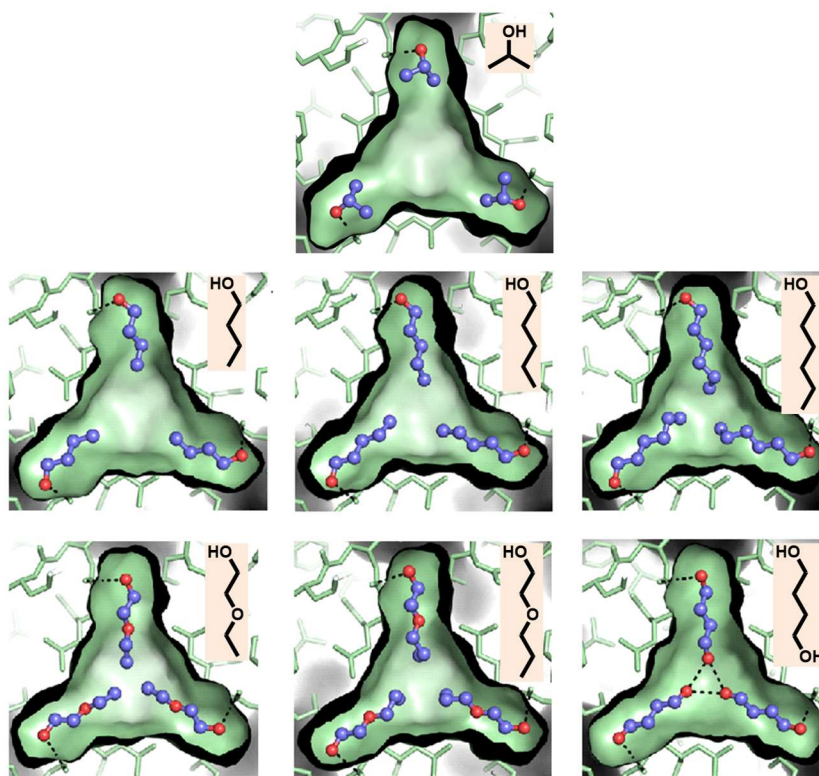
Tabela 3. Wpływ gościa na stabilność i objętość kapsuły

gość	T _m (°C) ^a	ΔT _m (°C)	objętość wnętrza kapsuły (Å ³) ^b
bez gościa	41,5	-	495
izopropanol	46,4	+4,9	513
1-butanol	50,8	+9,3	517,4
1-pentanol	54,9	+13,4	526,4
1-heksanol	53	+11,5	543,0
2-etoksyetanol	44,5	+3,0	502,9
2-propoksyetanol	47,1	+5,6	484,8
1,4-butanodiol	43,6	+2,1	500,5

^a wyznaczona za pomocą CD, alkohole w stężeniu 1% (v/v)

^b wyznaczona ze struktur krystalicznych

Ponadto, udało się otrzymać kryształy związku **31** ze wszystkimi badanymi alkoholami (**Rysunek 16**). Okazało się, że objętość kapsuły zmieniała się w zależności od wielkości gościa i dla 1-heksanolu była największa (**Tabela 3**). Oprócz prostych alkoholi alifatycznych, zbadaliśmy także wiązanie alkoholi z polarnymi grupami w łańcuchu. Cząsteczki tych alkoholi interkalowały się do wnętrza kapsuł, a w przypadku 1,4-butanodiolu dało się zaobserwować także wiązania wodorowe między poszczególnymi cząsteczkami gościa (**Rysunek 16**).

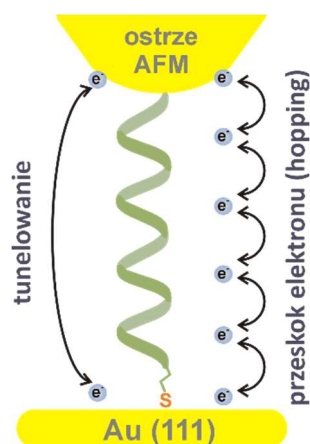


Rysunek 16. Struktury krystaliczne kompleksów kapsuła-gość (fragmenty kapsuły ze związanym gościem)

Badania opisane w pracy **H5** pokazują, że możliwe jest „wypełnienie” kapsuły utworzonej przez helisy oligomocznikowe cząsteczkami gościa i prowadzi to jedynie do niewielkich zmian wyjściowej struktury IV-rzędowej. Ponadto, uzyskane wyniki w przyszłości przyczynić się mogą do projektowania nowych systemów dostarczania leków czy też nanoreaktorów do przeprowadzania reakcji chemicznych.

Foldamery jako funkcjonalne mimetyki peptydów i białek

Jak wspomniałam na początku tego autoreferatu, alifatyczne *N,N'*-dipodstawione oligomoczniki związają się w helisę typu 2.5. Czyni to z nich atrakcyjne modele do badania właściwości fizykochemicznych związanych ze strukturą drugorzędową molekuł. Jedną z takich właściwości jest zjawisko transportu elektronów. Proces ten jest jedną z podstawowych reakcji w przyrodzie.³⁶ Odgrywa kluczową rolę w procesach fotosyntezy, oddychaniu komórkowym, reakcjach enzymatycznych, aktywacji leków i wielu innych. Mechanizm tego procesu cały czas nie jest do końca poznany dla białek natywnych, dlatego szuka się prostszych układów modelowych do jego badania. Badania dowiodły, że peptydy są doskonałymi mediatorami transportu elektronów.³⁷⁻⁴² Okazało się również, że efektywność tego procesu może być modulowana za pomocą zmian struktury II-rzędowej mediatora, a α -helisa jest jednym z najbardziej wydajnych elementów strukturalnych uczestniczących w procesie transportu elektronów. Obecnie uważa się, że proces ten w peptydach zachodzi według dwóch mechanizmów.⁴³ Jeden z nich to tunelowanie, a więc jednoetapowy „przeskok” elektronu, drugi to tzw. hopping, czyli wieloetapowy „przeskok” elektronu między sąsiadującymi jednostkami (**Rysunek 17**, na przykładzie badań za pomocą AFM).

