

Poznań, 4 listopada 2019

Prof. dr hab. Wojciech T. MARKIEWICZ
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
61-704 Poznań, ul. Noskowskiego 12/14

Ocena dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej
dr Justyny FRĄCZYK
pt. „Funkcjonalizacja powierzchni ciał stałych
przy użyciu pochodnych 1,3,5-triazyny”

I. Ocena dorobku naukowego i dydaktycznego

Habilitantka studiowała inżynierię materiałową na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w 2009 roku na podstawie rozprawy doktorskiej p.t. „*Synteza, badanie własności i próby zastosowania w diagnostyce medycznej macierzy (arrays) sztucznych receptorów*” wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Zbigniewa J. KAMIŃSKIEGO, na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej.

Na całkowity dorobek naukowy Habilitantki, od uzyskania stopnia magistra inżyniera w 2003 r. do chwili obecnej, składa się 37 artykułów naukowych w czasopismach znajdujących się na liście filadelfijskiej (w tym po doktoracie 25), oraz 23 monografie i publikacje spoza listy filadelfijskiej (w tym po doktoracie 15), oraz 12 patentów i zgłoszeń patentowych (w tym po doktoracie 5). Jej prace były cytowane dotychczas 284 razy (187 bez autocytowań). O jakości czasopism, w których publikuje dr Justyna FRĄCZYK świadczy sumaryczny Impact Factor ponad 88, natomiast prac wchodzących w skład rozprawy ponad 27,825.

Dr Justyna FRĄCZYK brała udział w licznych konferencjach naukowych - krajowych i międzynarodowych. Jej dorobek jest w tym zakresie godny zauważenia, ponieważ obejmuje aż 83 komunikaty konferencyjne, w tym 69 po doktoracie. Wyniki swoich badań prezentowała na 28 konferencjach międzynarodowych, a 51 razy na konferencjach krajowych. Ponadto Habilitantka wygłosiła 1 referat na zaproszenie na konferencji krajowej.

Do rozprawy habilitacyjnej dr Justyna FRĄCZYK wybrała, z 25 publikacji opublikowanych po doktoracie, 12 prac (IF 0,74 – 5,0), 1 rozdział w monografii (spoza listy filadelfijskiej), oraz jeden patent. W 10 z nich jest pierwszym autorem, przy tym w 3 jest autorem korespondującym. Inaczej mówiąc, cykl składa się z 11 prac oryginalnych i jednej pracy przeglądowej (*praca H13*), a także jednego rozdziału monograficznego (*praca H14*), oraz patentu. Habilitantka określiła swój procentowy udział w pracach składających się na osiągnięcie habilitacyjne w granicach od 60 do 85%, precyzyjnie opisując na czym ten wkład polegał. Wszystkie prace z listy filadelfijskiej opublikowane zostały w anglojęzycznych, międzynarodowych czasopismach naukowych, a te wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej opublikowane zostały w *Bioelectrochemistry*, *ARKIVOC*, *J. Comb. Chem. & H.T.S.*, *B. Acta Poloniae Pharmaceutica*, *Nanomedicine*, *J. Pep. Sci.*, *Molecules*, *Nanomaterials*, *Materials*, oraz *Current Protein & Pept. Sci.* Sumaryczny Impact Factor prac wchodzących w skład rozprawy wyniósł ponad 27,825.

Udział Habilitantki w przygotowaniu publikacji współautorskich był zasadniczy. W przedstawionym do oceny materiale został precyzyjnie określony i potwierdzony oświadczeniami współautorów. Reasumując, nie mam wątpliwości, co do pozycji pani dr FRĄCZYK w przedstawionym dla uzyskania stopnia doktora habilitowanego monotematycznym cyklu prac.

Habilitantka nie miała okazji kierowania projektem badawczym i jak można przypuszczać, powodem tej sytuacji było wystarczająco dobre finansowanie badań w jej macierzystym Instytucie.

