

Profesor Edward Szłyk

Toruń 3. 05. 2012r.

Wydział Chemii

Uniwersytet Mikołaja Kopernika

w Toruniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Kozłowskiego

“Synteza i charakterystyka kompleksów lantanowców

i ich zastosowanie jako syntetyczne rybonukleazy”

wykonanej na Wydziale Chemii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Promotor: prof. dr hab. Wanda Radecka-Paryzek

Badania kompleksów zasad Schiffa (ZS) z metalami przejściowymi i bloku 5f są ciągle poszerzane o nowe obszary w chemii i biologii. Między innymi rozwój asymetrycznej syntezy organicznej jest możliwy dzięki katalizatorom chiralnym opartym na zasadach Schiffa. Inny nurt badań to poszukiwania układów modelowych procesów zachodzących w organizmach żywych, który podjął mgr M. Kozłowski, stosując nowe kompleksy ZS z jonami metali grupy lantanowców do otrzymywania prekursora syntetycznej rybonukleazy i badania ich właściwości hydrolitycznych w odniesieniu do wiązania O-P-O w kwasie rybonukleinowym. Problemy specyficznej i selektywnej degradacji RNA i DNA podjęte w recenzowanej rozprawie mają znaczenie dla medycyny, ponieważ mogą być wykorzystane w terapii niektórych chorób genetycznych. Można więc stwierdzić, że cele rozprawy przedstawione we wstępie są istotne dla rozwoju chemii bionieorganicznej i medycyny czyli wpisują się najbardziej nowoczesny nurt badań na pograniczu chemii i biologii.

Stanu wiedzy przedstawiony w części literaturowej obejmuje: struktury kompleksów lantanowców z salenowymi i hydrazonowymi zasadami Schiffa, ich zastosowania w

badaniach fluorescencyjnych, oraz w otrzymywaniu syntetycznych receptorów anionów. Autor omówił także syntetyczne rybonukleazy, metody i mechanizmy selektywnej hydrolizy RNA z udziałem kompleksów lantanowców, sposoby wiązania kompleksów metali bloku lantanowców z DNA i RNA. Opisana wiedza pozwoliła na sformułowanie szczegółowych zadań badawczych i założeń syntezy oraz hipotez o możliwości wykorzystania syntetycznych rybonukleaz zawierających jony bloku lantanowców i zaproponowaniu sposobów ich usuwania z organizmu człowieka. Zakres tego opisu i zawartość merytoryczna wyjaśnia ważność tematyki, wykazuje nierozwiązane problemy w stanie badań rozprawy i jest ponadto dobrze zredagowana i opisana.

Założone cele Doktorant zrealizował przez syntezę 51 nowych kompleksów jonów: La, Pr, Nd, Eu, Sm, Gd, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, z N,N'-bis(salicylideno)-5,12-diamino-4,9-dioksadodekanem otrzymanych metodą *in situ* (jednoetapową) w reakcji aldehydu salicylowego z aminą 1,12,-diamino-4,9-dioksadodekanem. Wyizolowane kompleksy zbadał metodami: analizy elementarnej, TGA, spektroskopii ESI-MS oraz IR potwierdzając ich budowę. Dla sześciu kompleksów wyznaczone zostały struktury metodą rentgenowską. W mojej ocenie zastosowane metody badawcze są odpowiednie do rozwiązania postawionych hipotez.

W dalszej części rozprawy opisane zostały reakcje odblokowaniem RNA od podłoża CPG, oczyszczania i modyfikacji 2'-deoksyadenozyny i jej pentameru z łącznikiem 6-aminoheksylowym, ftalidoimidów oraz ich łączenia z 5'-nukleotydem. Następnie Autor opisał reakcje hydrolizy RNA przy pomocy jonów lantanowca, syntetycznej rybonukleazy, kompleksu lantanowca, oraz 2'OMe RNA. Produkty reakcji charakteryzowano stosując TLC, MALDI MS, ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR czyli metody odpowiednie dla badanych układów.

W rozdziale omówienie wyników zawarto rezultaty analizy elementarnej, termicznej i widm IR i ESI - MS kompleksów z czterema typami ZS (oznaczonych jako L¹,L²,L³,L⁴) na

podstawie których zaproponowano: skład sfery koordynacyjnej, sposób wiązania ZS, anionów azotanowych lub chlorkowych oraz wody w kompleksach. Autor stwierdził dla kilku kompleksów występowanie nietypowej liczby koordynacyjnej dla jonu lantanowca 11.

Drugi nurt badań wykonanych w rozprawie dotyczy otrzymywania prekursorów syntetycznej rybonukleazy. Autor podzielił je na badania wstępne z wykorzystaniem reakcji przyłączania bezwodnika ftalowego lub chlorku, bądź kwasu O-acetylosalicylowego do modyfikowanego nukleozydu lub nukleotydu stosując adenozyne, DNA lub 2'OMe RNA zawierające na końcu 5'-łącznik 6-aminoheksylowy. W wyniku tych reakcji otrzymał nukleozydy oznaczone jako PSR I, PSR II, PSR IV i PSR V. Należy podkreślić, że Doktorant przedyskutował i wyjaśnił mechanizmy reakcji decydujące o wydajności syntezy nukleozydów opierając się na wynikach badań za pomocą TLC i MALDI MS. Główny wysiłek badawczy skierowany był na uzyskanie syntetycznej rybonukleazy zawierającej jon lantanowca(III), jako potencjalnego leku przeciw neurodegeneracyjnej chorobie Machado-Josepha (MJD), wynikającej ze zwiększonego powielenia sekwencji CAG w genie RNA u osób chorych. W tym celu najpierw zsyntezował 2'OMe RNA z wolną grupą aminową PSR VI (tetramer RNA), a następnie użył do reakcji z bezwodnikiem ftalowym lub chlorkiem bądź kwasem O-acetylosalicylowym ale bez pozytywnego wyniku, wskutek rozpadu produktów podczas oczyszczania. Dalsze wysiłki polegające na zmianie sposobu syntezy liganda dla lantanowca zaowocowały opracowaniem metody odcięcia oligonukleotydu od podłoża CPG. Po wypróbowaniu kilku metod wybrano optymalne warunki syntezy PSR, wyizolowano pożądaną produkt i przeprowadzono reakcję z jonem Yb^{3+} , stwierdzając powstanie kompleksu z dwoma jonami metalu. Następnie opisano reakcje hydrolizy RNA za pomocą otrzymanej syntetycznej rybonukleazy zawierającej jony terbu(III), stwierdzając pewną selektywność do wiązań fosfodiesterowych (37°C, 2h). Próby polepszenia wydajności nie dały pozytywnych wyników. W następnym etapie przeprowadzono reakcje hydrolizy RNA przy