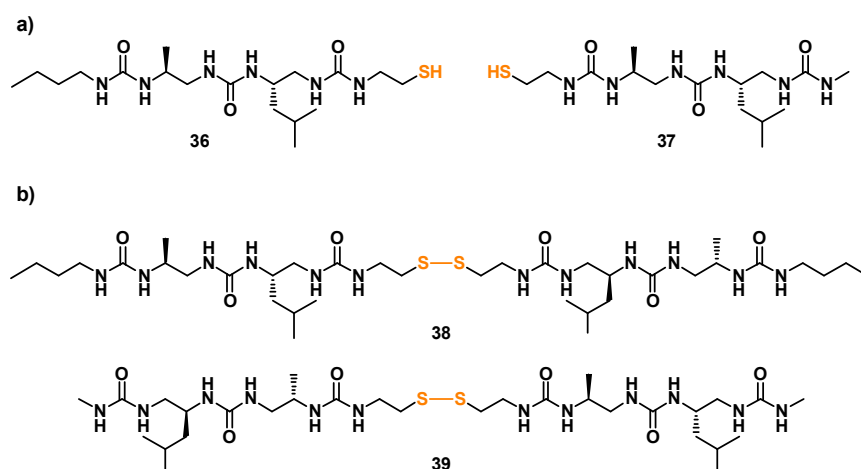


Rysunek 17. Postulowane mechanizmy transportu elektronów przez helikalne mediatory na przykładzie badań za pomocą AFM

Ponadto teoretyczne przewidywania sugerują,⁴⁴ że dla helikalnych cząsteczek wraz ze wzrostem długości łańcucha, mechanizm zmienia się z tunelowania na hopping. Teoria ta była bardzo trudna do zweryfikowania dla α -peptydów, ze względu na dużą labilność konformacyjną związków zbudowanych z mniej niż 10 reszt aminokwasowych. Z tego powodu uznałam, że foldamery oligomocznikowe będą doskonałymi związkami modelowymi do udowodnienia (lub obalenia) teorii. Badania nad tym zagadnieniem są opisane w pracy **H6** oraz **H9**, a także są przedmiotem prowadzonego przeze mnie projektu Opus.

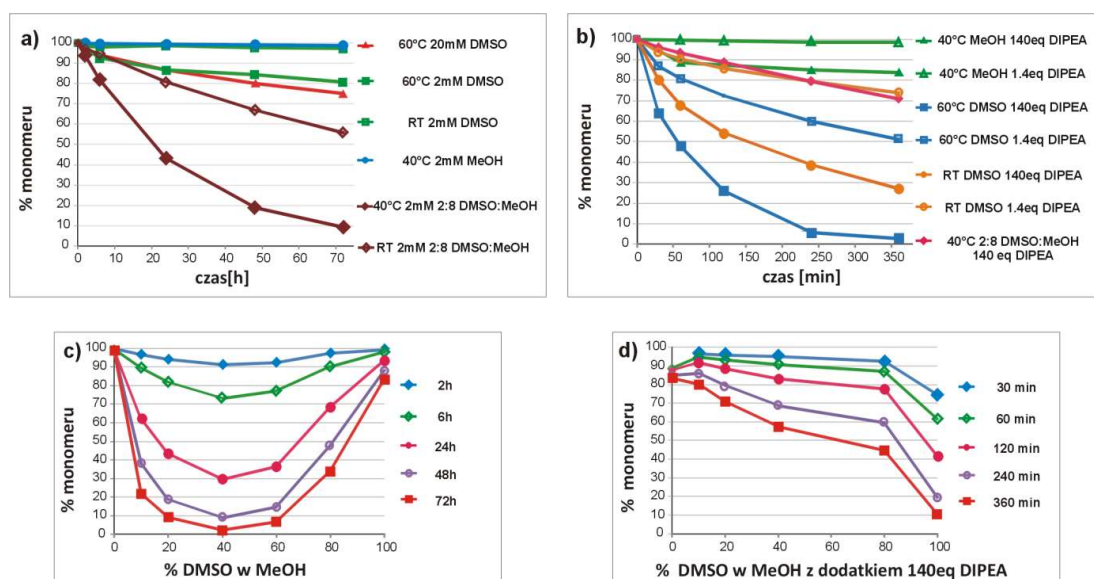
Proces transportu elektronów można badać różnymi metodami, jednak pierwszy etap polega zwykle na utworzeniu monowarstwy (*SAM* – *ang. self assembled monolayer*) na powierzchni przewodzącej, najczęściej złota. Cząsteczka tworząca monowarstwę musi więc posiadać tzw. grupę kotwiczącą, najczęściej jest to grupa tiolowa $-SH$. W przypadku badanych przeze mnie związków, do wprowadzenia tej grupy wybrałam cysteaminową jednostkę mocznikową. Struktury związków badanych pod kątem transportu elektronów w pracy **H6** przedstawię w dalszej części tego autoreferatu.

W trakcie syntezy tych związków zauważyłam, że grupa tiolowa ulega utlenianiu do mostków disulfidowych, a szybkość tej reakcji silnie zależy od warunków. Postanowiłam głębiej zbadać to zagadnienie, co zaowocowało powstaniem pracy **H8**.



Rysunek 18. a) Oligomoczniki z grupą tiolową badane pod kątem utleniania; b) Odpowiednie dimery z wiązaniem disulfidowym