Pani dr Justyna FRĄCZYK odbyła w 2010 roku 3-miesięczny staż podoktorski w Stuttgarcie, w Instytucie Chemii na Uniwersytecie w Hohenheim, RFN. Biorąc pod uwagę kierunek badań prowadzonych w Zakładzie Chemii Bionieorganicznej i Ewolucji Chemicznej kierowanym przez Prof. STRASDEITA, staż ten miał, jak można przypuszczać, związek także z obowiązkami dydaktycznymi Habilitantki w Politechnice Łódzkiej, które objęły m.in. opracowanie programu nauczania, przygotowanie i prowadzenie wykładów z chemii na studiach I stopnia, dla kierunku Inżynierii Kosmicznej, na Wydziale Mechanicznym Politechniki. Habilitantka opracowała także materiały laboratoryjne, brała udział w opracowaniu stanowisk pracy oraz prowadzi zajęcia z chemii na tymże kierunku Inżynierii Kosmicznej.

Działalność dydaktyczna Habilitantki objęła również opracowanie materiałów ćwiczeń audytoryjnych oraz prowadzenie zajęć z chemii organicznej, dla studentów na studiach I stopnia kierunku Nanotechnologii, na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej.

Pani dr Justyna FRĄCZYK współuczestniczyła w opracowaniu programu zajęć laboratoryjnych, przygotowaniu nowych stanowisk laboratoryjnych, oraz przygotowaniu materiałów dydaktycznych oraz prowadzeniu zajęć dla studentów I stopnia: na kierunku Chemia z chemii kombinatorycznej (specjalność Synteza organiczna), na kierunku Inżynieria Biomedyczna z chemii, na kierunku Biogospodarka z materiałów hybrydowych, z inżynierii biomateriałów, z problematyki biorafinerii, oraz z problematyki związków biodegradowalnych. Przygotowywała poza wymienionymi, materiały na temat metod oceny produktów chemicznych dla kolegium Towaroznawstwa, a dla studiów II stopnia: Chemia w Kryminalistyce, zajęcia „*Psychoactive compounds chemistry and detection*”.

Habilitantka brała także udział w opracowaniu programu zajęć projektowych oraz programu seminarium, przygotowała materiały dydaktyczne oraz prowadzi/ła zajęcia na temat: praktycznych problemów patentowania i pozyskiwania funduszy, oraz na temat związków psychoaktywnych i ich wykrywania. Tę bogatą listę uzupełnia ponadto prowadzenie zajęć dydaktycznych i laboratoryjnych z chemii organicznej dla studiów I stopnia na wszystkich kierunkach Politechniki Łódzkiej, oraz laboratorium pracowni dyplomowej podczas realizacji prac inżynierskich i magisterskich.

Tak duży dorobek dydaktyczny znajduje odzwierciedlenie także w działalności promocyjnej. W latach 2012-2019 pani dr FRĄCZYK wypromowała 14 dyplomantów, kierując ich pracami inżynierskimi, oraz była opiekunem, bądź promotorem 9 prac magisterskich, a także promotorem pomocniczym 1 doktoratu. Problematyka tych prac promocyjnych świadczy pośrednio bardzo dobrze o samodzielności Habilitantki jako doświadczonego pracownika dydaktycznego i Jej dorobek w tym obszarze zasługuje na szczególne podkreślenie.

Dr FRĄCZYK brała również udział w recenzowaniu publikacji w renomowanych czasopismach naukowych.

Ocenę działalności pani dr Justyny FRĄCZYK konkluduję odwołaniem do Jej działalności popularyzatorskiej. Obejmuje ona przygotowanie oraz prowadzenie warsztatów na Łódzkim

Uniwersytecie Dziecięcym – *Świat Kolorów i Zapachów* oraz *Chemia Wokół Nas* (2011-2016); zajęcia na *Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki* w Łodzi - od 2010 roku; prowadzenie warsztatów laboratoryjnych dla szkół średnich (od 2017 roku); czy szkolne spotkania z nauką *Copernicus Science* w Kaliszu (2015). Nic więc dziwnego, że jest członkiem Dziekańskiej Komisji ds. Promocji Wydziału Chemii Politechniki Łódzkiej od 2011 roku.

