

Poznań, 27 maja 2012

Prof. UAM dr hab. Bohdan Skalski  
Wydział Chemii  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
Ul. Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej  
mgr Michała Kozłowskiego

Pt. "Synteza i charakterystyka kompleksów lantanowców i ich zastosowanie jako syntetyczne rybonukleazy"

Praca doktorska mgr Michała Kozłowskiego została wykonana w Zakładzie Chemii Bionieorganicznej Wydziału Chemii UAM pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Radeckiej-Paryzek. Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy aktualnych i ważnych, zarówno w aspekcie poznawczym jak i praktycznym zagadnień związanych z syntezą nowych kompleksów lantanowców oraz wykorzystaniem tych związków jako katalizatorów hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w kwasach rybonukleinowych, prowadzącej do fragmentacji łańcucha RNA. W układach biologicznych proces ten przebiega z udziałem wysoce specyficznych enzymów zwanych rybonukleazami, dzielących RNA na krótsze fragmenty lub pojedyncze nukleotydy. Jak pokazały badania ostatnich dwóch dekad, w szczególności zaś odkrycie zjawiska interferencji RNA (wyciszania ekspresji genu), degradacja kwasów rybonukleinowych ma ogromne znaczenie dla funkcjonowania organizmów żywych. Przyjmuje się, między innymi, iż rybonukleazy zawierające w swej strukturze małe interferujące RNA (siRNA) odpowiedzialne są za obronę przed wirusami, których genom jest zbudowany z RNA. Z procesem tym wiąże się także duże nadzieje na opracowanie skutecznych, genowych terapii nowotworów oraz metod leczenia niektórych chorób genetycznych. Stąd też duże zainteresowanie od wielu już lat budzi selektywna degradacja RNA z wykorzystaniem syntetycznych analogów nukleaz. Badania nad opracowaniem sztucznych nukleaz, rozpoznających określoną sekwencję RNA i rozszczepiających łańcuch w ustalonym miejscu prowadzone są w wielu laboratoriach na świecie. W konstruowaniu tych sztucznych enzymów szeroko wykorzystywane są jony metali, wśród których specjalną pozycję zajmują lantanowce, w szczególności zaś ich kompleksy z ligandami organicznymi.

Ciekawą grupę organicznych ligandów kompleksujących lantanowce stanowią związki typu zasad Schiffa. Badania nad syntezą i właściwościami makrocyklicznych i acyklicznych układów tego typu, oraz ich kompleksów z lantanowcami (III) prowadzone są w zespole Profesor Radeckiej-Paryzek z dużym powodzeniem od wielu już lat. We współpracy z grupą profesora Ryszarda Kierzka z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu zapoczątkowane zostały także badania nad wykorzystaniem tych kompleksów w procesach transestryfikacji oraz hydrolizy kwasów nukleinowych. Recenzowana praca doktorska stanowi kontynuację tych badań.

Główne cele pracy jakie postawił sobie Doktorant obejmowały:

- syntezę oraz charakterystykę nowych kompleksów lantanowców zawierających salenowe i hydrazonowe ligandy typu zasad Schiffa
- zbadanie zdolności nowo otrzymanych kompleksów, a także szeregu kompleksów otrzymanych wcześniej w Zespole Prof. Radeckiej-Paryzek, do hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w kwasach nukleinowych
- opracowanie procedury syntezy prekursora sztucznej rybonukleazy i zbadanie jego zdolności do hydrolizy RNA

Rozprawa zredagowana jest w sposób ogólnie przyjęty z podziałem na krótki wstęp i cel pracy, wykaz stosowanych skrótów, część literaturową, część eksperymentalną, omówienie wyników, podsumowanie, oraz bibliografię zawierającą 171 pozycji literaturowych. Praca zawiera 97 rysunków oraz 15 tabel. Całość mieści się na 153 stronach z czego 40 zajmuje część literaturowa, 30 część eksperymentalna, a 68 rozdział poświęcony omówieniu uzyskanych wyników.