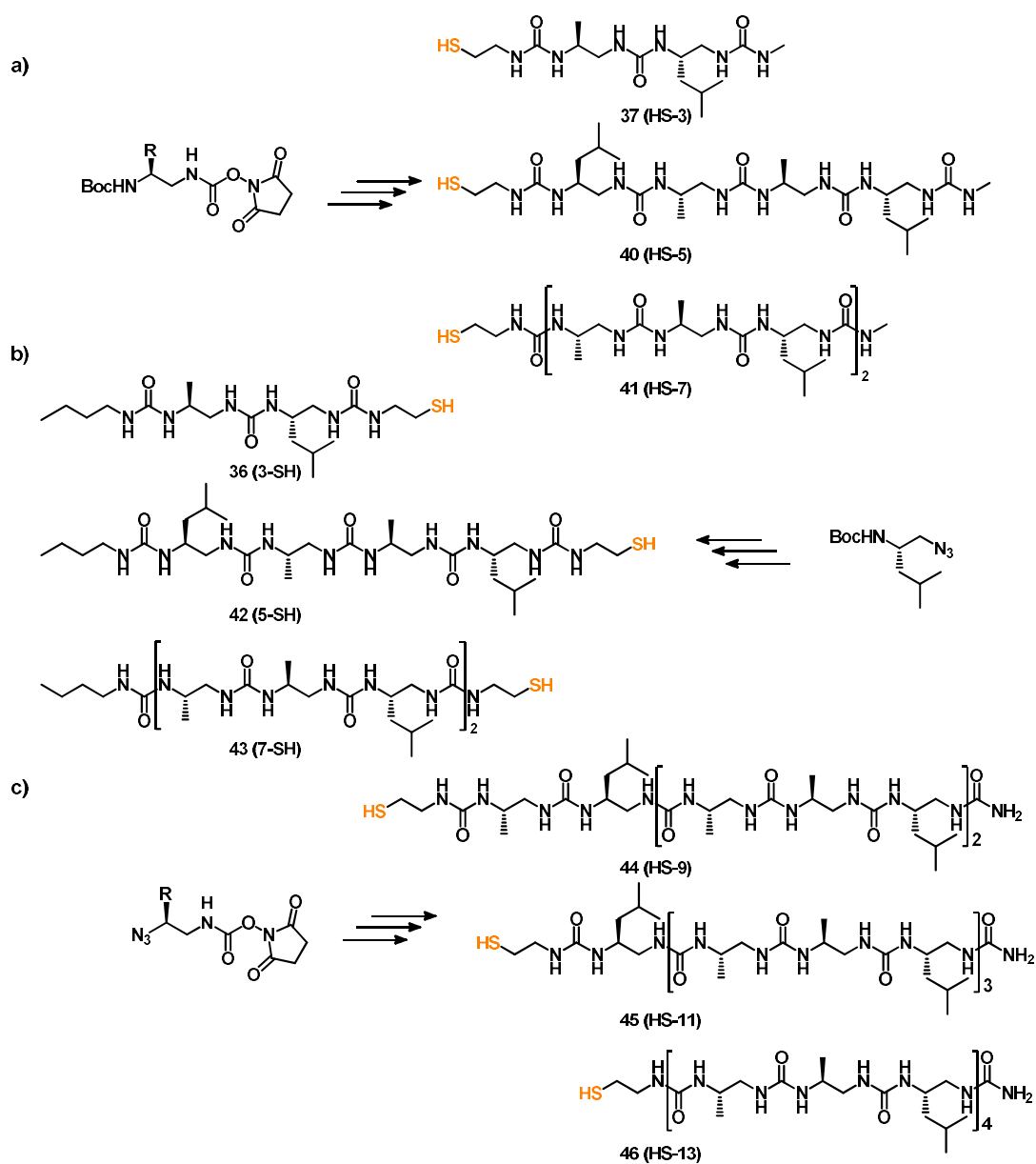
Do badania wpływu warunków na szybkość utleniania pochodnych tiolowych wybrałam krótkie oligomoczniki, zawierające grupę -SH na C- lub N-końcu (**Rysunek 18a**, odpowiednio związków **36** i **37**). Okazało się, że szybkość reakcji utleniania w zasadzie nie zależy od położenia grupy -SH w łańcuchu głównym (N- lub C-koniec), natomiast duży wpływ na szybkość ma temperatura reakcji i rozpuszczalnik. Postęp reakcji utleniania badałam za pomocą metody RP-HPLC. Do badań wybrałam dwa rozpuszczalniki, CH₃OH i DMSO, często stosowane także do badań NMR. Reakcję utleniania badałam zawsze w tym samym stężeniu (2mM) w temperaturze pokojowej, a także w 40 °C i 60 °C (**Rysunek 19**). Okazało się, że reakcja w CH₃OH była bardzo wolna bez względu na temperaturę. Podobne rezultaty zaobserwowałam w DMSO w temperaturze pokojowej. Po 72h w próbce obecne było mniej niż 5% dimerów, odpowiednio **38** i **39** (**Rysunek 18**). Po tym samym czasie w temperaturze 60°C, zawartość dimeru wzrosła do 20%. Dla próbek rozpuszczonych w DMSO zbadałam także wpływ stężenia, porównując próbki, w których początkowe stężenie monomeru było 2 i 20mM. Badania stężeniowe prowadziłam w 60 °C. Okazało się, że stężenie ma niewielki wpływ na szybkość reakcji. Dodatkowo, zbadałam także wpływ obecności zasady (amina III-rzędowa, DIPEA) na szybkość reakcji tworzenia mostków disulfidowych. Z literatury wiadomo, że obecność zasady przyspiesza reakcję tworzenia mostków disulfidowych, ze względu na tworzenie silnie nukleofilowych tiolanów.⁴⁵ Reakcję badałam dla niewielkiego nadmiaru ilości zasady (1,4 ekw.) oraz dla dużego jej nadmiaru (140 ekw.). Im więcej aminy w środowisku reakcji, tym utlenianie było szybsze (**Rysunek 19b**). Dodatkowo, w DMSO reakcja zachodziła dużo szybciej niż w CH₃OH. Ponieważ szybkości reakcji w CH₃OH i DMSO znacznie się różniły, postanowiłam sprawdzić przebieg utleniania w mieszaninie tych dwóch rozpuszczalników, zwiększając udział DMSO w stosunku do CH₃OH.



Rysunek 19. Wpływ warunków reakcji na szybkość dimeryzacji związku **36**: a) CH₃OH lub/i DMSO w różnych temperaturach; b) CH₃OH lub DMSO w różnych temperaturach z dodatkiem DIPEA; c) DMSO w CH₃OH w 40°C; d) DMSO w CH₃OH z dodatkiem DIPEA w 40°C