Reasumując, Habilitantka legitymuje się bardzo dobrym dorobkiem na polu dydaktyczno-organizacyjnym i jest przygotowana do prowadzenia samodzielnej działalności.

II. Ocena pracy habilitacyjnej

II.1. Ocena zgodności z wymogami formalnymi

Przedstawiony do oceny materiał spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane pracom habilitacyjnym.

II.2. Zakres i wartość merytoryczna rozprawy

Tematyka badań z obszaru chemicznej syntezy peptydów, ze szczególnym wykorzystaniem s-triazynowych reagentów kondensujących, wykorzystania metod syntezy na nośnikach stałych oraz metod chemii kombinatorycznej jest realizowana w Instytucie Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej od wielu lat i zespół współpracowników prof. Zbigniewa J. KAMIŃSKIEGO może się pochwalić w tym obszarze znaczącymi osiągnięciami badawczymi o dużym znaczeniu aplikacyjnym. Prowadzone badania mają duże znaczenie, zarówno dla rozwoju metod syntezy chemicznej, jak i duży potencjał aplikacyjny. Praca habilitacyjna pani dr Justyny FRĄCZYK mieści się w tym nurcie badawczym i jednocześnie stanowi bardzo dobry przykład poszerzenia badań o nowe obszary – chemii materiałów, diagnostyki medycznej, czy sztucznych enzymów (*synzymów*).

Celem, który postawiła przed sobą Habilitantka było opracowanie efektywnej i możliwie uniwersalnej metody funkcjonalizacji powierzchni ciał stałych przy użyciu pochodnych 1,3,5-triazyny. Pochodne s-triazyny postanowiła zastosować zarówno jako łączniki, jak i reagenty pozwalające na przyłączanie do wytwarzanych funkcjonalizowanych materiałów o nowych właściwościach.

Reagent KAMIŃSKIEGO, od czasu jego pierwszej prezentacji w 1985 roku, poprzez koncepcję „*estrów superaktywnych*” (1994), aż do najnowszej generacji w postaci soli 4-(4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyn-2-yl)-4-metylomorfoliniowych (DMT/NMM/BF₄ lub TsO⁻), stał się niezwykle cennym i przydatnym reagentem w syntezie peptydów oraz w innych reakcjach kondensacji. W tych ostatnich badaniach Habilitantka uczestniczyła aktywnie (*praca A2, patenty B2, B3, B5 i B6*). W przedstawionym do oceny cyklu prac dr FRĄCZYK intensywnie wykorzystuje zarówno 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (reagent KAMIŃSKIEGO), jak i 2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazynę. Kontynuując swoje wcześniejsze badania w których 1^o rzędowe grupy hydroksymetylowe celulozy służyły jako miejsce przyłączenia łańcuchów peptydowych, postanowiła te badania rozwinąć. Krótkie, immobilizowane na celulozie (bibuła) łańcuchy peptydowe zakończone od N-końca resztami kwasów karboksylowych „*tłuszczowych*” o właściwościach lipofilowych mogą, zgodnie z hipotezą Autorów, tworzyć struktury przestrzenne, które z udziałem fragmentów peptydowych, oferują korzystne warunki do przejawienia się różnorodnych funkcji, np. katalitycznych, takich jakie realizują się np. w centrach aktywnych enzymów białkowych. Habilitantka postanowiła dopracować metodę otrzymywania macierzy peptydowych immobilizowanych na powierzchni matrycy celulozowej. Doszła do wniosku, że należy podjąć prace nad automatyzacją procesu, aby zmniejszyć pracochłonność metody, zużycie odczynników, oraz ilości ligandów/analitów stosowanych na etapie analitycznym. W rezultacie opracowała nowe protokoły syntezy