pomocy związków kompleksowych lantanowców (III) (Eu,Yb,Gd) z hydrazonowymi zasadami Schiffa, uzyskując największą selektywność w obecności kompleksu gadolinu(III) z 2'OMe RNA, natomiast bez tego komplementarnego łańcucha nie były one selektywne.

Przedstawione treści rozprawy wskazują, że Autor wykazał się zdolnością do krytycznej analizy literatury naukowej, formułowania hipotez, prowadzenia metodycznych pomiarów naukowych, opracowania wyników oraz wyciągania wniosków z zebranego materiału doświadczalnego czyli umiejętności wymaganych do uzyskania stopnia doktora.

Ocena formalnej strony rozprawy

Rozprawa została napisana w układzie: wstęp zawierający cele rozprawy, przegląd stanu badań w temacie, badania doświadczalne, dyskusja wyników i podsumowanie z wnioskami oraz bibliografią, czyli zawiera wszystkie wymagane od rozprawy doktorskiej elementy. Odnośniki literaturowe (171) są dobrze dobrane i przedstawione w kolejności pojawiania się. Oceniając stronę formalną należy zauważyć niewielką liczbę mało istotnych błędów drukarskich. Praca jest napisana czystym i prostym stylem prac naukowych, co daje efekt jasnego opisu i precyzyjnego formułowania wniosków i uogólnień. W części eksperymentalnej (85 stron na 146 całości) najważniejszy jest rozdział Omówienie Wyników i podsumowanie, które dobrze oddaje wysiłek badawczy i wartość naukową rozprawy.

Od strony oceny formalnej mam następujące zapytania i uwagi:

- a) Na str. 28 jest żargonowe wyrażenie: "zmniejszanie pasma przy wartości 395 nm".
- b) W tabeli 2 rozkład termiczny ubytek masy podano do 3 cyfr znaczących, wymaga to wyjaśnienie ponieważ przy stracie masy rzędu mg wyniki podane w tysięcznych % wskazują na pomiary masy z dokładnością 10^{-5} mg.
- c) Wymaga także wytłumaczenia od jakiego typu drgań jonu azotanowego pochodzą pasma w zakresie $1700-1800\text{ cm}^{-1}$.

- d) W Tabeli z wynikami analizy elementarnej różnice w oznaczeniu C dla niektórych kompleksów wynosiły ponad 2% i to także wymaga wytłumaczenia (np. zw. 36, 34, 32).

Rozdział „Podsumowanie” zawiera najważniejsze wnioski i wyniki rozprawy, które zawierają elementy nowości naukowej, zaliczyć do nich można:

- a) Syntezę i charakterystykę strukturalną (w tym 6 struktur rentgenowskich) nowych kompleksów lantanowców z czterema typami zasad Schiffa,
- b) Opracowanie trzech metod otrzymywania prekursora syntetycznej rybonukleazy,
- c) Znalezienie metody odcięcia syntetycznej rybonukleazy od podłoża CPG bez jej rozpadu,
- d) Określenie optymalnych warunków reakcji hydrolizy RNA za pomocą syntetycznej rybonukleazy,
- e) Zbadanie reakcji hydrolizy RNA i zdefiniowanie warunków selektywności w obecności jonów lantanowców(III).

Wymienione wyżej wnioski wskazują na interdyscyplinarny charakter rozprawy łączący elementy chemii koordynacyjnej z syntezą biochemiczną i modyfikacją RNA. Biorąc dodatkowo pod uwagę, aktualność tematyki badań można stwierdzić, że rozprawa stanowi cenny wkład w dziedzinę chemii bionieorganicznej związków koordynacyjnych lantanowców i wskazuje na możliwość ich zastosowania w leczeniu chorób o podłożu genetycznym.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawione w rozprawie wyniki i wnioski wskazują, iż Pan M. Kozłowski posiada wiedzę z dziedziny chemii koordynacyjnej, biochemii i spektroskopii molekularnej do nadania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych. Na tej podstawie stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnoszę o dopuszczenie magistra Michała Kozłowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję do Rady Wydziału Chemii UAM o wyróżnienie rozprawy za uzyskane cenne wyniki naukowe rozprawy (wymienione powyżej), jej szeroki zakres badawczy (chemia, spektroskopia, biochemia, synteza biochemiczna), właściwie zastosowane metody analityczne (spektroskopia IR, NMR, MS, ESI-MALDI, chromatografia TLC, elektroforeza, rentgenowska dyfraktometria strukturalna) i bardzo dobrze przeprowadzoną dyskusję wyników.

Howard Singh