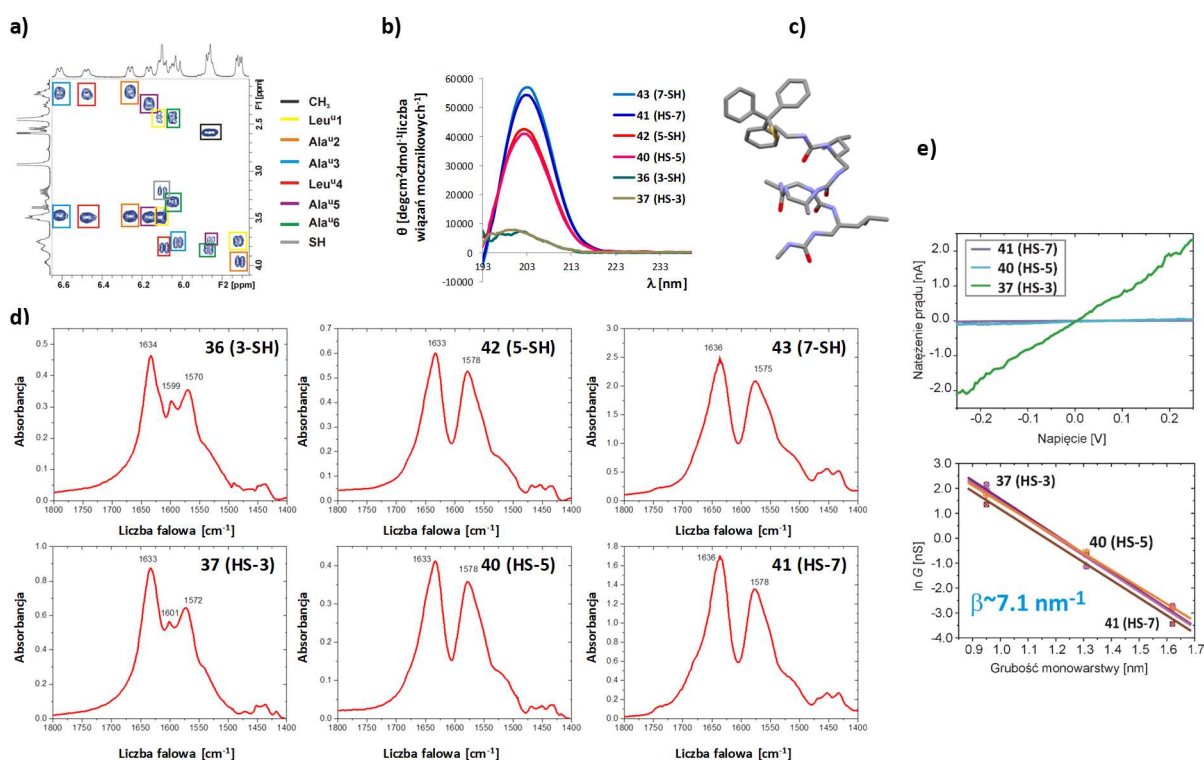
Otrzymane wyniki były zaskakujące. Okazało się, że szybkość dimeryzacji silnie zależy od ilości DMSO i reakcja była najszybsza, kiedy stosunek objętościowy DMSO:CH₃OH wynosił 2:3 (**Rysunek 19c**). Kiedy jednak do mieszaniny reakcyjnej dodałam 140 ekw. DIPEA, zawartość dimeru w mieszaninie rosta stopniowo wraz ze wzrostem zawartości DMSO (**Rysunek 19d**). Otrzymane w pracy **H8** wyniki pozwalają m. in. na dobór warunków do przeprowadzania pomiarów fizykochemicznych, np. NMR związków z grupą tiolową, tak by uniknąć niechcianej dimeryzacji. Z drugiej strony, jeśli celem

syntetycznym jest otrzymanie dimeru, na podstawie tych wyników można dobrać warunki, w których reakcja będzie najszybsza. Badania przeprowadzone w trakcie przygotowywania pracy **H8** pozwoliły mi uniknąć niechcianej dimeryzacji przy syntezie związków będących przedmiotem pracy **H6**. Główny cel pracy **H6** polegał na sprawdzeniu, czy foldamery oligomocznikowe mogą być stosowane jako mediatory transportu elektronów i jaki jest mechanizm tego procesu. Zsyntezowałam więc dwie serie oligomerów różniące się położeniem reszty cysteaminowej (na C- lub N-końcu łańcucha głównego foldameru). Syntezę oligomerów prowadziłam w roztworze, stosując karbaminianowe bloki budulcowe, w których grupa aminowa zabezpieczona była grupą Boc. W każdej serii otrzymałam trzy związki (**Schemat 5a,b**, symbole związków pokazują położenie grupy tiolowej oraz całkowitą liczbę wiązań mocznikowych) różniące się liczbą reszt: dimer (**37 HS-3** oraz **36 3-SH**), tetramer (**40 HS-5** oraz **42 5-SH**) i heksamer (**41 HS-7** oraz **43 7-SH**).



Schemat 5. Oligomoczniki do badań transportu elektronów i substraty wyjściowe: a) z grupą tiolową na N-końcu (synteza w roztworze); b) z grupą tiolową na C-końcu (synteza w roztworze); c) z grupą tiolową na N-końcu (synteza na nośniku stałym w obecności promieniowania MW)

Wszystkie związki zostały przebadane szeregiem metod fizykochemicznych pod kątem przyjmowanej przez nie konformacji (**Rysunek 20a-d**). Badania za pomocą NMR (porównanie różnic w przesunięciach chemicznych diastereotopowych protonów grup α -CH₂, (**Rysunek 20a**)), a zwłaszcza dichroizmu kołowego pozwoliły określić konformację związków w roztworze. Tetramery i heksamery dawały charakterystyczny wygląd widma CD, z silnym efektem Cottona przy $\lambda = 202$ - 203 nm, natomiast dla dimerów pasmo to miało bardzo niską intensywność (**Rysunek 20b**). Świadczy to o dużej labilności konformacyjnej najkrótszych oligomoczników. Dodatkowo, porównanie widm CD dla tetrameru i heksameru potwierdza zależność stabilności struktury II-rzędowej od długości oligomeru.



Rysunek 20. Badania konformacyjne oraz badania transportu elektronów krótkich oligomoczników: a) fragment widma COSY związku **41**, pokazujący różnice w przesunięciu chemicznym protonów grup α -CH₂; b) widma CD; c) struktura RAS pochodnej związku **40** z grupą Trt; d) widma FTIR; e) przykładowe zależności prądowo-napięciowe oraz zależność przewodnictwa od grubości monowarstwy

Struktura w ciele stałym została zbadana za pomocą metody FTIR (**Rysunek 20d**). Heliakalne foldamery oligomocznikowe, podobnie jak peptydy, dają charakterystyczny wygląd widma IR.^{46,47} Dwa silne pasma pojawiają się przy 1630 - 1638 cm⁻¹ (tzw. *urea I*) oraz 1571 - 1578 cm⁻¹ (tzw. *urea II*). Obecność pasm w tym zakresie świadczy o przyjmowaniu przez oligomoczniki helisy typu 2.5. Jak łatwo można zauważyć widma FTIR tetramerów i heksamerów są niemalże identyczne, natomiast na widmach najkrótszych oligomerów obecne jest dodatkowe pasmo przy ok. 1600 cm⁻¹, które świadczyć może o większej labilności konformacyjnej i izomeryzacji *cis-trans* poszczególnych wiązań mocznikowych (**Rysunek 20d**). Dla tetrameru Trt-S-5 (pochodna związku **40** z zabezpieczeniem trytylowym) otrzymałam monokrystały, odpowiednie do badań RAS, które dodatkowo potwierdziły strukturę heliakalną w ciele stałym (**Rysunek 20c**). Z przedstawionych danych dotyczących badań konformacyjnych wynika, że położenie reszty cysteaminowej (N- lub C-koniec oligomeru) nie ma wpływu na helikalność uzyskanych związków. Po potwierdzeniu struktury II-rzędowej, wszystkie foldamery oligomocznikowe zostały poddane procesowi samoorganizacji na powierzchni złota, a następnie przebadane pod kątem transportu elektronów za pomocą Mikroskopii Sił Atomowych