macierzy peptydowych oraz macierzy *N*-lipidowanych peptydów immobilizowanych na nośnikach celulozowych (*praca H8*), wykorzystujące technikę SPOT. W swoich badaniach zastosowała 2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazynę jako reagent modyfikujący celulozę. Wprowadzone na tej drodze reszty 2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazynylo-6-yłowe, połączone z funkcjami hydroksymetyłowymi celulozy, poddane zostały w kolejnych etapach syntezy metodą SPOT reakcjom z odczynnikami budującymi linkery przygotowane do połączenia z syntetyzowanymi następnie peptydami. Habilitantka zoptymalizowała wszystkie etapy tej procedury. Użycie *m*-fenylenodiaminy prowadzi do uzyskania łącznika (linkera A) trwale wiążącego syntetyzowany peptyd z podłożem celulozowym. Optymalizacja procedur modyfikacji celulozy i chemicznej syntezy łączników stanowiła etap kluczowy dla przyszłego użycia, tak otrzymanych bibliotek peptydów, które wykorzystywane są później np. w pomiarach ilościowych oddziaływania z różnorodnymi analitami.

Drugim reagentem wykorzystanym do budowania linkera na bazie celulozy modyfikowanej resztami 2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazynylo-6-yłowymi był *N*-Fmoc blokowany kwas *m*-aminobenzoowy. Procedura syntezy na podłożu tego linkera (typ B), oprócz konieczności usunięcia grupy Fmoc, zawiera kluczowy etap termicznej izomeryzacji grupy aminobenzoilowej od atomu tlenu O-2 do atomu azotu N-1 s-triazyny. Dr Justyna FRĄCZYK wykorzystała wcześniej opisaną przez Zbigniewa J. KAMIŃSKIEGO *et al.* (*Pol. J. Chem.* 1996, **70**, 1316–1323) reakcję izomeryzacji podstawionych s-triazyn, dla otrzymania linkera w którym podstawnik aminobenzoilowy połączony z atomem azotu N-1 s-triazyny zapewnia trwałość w warunkach syntezy i funkcjonalizacji peptydu, a także w czasie analizy właściwości całego układu. (Analogiczna izomeryzacja była zresztą wcześniej opisana przez badaczy czeskich: A. Pískala, J. Gut, *Nucleic acids components and their analogues. LII. Isomerisation of 2,4-dimethoxy-1,3,5-triazine. Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 1964, **29**, 2794–2808.) Można jednak ten łącznik, bez degradacji wiązań peptydowych/amidowych, rozszczepić i potwierdzić strukturę uwalnianych, modyfikowanych peptydów, innymi metodami analitycznymi (najczęściej jest analiza za pomocą spektrometrii mas). To bardzo ważny element opracowanej metody, która pozwala otrzymywać nie tylko krótkie peptydy. Posłużyła do otrzymania fragmentów dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD65), co potwierdza przydatność opracowanej metody syntezy peptydów dla szerokiego grona chemików (*praca H8*). Opracowany przez Habilitantkę sposób syntezy na modyfikowanych w ten sposób nośnikach celulozowych z wykorzystaniem automatycznego syntezyatora peptydów metodą SPOT obejmował także bardzo skuteczne wykorzystanie p-toluenosulfonianu 4-(4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyn-2-ylo)-4-metylomorfoliniowego (DMT/NMM/TsO⁻) na etapie tworzenia wiązań peptydowych/amidowych. Koncepcja „*estrów superaktywnych*” wykorzystywana była też wcześniej na etapie reakcji z *m*-fenylenodiaminą celulozy aktywowanej 2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazyną.

Po opracowaniu syntezy *lipidowanych* peptydów osadzonych na podłożu celulozowym poprzez trwałe wiązanie typu *m*-fenylenodiaminowego (typ A) Habilitantka skupiła swoje zainteresowania na zbadaniu potencjału aplikacyjnego bibliotek/macierzy *N*-lipidowanych peptydów. Głównym przesłaniem realizowanych przez dr FRĄCZYK badań funkcjonalizacji powierzchni nośników stałych było nadanie im odpowiednich właściwości użytkowych (*praca H13*).