Pracę rozpoczyna krótki wstęp, w którym Autor zwraca uwagę na istotne znaczenie związków kompleksowych metali *d* i *f* elektronowych w katalizie, biologii, farmacji i medycynie, a także formułuje główne cele pracy. Rozdział II stanowiący część literaturową składa się z dwóch podrozdziałów, z których pierwszy zawiera zwięzły opis kompleksów lantanowców zawierających salenowe i hydrazonowe ligandy typu zasad Schiffa, obejmujący metody ich otrzymywania, charakterystykę strukturalną oraz wpływ warunków syntezy na strukturę. Pewnym niedociągnięciem tego fragmentu pracy jest brak podpisów pod rysunkami przedstawiającymi struktury krystaliczne omawianych kompleksów. Podrozdział drugi dotyczy zagadnień związanych z wykorzystaniem jonów lantanowców i ich kompleksów jako syntetycznych rybonukleaz. W podrozdziale tym Autor omawia metody hydrolizy RNA za pomocą konstruowanych na bazie lantanowców sztucznych nukleaz, zwracając szczególną uwagę na czynniki wpływające na ich efektywność i selektywność. W sposób szczegółowy

przedstawia także mechanizm hydrolizy wiązania fosfodiesterowego za pomocą jonów lantanowców (III). Podsumowując literaturową część pracy należy stwierdzić, że jest napisana w sposób zwięzły, jasny i jest poprawna pod względem doboru tematyki omawianych zagadnień.

Część eksperymentalna (Rozdział 3), zawiera szczegółowy opis syntezy ligandów i związków kompleksowych metodą templatową oraz bezpośrednią, wykaz stosowanych soli metali i związków organicznych oraz metod charakterystyki otrzymanych ligandów i związków kompleksowych. W części tej znajduje się także szczegółowy opis stosowanych procedur syntezy, odblokowania i oczyszczania nukleotydów i oligonukleotydów RNA, prekursorów syntetycznych rybonukleaz oraz procedur hydrolizy RNA. Uzyskane wyniki omawia Autor w rozdziale V stanowiącym główną część pracy.

Stosując templatową metodę oraz różne warunki syntezy Doktorant otrzymał 22 nowe związki kompleksowe lantanowców zawierające salenowe ligandy będące produktami kondensacji aldehydu salicylowego i 1,12-diamino-4,9-dioksadodekanu lub 2-metylo-1,5-diaminopentanu. Wszystkie otrzymane kompleksy zostały dobrze scharakteryzowane przy użyciu szerokiej gamy metod analitycznych (analiza elementarna i termogravimetryczna) i spektroskopowych (spektroskopia w podczerwieni i spektrometria mas ESI MS) co pozwoliło na ustalenie ich wzorów sumarycznych oraz stosunków metal/ligand, określenie wewnętrznych sfer koordynacyjnych, a także zaproponowanie sposobu koordynacji jonów azotanowych (V) z jonem centralnym dla kompleksów o składzie metal-ligand 1:1. Metodą templatową otrzymał Doktorant także 19 kompleksów zawierających ligand hydrazonowy  $L^3$ , będący produktem kondensacji dwóch cząsteczek 2-aminobenzoiłohydrazydu i jednej cząsteczki 2,6-diacetylopirydyny, w tym kompleksy europu, gadolinu, terbu i dysprozu o rzadko występującej w związkach kompleksowych lantanowców liczbie koordynacyjnej 11. Na uwagę zasługuje fakt, iż szereg kompleksów hydrazonowych otrzymał Autor w formie krystalicznej, co pozwoliło określenie ich struktury metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich. Autor wykazał również, że synteza związków kompleksowych lantanowców z ligandem hydrazonowym  $L^3$  metodą bezpośrednią, prowadzi do takich samych związków, jak w przypadku metody templatowej, jednak o znacznie mniejszej czystości.