(AFM). Okazało się, że transport elektronów przez foldamery oligomocznikowe zbudowane z maksymalnie 6 reszt mocznikowych zachodzi zgodnie z mechanizmem tunelowania. Świadczy o tym wartość współczynnika tunelowania β , wynosząca $\sim 7 \text{ nm}^{-1}$ (**Rysunek 20e**). Pomiar AFM standardowo wykonywane były przy sile nacisku sondy na monowarstwę równą 0,5 nN. Chcąc sprawdzić elastyczność monowarstwy (a także stabilność struktury II-rzędowej), stopniowo zwiększaliśmy siłę nacisku i badaliśmy przewodnictwo tej monowarstwy. Okazało się, że do siły nacisku ok. 3 nN, przewodnictwo rosło, co było zgodne z oczekiwaniami, bo zmniejszał się dystans między ostrzem AFM a kontaktem metalicznym (helisa, niczym sprężyna, ulegała kurczeniu i/lub zmieniał się kąt nachylenia), w przedziale 4-5 nN przewodnictwo utrzymywało się na stałym poziomie, po czym ulegało nieregularnym zmianom przy sile nacisku sondy powyżej 5 nN. Spowodowane to było najprawdopodobniej zmianami w strukturze monowarstwy i zaburzeniem struktury heliakalnej oligomoczników ją tworzących.

Badania nad przewodnictwem oligomoczników o dłuższym łańcuchu głównym (do 12 reszt mocznikowych) są przedmiotem kolejnej publikacji **H9**. Trzy związki **44-46** (oktamer **HS-9**, dekamer **HS-11** i dodekamer **HS-13**) zostały otrzymane na nośniku stałym w obecności mikrofal, a reszta cysteaminowa dołączona była do N-końca (δ^+ biegun dipola) oligomeru (**Schemat 5c**).

Tabela 4. Porównanie teoretycznych długości helis oligomocznikowych z grubością tworzonych przez nie monowarstw

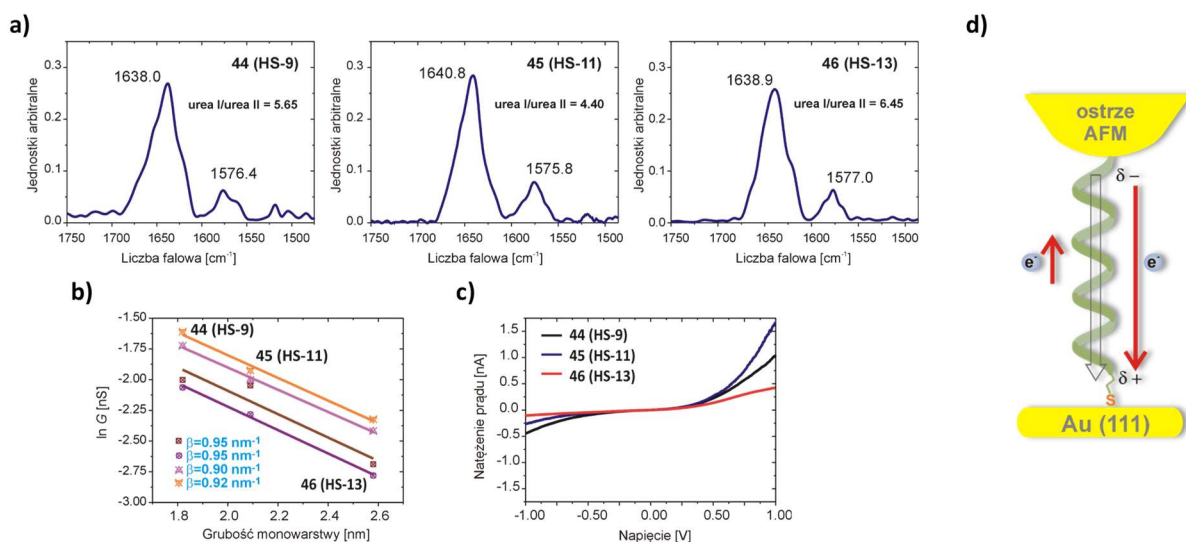
Związek	Długość helisy oligomocznikowej [nm] ^a	Grubość monowarstwy przy nacisku równym 0,5 nN [nm] ^b
44 (HS-9)	2,02	1,82±0,2
45 (HS-11)	2,43	2,09±0,33
46 (HS-13)	2,84	2,58±0,35

^a długość helis została określona zakładając, że związki te zwijają się w helisę typu 2.5 oraz, że 2,48 reszt tworzy jeden zwrot, co odpowiada 5,03Å na zwrot.¹⁶ Dla łącznika cysteaminowego przyjęto długość 4 Å.

^b grubość monowarstw została określona za pomocą metody AFM

Tak samo, jak w przypadku związków będących przedmiotem publikacji **H6**, struktura II-rzędowa (helisa typu 2.5) foldamerów **44-46** została potwierdzona za pomocą widm dichroizmu kołowego oraz FTIR. Dodatkowo, wykonane zostały także widma PM IRRAS (Polarization Modulation-Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy, **Rysunek 21a**). Dzięki tej metodzie pokazaliśmy, że struktura II-rzędowa badanych związków nie zmienia się po utworzeniu monowarstwy i nadal pozostaje helikalna. Ponadto porównanie stosunku pola powierzchni pasm *urea I* / *urea II* pozwala wyciągnąć wniosek, że helisy oligomocznikowe ustawiają się niemalże prostopadle w stosunku do powierzchni złota (im większa różnica w intensywności obu pasm, tym bardziej pionowe ustawienie związków w stosunku do powierzchni).⁴⁸⁻⁵⁰ Dodatkowo potwierdza to porównanie grubości monowarstwy z teoretyczną długością helis poszczególnych związków (**Tabela 4**). Związki **44-46** zostały następnie przebadane pod kątem transportu elektronów za pomocą metody AFM i wyznaczony został współczynnik $\beta = 0.92-0.95 \text{ nm}^{-1}$ (**Rysunek 21b**). Porównanie wartości β dla oligomoczników krótkich (2-6 reszt mocznikowych, praca **H6**) i długich (8-12 reszt mocznikowych, praca **H9**) pozwala stwierdzić, że mechanizm transportu elektronów zmienia się wraz ze wzrostem długości łańcucha głównego, a zmiana z tunelowania na hopping następuje, gdy grubość monowarstwy wynosi ok. 1,8 - 2,0 nm. Jednak najbardziej interesującą cechą oligomoczników **44-46** związaną z właściwościami

elektrycznymi otrzymanych z nich monowarstw zaobserwowaliśmy przy wysokich napięciach ($\pm 1.0V$, **Rysunek 21c**). Okazało się, że wydajność transportu elektronów w foldamerach oligomocznikowych zależy od kierunku przepływu elektronów, a natężenie prądu płynącego przez nie przy dodatnim napięciu (zgodnie z kierunkiem dipola) jest znacznie wyższe niż przy ujemnym napięciu (**Rysunek 21d**). Różnice te wyraża tzw. współczynnik rektyfikacji (RR), czyli stosunek natężenia prądu przy dodatnim i ujemnym napięciu.