Habilitantka uważa, że wyposażenie immobilizowanych łańcuchowych składników otrzymywanych bibliotek (kombinatorycznych) w różne domeny – lipidową, peptydową, aromatyczną, czy domenę celulozową – niejako automatycznie realizuje postulowane oddziaływania z analitami. Stąd pojawia się określenie receptorów molekularnych. Nie kwestionuję poprawności tych oczekiwań, które mają najprawdopodobniej wpływ na zróżnicowany poziom kompleksowania różnorodnych analitów, chociaż mówienie o tych

oddziaływaniach w taki sposób, jakby ich struktura przestrzenna była znana, wydaje się nie do końca uprawnione. Mówienie zatem o projektowaniu tych oddziaływań uważam raczej za określenie użyte na wyrost. To co jest istotne, to fakt że opracowana metodologia stwarza dostęp do materiałów o modyfikowanej strukturze, przejawiających nowe, korzystne właściwości, takie jak zdolność zróżnicowanego oddziaływania z różnymi klasami związków. Kwestie selektywności, powtarzalności tych oddziaływań powinny być każdorazowo przedmiotem pogłębionych analiz. Uważam, że *poznanie rzeczywistej struktury warstwy zawierającej modyfikowane łańcuchy* (tzw. *podandów*) wraz linkerami i podłożem (celuloza lub inne) oraz *ich oddziaływań z analitami*, powinny stać się w przyszłości przedmiotem odrębnych badań tak, aby ich subtelna struktura przestrzenna była znana, a nie tylko postulowana.

Powyższy komentarz ma charakter sugestii, co do ew. przyszłych badań, które recenzentowi wydają się być interesujące i jego zdaniem niosą pewien potencjał poznawczo-praktyczny w tej niezwykle interesującej dziedzinie badań, które Habilitantka podjęła.

Dr Justyna FRĄCZYK w *pracy H1* zbadała oddziaływanie modelowych barwników trifenylometrylowych, różniących się podstawnikami pierścieni fenylowych, jako ligandów. Dla puli ośmiu barwników zaobserwowała znaczne zróżnicowanie zdolności wiązania ligandów *N*-lipidowanych elementów swojej biblioteki. Analiza SAR (*Structure Activity Relationship*) przekonała ją, że zdecydowanie większy wpływ na zdolność wiązania ligandów ma fragment aminokwasowy/peptydowy niż reszta kwasu tłuszczowego.

Podjęła również próbę mającą na celu wyjaśnienie, czy biblioteki tzw. receptorów molekularnych mogą być zastosowane do badania substancji aktywnych (potencjalne leki) (*praca H9*). Wykorzystała pulę 20 pochodnych o aktywności przeciwnowotworowej zawierających ugrupowanie 2-chloroetyloaminowe oraz rdzeń 1,3,5-triazynowy. Zastosowała uprzednio opracowaną (*praca H4*) metodę wizualizacji wiązania bezbarwnych ligandów za pomocą związków reporterowych (*czerni brylantowa*) i stwierdziła, że testowane pochodne wykazują silnie zróżnicowane powinowactwo do biblioteki tzw. receptorów molekularnych. W tym samym nurcie mieści się *praca H4*, gdzie jako ligandy zastosowane zostały związki o udowodnionej i zróżnicowanej aktywności względem receptora histaminowego H3. Badania te były zresztą przedmiotem obronionej pracy doktorskiej pani dr Małgorzaty WALCZAK (w tym przewodzie doktorskim Habilitantka była promotorem pomocniczym). Prace te pokazały wielki potencjał do pozyskiwania danych dla związków nie mających właściwości fizycznych umożliwiających ich łatwą detekcję, przydatnych w analizach aktywności potencjalnych leków metodą QSAR, w niezależnych układach reporterowych.