Drugą grupę otrzymanych przez Doktoranta kompleksów hydrazonowych stanowi 12 kompleksów z ligandem  $L^4$  będącym produktem kondensacji jednej cząsteczki 2-aminobenzoiłohydrazydu i jednej cząsteczki 2,6-diacetylopirydyny, otrzymanym jako produkt uboczny w syntezie liganda  $L^3$ . Wymienione kompleksy otrzymane zostały w syntezie

bezpośredniej i jak wykazał Autor, związków tych nie można otrzymać metodą templatową, gdyż prowadzi ona zawsze do kompleksów zawierających ligand L<sup>3</sup>.

W części trzeciej rozdziału V zawarł Doktorant omówienie wyników badań dotyczących syntezy prekursorów syntetycznych rybonukleaz. Do najważniejszych osiągnięć w tej części badań zaliczyć należy opracowanie wydajnych procedur przyłączania do końca 5' 2'-O-metylowanych oligonukleotydów ligandów organicznych z donorowymi atomami tlenu i azotu oraz syntezę prekursora PSR XIV i jego kompleksu z iterbem (III). Kilka uwag dotyczących tego fragmentu pracy zamieszczam poniżej:

Interesujące jest, że w przypadku adenozyiny przyłączonej do podłoża CPG, zawierającej łącznik 6-aminoheksylowy w pozycji 5' otrzymał Autor oczekiwane produkty reakcji zarówno z bezwodnikiem kwasu ftalowego, jak i chlorkiem O-acetylosalicylowym (Rys.69), podczas gdy modyfikowany takim samym łącznikiem aminoheksylowym pentamer A5 reagował tylko z chlorkiem O-acetylosalicylowym, a 2'-O-metylowany oligonukleotyd PSR VI nie dawał oczekiwanych produktów reakcji z żadnym z tych reagentów. Oczekiwałbym komentarza na ten temat.

Str. 123 – W syntezie PSR X wykorzystano związek 1 a nie 6

Str. 124 – Błędnie oznaczono numer żądanego produktu, powinno być PSR XII zamiast PSR XI, poza tym tego samego oznaczenia PSR XIII użyto dla dwóch różnych związków.

Str. 125 – podpis pod rysunkiem 83 – czego dotyczy zamieszczone widmo?

Uwieńczeniem badań Doktoranta było przeprowadzenie szeregu prób hydrolizy RNA z wykorzystaniem otrzymanej syntetycznej rybonukleazy Yb PSR XVII oraz za pomocą otrzymanych wcześniej, w grupie Prof. Radeckiej-Paryzek makrocyclicznych związków kompleksowych lantanowców a także salenowych i hydrazonowych kompleksów otrzymanych w ramach niniejszej pracy. Podsumowując należy stwierdzić, że rozdział poświęcony dyskusji wyników, podobnie jak pozostałe części rozprawy, napisany jest dość przejrzysto i charakteryzuje się starannie przygotowanymi rysunkami oraz poprawnością formułowanych wniosków. Na uwagę zasługuje niewątpliwie szeroki zakres tematyczny, wielowątkowość zadań oraz ogrom wykonanej pracy eksperymentalnej.

Poniżej zamieszczam kilka uwag i spostrzeżeń i jakie nasunęły mi się w trakcie czytania pracy.

Str. 3 DCC – dicykloheksylokarboimid – powinno być dicykloheksylokarbodimid

Str. 3 NMR – rezonans magnetyczny jądra – powinno być magnetyczny rezonans jądrowy

Str. 24 – „Na podstawie przesunięć pasm absorpcji w spektroskopii w podczerwieni...” powinno być raczej „Na podstawie przesunięć pasm absorpcji w podczerwieni ....”

Str. 46 – „widma spektroskopii w podczerwieni (IR) rejestrowano ..... w postaci tabletek KBr

Str 48 – „Następnie roztwory powoli zagęszczono i kilkakrotnie przemyto wodą destylowaną .....

Wymienione wyżej uwagi nie zmniejszają wartości i istoty prezentowanych wyników oraz mojej pozytywnej oceny recenzowanej pracy.

Reasumując stwierdzam z pełnym przekonaniem, że rozprawa doktorska mgra Michała Kozłowskiego spełnia wszystkie formalne wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w Dz.U. nr 65 poz. 595 z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym, oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki i wnoszę o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. UAM dr hab. Bohdan Skalski