Rysunek 21. a) Widma PM IRRAS oligomoczników **44-46** (zakres pasm typu *urea I* i *urea II*); b) Zależność przewodnictwa od grubości monowarstwy; c) Przykładowe zależności prądowo-napięciowe dla wysokich napięć; d) Graficzne przedstawienie zależności wydajności transportu elektronów od kierunku momentu dipolowego

Wyznaczone współczynniki rektyfikacji są znacznie wyższe (3-4 razy) niż dla peptydów o tej samej długości łańcucha. Świadczy to o tym, że helikalne oligomoczniki w przyszłości mogą być doskonałymi kandydatami do konstruowania nowych molekularnych diod, a także mogą znaleźć zastosowanie do projektowania nowych materiałów dla nanoelektroniki.

Mam nadzieję, że z powyższego opisu widać, że foldamery oligomocznikowe i ich pochodne stanowią bardzo atrakcyjne naukowo strukturalne jak i funkcjonalne mimetyki peptydów i białek.

Jestem pewna, że zainteresowanie tymi związkami będzie rosnąć, a oligomoczniki znajdą zastosowanie np. jako potencjalne systemy dostarczania leków czy materiały o nowych właściwościach.

Za swoje najważniejsze osiągnięcia uważam:

- opracowanie wydajnej metody otrzymywania karbaminianowych bloków budulcowych z grupą $-N_3$ jako zamaskowaną grupą aminową (N_3 -BB). Metoda ta ma zastosowanie szczególnie przy otrzymywaniu mocznikowych bloków budulcowych z alifatycznymi łańcuchami bocznymi
- opracowanie i optymalizację metody wprowadzania grupy guanidyniowej do łańcucha głównego foldameru. Związkiem wyjściowym do reakcja guanidynyacji jest foldamer z grupą tiomocznikową i reakcja ta zachodzi z bardzo dobrymi wydajnościami, także dla oligomerów już zwiniętych w helisę

- zaprojektowanie i otrzymanie pierwszych wodorozpuszczalnych foldamerów oligomocznikowych zdolnych do samoorganizacji do struktur wyższego rzędu. Niewielkie zmiany w strukturze I-rzędowej badanych związków (wzajemne „przesunięcia” reszt hydrofobowych i hydrofilowych) prowadziły do zupełnie różnych struktur IV-rzędowych (zamknięte kapsuły vs. otwarte kanały)
- zaprojektowanie i otrzymanie foldamerów oligomocznikowych jako mediatorów transportu elektronów. Okazało się, że oligomoczniki, zdolne do samoorganizacji na powierzchni w postaci monowarstw, wykazują szereg bardzo ciekawych właściwości jeśli chodzi o stabilność oraz przewodnictwo tych monowarstw.

Literatura

- ¹ S.H. Gellman, *Acc. Chem. Res.*, **1998**, 31, 173-180.
- ² S. Hecht, I. Huc, *Foldamers: Structure, Properties and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**
- ³ W.S. Horne, S.H. Gellman, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, 41, 1399-1408.
- ⁴ G. Guichard, I Huc, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 5933-5941.
- ⁵ S. H. Yoo, H.-S. Lee, *Acc. Chem. Res.*, **2017**, 50, 832–841.
- ⁶ A. Violette, M. C. Averlant-Petit, V. Semetey, C. Hemmerlin, R. Casimir, R. Graff, M. Marraud, J.-P. Briand, D. Rognan, G. Guichard, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2156-2164.
- ⁷ L. Fischer, P. Claudon, N. Pendem, E. Miclet, C. Didierjean, E. Ennifar, G. Guichard, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1067-1070.
- ⁸ K. Burgess, J. Ibarzo, D. S. Linthicum, D. H. Russell, H. Shin, A. Shitangkoon, R. Totani, A. J. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 1556-1564.
- ⁹ J.-M. Kim, Y. Bi, S. J. Paikoff, P. G. Schult, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 5305-5308.
- ¹⁰ A. Boeijen, J. van Ameijde, R. M. J. Liskamp, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 8454-8462.
- ¹¹ Y.-Y. Chen, L.-T. Chang, H.-W. Chen, C.-Y. Yang, L.-W. Hsin, *ACS Comb. Sci.*, **2017**, 19, 131–136.
- ¹² G. Guichard, V. Semetey, C. Didierjean, A. Aubry, J.-P. Briand, M. Rodriguez, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 8702-8705.
- ¹³ E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.*, **2007**, 9, 3797-3800.
- ¹⁴ P. Claudon, A. Violette, K. Lamour, M. Decossas, S. Fournel, B. Heurtault, J. Godet, Y. Mély, B. Jamart-Grégoire, M.-C. Averlant-Petit, J.-P. Briand, G. Duportail, H. Monteil, G. Guichard, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 333–336.
- ¹⁵ N. Pendem, Y.R. Nelli, C. Douat, L. Fischer, M. Laguerre, E. Ennifar, B. Kauffmann, G. Guichard, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 4147–4151.
- ¹⁶ Y. R. Nelli, L. Fischer, G.W. Collie, B. Kauffmann, G. Guichard, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **2013**, 100, 687–697.
- ¹⁷ Y. R. Nelli, S. Antunes, A. Salaün, E. Thinon, S. Massip, B. Kauffmann, C. Douat, G. Guichard, *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 2870 – 2880
- ¹⁸ K. Ramadas, N. Srinivasan, *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 2841-2844.
- ¹⁹ E. J. Iwanowicz, S. H. Watterson, C. Liu, H. H. Gu, T. Mitt, K. Leftheris, J. C. Barrish, C. A. Fleener, K. Rouleau, N. Z. Sherbina, D. L. Hollenbaugh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 2931–2934.
- ²⁰ C. Qin, J. Li, E. Fan, *Synlett*, **2009**, 15, 2465-2468.
- ²¹ V. P. Taori, H. Lu, T. M. Reineke, *Biomacromolecules*, **2011**, 12, 2055–2063.
- ²² P. Burkhard, J. Stetefeld, S. V. Strelkov, *Trends Cell Biol.*, **2001**, 11, 82–88.
- ²³ E. Moutevelis, D. N. Woolfson, *J. Mol. Biol.*, **2009**, 385, 726–732.
- ²⁴ H. Robson Marsden, A. Kros, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 2988–3005.
- ²⁵ D. S. Daniels, E. J. Petersson, J. X. Qiu, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1532–1533.
- ²⁶ J. L. Goodman, E. J. Petersson, D. S. Daniels, J. X. Qiu, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 14746–14751.
- ²⁷ M. A. Molski, J. L. Goodman, F.-C.; Chou, D. Baker, R. Das, A. Schepartz, *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 319 – 324.
- ²⁸ W. S. Horne, J. L. Price, J. L. Keck, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 4178–4180.
- ²⁹ M. W. Giuliano, W. S. Horne, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 9860–9861.
- ³⁰ W. S. Horne, J. L. Price, S. H. Gellman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, 105, 9151–9156.
- ³¹ D. S. Daniels, E. J. Petersson, J. X. Qiu, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 1532-1533.