W tej samej serii badań o dużym potencjale aplikacyjnym znajdują się prace wykorzystujące biblioteki receptorów molekularnych do analizy materiałów diagnostycznych (płyny ustrojowe) pozyskiwanych od pacjentów obarczonych ryzykiem procesów chorobowych/nowotworowych. W tej koncepcji badawczej zakłada się, że nie muszą być znane składniki wskazujące na proces chorobowy/nowotworowy, a użycie opracowanej z udziałem Habilitantki metody analitycznej, stwarza szansę, że zróżnicowane powinowactwo do biblioteki receptorów molekularnych analitów pochodzących od zdrowych i badanych pacjentów może mieć znaczenie diagnostyczne. Badania te są przedmiotem *prac H5, H7* oraz *patentu H12*.

Jeszcze jeden aspekt wykorzystania bibliotek tzw. receptorów molekularnych, to poszukiwanie sztucznych enzymów (*synzymów*). Okazuje się, że skonstruowanie biblioteki i jej zbadanie w celu wykrycia tych jej elementów, które wykazują zdolności do katalizowania wybranego procesu chemicznego, to jeszcze jeden kierunek zastosowania opracowanych nowych materiałów. Zagadnieniu temu poświęcone są *prace H2, H3*.

Wreszcie, kończąc to krótkie omówienie osiągnięć dr Justyny FRĄCZYK, należy wskazać te prace z cyklu habilitacyjnego, które pokazują, że opracowana metodologia syntezy peptydów i modyfikacji nośników stałych wykorzystująca pochodne 2,4,6-triazyny, nie ogranicza się tylko do celulozy jako nośnika. Z sukcesem przeprowadzona została funkcjonalizacja innych materiałów. W *pracy H6* opisana została udana funkcjonalizacja nanorurek węglowych i przyłączenie do nich barwnika, lub kwasu foliowego z wykorzystaniem czynnika kondensującego DMT/NMM/BF₄⁻. Podobnie *praca H10* przedstawia udane doświadczenia funkcjonalizacji nanodiamentu z wykorzystaniem tym razem wariantu *p*-toluenosulfonianowego czynnika kondensującego DMT/NMM. Ponadto *patencie H12* wymienia się oprócz celulozy także inne nośniki, takie jak tlenek cyrkonu czy mika. Potencjał przyszłych zastosowań opracowanej metodologii jest zatem bardzo duży.

W świetle przedstawionej analizy dorobku naukowego i zawodowego oraz oceny rozprawy habilitacyjnej można stwierdzić, że dr Justyna FRĄCZYK jest dojrzałym badaczem legitymującym się znaczącym dorobkiem naukowym i uznanym specjalistą w zakresie chemii peptydów, chemii kombinatorycznej i zastosowania nowych materiałów. Podsumowując stwierdzam, że omówione wyżej prace dr Justyny FRĄCZYK wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej wniosły oryginalny i znaczący wkład w rozwój wspomnianych dziedzin. Pod względem merytorycznym spełniają wymogi stawiane rozprawom habilitacyjnym.

III. Ocena formy prac

Praca przedstawiona została w postaci zestawu dokumentów, 11 oryginalnych publikacji doświadczalnych i jeden patent. Dołączony został także artykuł przeglądowy oraz rozdział w książce. Ponadto dokumentacja obejmuje wniosek, dane kontaktowe, autoreferat w języku polskim i angielskim, kopię dyplomu doktorskiego, oświadczenie Habilitantki o udziale w pracach stanowiących podstawę habilitacji, oraz oświadczenia współautorów.

Przedstawiona dokumentacja jest prawidłowa i w pełni wystarczająca do przeprowadzenia oceny przedłożonej rozprawy habilitacyjnej.

IV. Wniosek końcowy

Na podstawie dokonanej oceny dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej, mam zaszczyt przedstawić Radzie Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej mój wniosek o dopuszczenie dr inż. Justyny FRĄCZAK do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego zgodnie z trybem przewidzianym w art. 18a ust. 5 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.



Prof. dr hab. Wojciech T. MARKIEWICZ
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polska Akademia Nauk
Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
T 61 8528503, F 61 8520532
e-mail: Wojciech.Markiewicz@ibch.poznan.pl