- ³² Y. Ferrand, A. M. Kendhale, B. Kauffmann, A. Grélard, C. Marie, V. Blot, M. Pipelier, D. Dubreuil, I. Huc, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 7858-7859.
- ³³ N. Chandramouli, Y. Ferrand, G. Lautrette, B. Kauffmann, C. D. Mackereth, M. Laguerre, D. Dubreuil, I. Huc, *Nat. Chem.*, **2015**, 7, 334-341 .
- ³⁴ G. Lautrette, B. Wicher, B. Kauffmann, Y. Ferrand, I. Huc, *J. Am. Soc. Chem.*, **2016**, 138, 10314-10322.
- ³⁵ M. Horeau, G. Lautrette, B. Wicher, V. Blot, J. Lebreton, M. Pipelier, D. Dubreuil, Y. Ferrand, I. Huc, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56, 6823-6827.
- ³⁶ M. Cordes, B. Giese, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 892-901.
- ³⁷ E. W. Schlag, S.-Y. Sheu, D.-Y. Yang, H.L. Selzle, S.H. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 3196-3210.
- ³⁸ F. Polo, S. Antonello, F. Formaggio, C. Toniolo, F. Maran, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 492-493.
- ³⁹ S. Sek, A. Tolak, A. Misicka, B. Palys, R. Bilewicz, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 18433-18438.
- ⁴⁰ J. Gao, P. Müller, M. Wang, S. Eckhardt, M. Lauz, K.M. Fromm, B. Giese, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 1926-1930.
- ⁴¹ J. Pawlowski, J. Juhaniewicz, D. Tymecka, S. Sek, *Langmuir*, **2012**, 28, 17287-17294.
- ⁴² J. Yu, J.R. Horsley, K.E. Moore, J.G. Shapter, A.D. Abell, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 1652-1654.
- ⁴³ Y-T. Long, E. Abu-Irhayem, H.-B. Kraatz, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 5186-5194.
- ⁴⁴ E. G. Petrov, Y. V. Shevchenko, V. I. Teslenko, V. May, *J. Chem. Phys.* **2001**, 115, 7107.
- ⁴⁵ J. P. Tam, C.-R. Wu, W. Liu, J.-W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 6657-6662.
- ⁴⁶ D. Cavagnat, P. Claudon, L. Fischer, G. Guichard, B. Desbat, *J. Phys. Chem. B*, **2011**, 115, 4446-4452.
- ⁴⁷ N. Pendem, C. Douat, P. Claudon, M. Laguerre, S. Castano, B. Desbat, D. Cavagnat, E. Ennifar, B. Kauffmann, G. Guichard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 4884-4892.
- ⁴⁸ Y. Miura, S. Kimura, Y. Imanishi, J. Umemura, *Langmuir* **1998**, 14, 6935-6940.
- ⁴⁹ K. Kitagawa, T. Morita, S. Kimura, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 15090-15095.
- ⁵⁰ K. Kitagawa, T. Morita, S. Kimura, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 13906-13911.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Liczba wszystkich publikacji: **21**

Liczba publikacji po uzyskaniu stopnia doktora: **18**

Liczba cytowań (według bazy Web of Science (WoS) = **250**, z dnia 28.01.2019

Liczba cytowań bez autocytowań = **217**

H-index = **9**, z dnia 28.01.2019

Sumaryczny *impact factor* według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: **IF_{suma} = 135.607**

Przed uzyskaniem stopnia doktora – publikacje **M1-M3**

Po uzyskaniu stopnia doktora (nie wchodzące do cyklu monotematycznego) – publikacje **D1-D9**

[M1] L. Frankiewicz, **K. Pulka**, A. W. Lipkowski, A. Misicka "Cross interaction of beta-amyloid peptide and prion protein fragments."

Letters in Peptide Science, 2002, 9, 77-81. IF = 0.904

[M2] M. Karbarz, **K. Pulka**, A. Misicka, Z. Stojek "pH and Temperature-Sensitive N-Isopropylacrylamide Ampholytic Networks Incorporating L-Lysine."

Langmuir, 2006, 22, 7843-7847. IF = 3.902

[M3] **K. Pulka**, D. Feytens, I. Van den Eynde, R. De Wachter, P. Kosson, A. Misicka, A. Lipkowski, N.N. Chung, P.W. Schiller, D. Tourwé "Synthesis of 4-amino-3-oxo-tetrahydroazepino[3,4-b]indoles: new conformationally constrained Trp analogs."

Tetrahedron, 2007, 63, 1459-1466. IF = 2.869

[D1] **K. Pulka**, P. Kulis, D. Tymecka, L. Frankiewicz, W. Kozminski, M. Wilczek, A. Misicka "Diastereoselective Pictet-Spengler condensation of tryptophan with α -amino aldehydes as chiral carbonyl components."

Tetrahedron, 2008, 64, 1506-1514. IF = 2.897

[D2] **K. Pulka**, D. Feytens, A. Misicka, D. Tourwé "New tetracyclic tetrahydro-beta-carbolines as tryptophan-derived peptidomimetics."

Molecular Diversity, 2010, 14, 97-108. IF = 3.721

[D3] **K. Pulka** "Pictet-Spengler reactions for the synthesis of pharmaceutically relevant heterocycles." **Current Opinion in Drug Discovery and Development, 2010**, 13, 669-684. IF = 4.507, **artykuł na zaproszenie**

[D4] **K. Pulka**, A. Misicka "Influence of reaction conditions on products of the Pictet-Spengler condensation."

Tetrahedron, 2011, 67, 1955-1959. IF = 3.025

[D5] K. Pulka, M. Slupska, A. Puszko, M. Misiak, M. Wilczek, W. Kozminski, A. Misicka "Peptides and peptidoaldehydes as substrates for the Pictet-Spengler reaction."
Journal of Peptide Science, 2013, 19, 433-440. IF=1.862

[D6] M. Slupska, K. Pulka-Ziach, E. Deluga, P. Sosnowski, B. Wilenska, W. Kozminski, A. Misicka "Synthesis of rigid tryptophan mimetics by diastereoselective Pictet-Spengler reaction of β -3-homo-tryptophan derivatives with chiral α -aminoaldehydes."
Journal of Peptide Science, 2015, 21, 893-904. IF=1.951

[D7] K. Pulka-Ziach, V. Pavet, N. Chekkat, K. Estieu-Gionnet, R. Rohac, M.-Ch. Lechner, C.R. Smulski, G. Zeder-Lutz, D. Altschuh, H. Gronemeyer, S. Fournel, B. Odaert, G. Guichard "Thioether analogues of disulfide-bridged cyclic peptides targeting death receptor 5: conformational analysis, dimerization and consequences for receptor activation."
ChemBioChem, 2015, 16, 293-301. IF = 2.850

[D8] J. Fremaux, L. Mauran, K. Pulka-Ziach, B. Kauffmann, B. Odaert, G. Guichard " α -Peptide-oligourea chimeras: stabilization of short α -helices by non-peptide helical foldamers."
Angewandte Chemie-International Edition, 2015, 54, 9816-9820 IF = 11.709

[D9] C. M. Lombardo, G. W. Collie, K. Pulka-Ziach, F. Rosu, V. Gabelica, C. D. Mackereth, G. Guichard "Anatomy of an oligourea six-helix bundle."
Journal of the American Chemical Society, 2016, 138, 10522-10530. IF = 13.858

W trakcie wykonywania pracy magisterskiej, a potem w trakcie studiów doktoranckich i po uzyskaniu stopnia doktora byłam zaangażowana w różne projekty, czego odzwierciedleniem są publikacje **M1-M3** oraz **D1-D9**. Te różne projekty dotyczyły badania agregacji fragmentów β -amyloidu oraz białka prionowego (praca **M1**) oraz syntezy takich pochodnych aminokwasów, które można włączać w sieć polimerową (praca **M2**). Natomiast głównym tematem mojego doktoratu była synteza cyklicznych pochodnych tryptofanu, takich, w których dodatkowy cykl składa się z 7- lub 6-atomów. Syntezę pochodnych 7-członowych (opartych na strukturze indoloazepinonu) zoptymalizowałam w czasie odbywania stażu w laboratorium prof. Dirka Tourwé (VUB w Brukseli, 2 razy po 3 miesiące). Główny problem syntetyczny polegał na wprowadzeniu grupy formylowej w pozycję 2' pierścienia indolowego Trp. Przetestowałam znane z literatury metody bezpośrednie, jednak żadna z nich nie doprowadziła do otrzymania pożądanego związku. Dopiero metoda pośrednia-otrzymanie pochodnej cyklicznej Trp z pierścieniem 6-członowym (pochodne tetrahydro- β -karbolinowe) w reakcji Picteta-Spenglera, a następnie utlenianie za pomocą SeO_2 tak uzyskanego produktu pośredniego, prowadziło do otrzymania właściwego związku. Zagadnienia te są przedmiotem pracy **M3**. Reakcja Picteta-Spenglera w wariacie chiralnym, tzn. z wykorzystaniem optycznie czynnych aldehydów, pochodnych aminokwasów, a także peptydów była przedmiotem mojego doktoratu, a także pracy naukowej przed wyjazdem na staż podoktorski. W cyklu prac dotyczących tego tematu wyjaśniłam jaki jest wpływ budowy aminoaldehydu na wynik stereochemiczny reakcji (praca **D1**), pokazałam, że odpowiednio sterując warunkami reakcji (temperatura, rozpuszczalnik, w tym dodatek DMSO, pH) można otrzymywać różne produkty (praca **D4**), a także że możliwe jest dalsze przekształcanie pochodnych tetrahydro- β -karbolinowych do związków zawierających 4 sprzężone pierścienie, a więc o bardzo ograniczonej swobodzie rotacji (praca **D2**). W kolejnych pracach zamiast aldehydów używałam peptydów z grupą formylową na C-końcu (praca **D5**) lub zamiast naturalnego Trp zastosowany był β -

Trp (praca D6). Dodatkowo, ze względu na swoje zainteresowanie reakcją Picteta-Spenglera oraz jej zastosowania, zostałam poproszona o napisanie artykułu przeglądowego dotyczącego tej tematyki (praca D3). W trakcie stażu podoktorskiego byłam zaangażowana w wiele projektów. Część powstałych wtedy prac, dotyczących tematyki foldamerów oligomocznikowych i ich pochodnych, została włączona do cyklu prac będących podstawą postępowania habilitacyjnego. Oprócz tego zajmowałam się także syntezą chimer mocznikowo-peptydowych (praca D8) oraz otrzymywaniem bloków budulcowych, które posłużyły do otrzymywania pochodnych mających na celu dokładne wyjaśnienie wpływu sekwencji poszczególnych reszt na proces samoorganizacji foldamerów oligomocznikowych do wyżej opisanych kapsuł (praca D9). Ponadto byłam zaangażowana w projekt dotyczący syntezy cyklicznych peptydów oddziałujących z receptorem DR-5. Otrzymałam peptyd z mostkiem disulfidowym, który kolejno przekształcałam w mostek tioeterowy w warunkach zasadowych, a następnie zbadałam stereochemiczne konsekwencje tego przekształcenia syntezując pochodną lantioniny (praca D7).

Po powrocie ze stażu podoktorskiego cały czas pozostaję we współpracy naukowej z laboratorium prof. Gillesa Guicharda (Institut Européen de Chimie et Biologie we Francji). Ponadto podjęłam nowe współprace naukowe z grupą prof. Sławomira Sęka (Wydział Chemii UW) oraz dr Yulią Moskalenko (grupa prof. Christiny Thiele, Technische Universität Darmstadt w Niemczech), których wyniki zostały już opublikowane albo są w trakcie przygotowywania do wysłania.

Karolina Puda-Vic