

Wrocław, 17.06.2018

Dr hab. Elżbieta Gumienna-Kontecka, prof. UWr

Uniwersytet Wrocławski

Wydział Chemii

e-mail: elzbieta.gumienna-kontecka@chem.uni.wroc.pl

Tel: +48713757251

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Ewy Rajczak

pt. „Oddziaływanie nowych pochodnych karbazolu i eterów metalokoronowych z G-kwadrupleksami DNA”
wykonanej w Pracowni Chemii Bioanalitycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama
Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem Prof. dr hab. Bernarda Juskowiaka i dr Agaty Głuszyńskiej

W komórkach żywych organizmów DNA może przyjmować różnorodne struktury wyższego rzędu, a jedną z nich są G-kwadrupleksy (GQ) biorące udział w regulacji ekspresji genów. Wykazano, że G-kwadrupleksy tworzące się w odcinkach telomerowych chromosomów zapobiegają niekontrolowanemu namnażaniu się komórek, m.in. poprzez hamowanie telomerazy – enzymu odpowiedzialnego za utrzymanie stałej długości telomerów, a którego nadekspresja jest charakterystyczną cechą większości typów komórek nowotworowych, dzięki czemu mogą się one dzielić praktycznie nieskończenie wiele razy. Ponieważ hamujący wpływ GQ na telomerazę może stanowić nowe podejście terapeutyczne w leczeniu nowotworów, intensywnie poszukuje się związków zdolnych do efektywnego wiązania i stabilizacji G-kwadrupleksów DNA. W takim nurcie badawczym mieści się praca doktorska Pani mgr Ewy Rajczak, która w ramach rozprawy podjęła próbę modyfikacji ligandów karbazolowych w celu zwiększenia ich oddziaływania z GQ DNA, oraz przebadła pod tym względem wybrane kompleksy metalakoronowe.

Metalakoronony są samoorganizującymi się metaloorganicznymi związkami cyklicznymi uważanymi, z uwagi na strukturę oraz funkcje, za analogi eterów koronowych. Dzięki skierowanym do wnętrza cyklicznej struktury atomom donorowym, metalakoronony, podobnie jak etery koronowe, są zdolne do wiązania cząsteczek gości, kationów lub anionów wewnątrz centralnej wnęki. Pomimo, że od czasu odkrycia pierwszej metalakoronony minęło ponad 25 lat, a liczba nowosyntezyzowanych kompleksów wzrasta z roku na rok, dotychczas nie poświęcono zbyt dużej uwagi charakterystyce oddziaływań gość-gospodarz pomiędzy metalakoronami a biomolekułami, a doniesienia literaturowe ograniczają się zaledwie do kilku prac, w których opisano interakcje pomiędzy omawianymi kompleksami a kwasami nukleinowymi, pokazując ich interkalację pomiędzy pary zasad DNA. Zatem tematyka dysertacji jest bardzo aktualna i wypełnia zapotrzebowanie na badania ukierunkowane na określenie takich oddziaływań, oraz poszukiwania efektywnych ligandów stabilizujących wyższe struktury DNA. Rozprawa doktorska została wykonana w grupie Profesora Bernarda Juskowiaka, na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, który od wielu lat z sukcesem prowadzi badania w dziedzinie chemii bioanalitycznej i badania oddziaływań z DNA.

Rozprawa doktorska mgr Ewy Rajczak przedstawiona została w formie opracowania (276 stron), w którym opisane zostały tezy oraz osiągnięcia rozprawy. W obszernym opracowaniu Doktorantka przedstawiła część literaturową, cel pracy, część eksperymentalną, wyniki i dyskusję, podsumowanie oraz streszczenia (w j. polskim i angielskim), po których znajduje się bibliografia zawierająca 291 pozycji literaturowych. Podoba mi się sposób prezentacji informacji, który we wstępie wyposaża czytelnika w podstawową wiedzę dotyczącą struktur kwasu deoksyrybonukleinowego, ze szczególnym uwzględnieniem G-kwadrupleksów, ich różnorodnych topologii i typów oddziaływań z ligandami, a wszystko w kontekście poszukiwania ich efektywnych stabilizatorów jako potencjalnych nowych ścieżek terapii przeciwnowotworowych. Pani mgr Rajczak opisuje także ligandy karbazolowe i związki metlakorony, ich najważniejsze cechy i zastosowania, tutaj często wychodząc poza kontekst oddziaływań z białkami, czy zastosowań w układach biologicznych. W dalszej części, Pani mgr przedstawia możliwości oraz ograniczenia stosowanych technik badawczych - spektroskopii fluorescencyjnej, CD oraz temperatur topnienia DNA, jako metod bezpośredniego pomiaru stopnia oddziaływania, oraz indykatorowych metod pośrednich. W rozdziale poświęconym opisowi eksperymentu Doktorantka w sposób zwięzły opisała syntezę badanych ligandów. W przypadku opisu syntez kwasów aminohydroksamowych i kompleksów metalakoronowych, przeprowadzonych w oparciu o opublikowane ścieżki, często pada sformułowanie „do syntezy wprowadzono pewne modyfikacje”. Szkoda, że Autorka nie precyzuje jakie są to modyfikacje i czy wpłynęły one pozytywnie np. na wydajność syntezy. Dalej Doktorantka w sposób bardzo uporządkowany i klarowny przeprowadza czytelnika przez opis wyników, kompleksowo dyskutując najważniejsze osiągnięcia wynikające z poszczególnych eksperymentów. Ta część opracowania zawiera wiele widm i rysunków ułatwiających czytelnikowi zrozumienie procesu analizy uzyskanych wyników. Na podstawie przedstawionego opisu można z całą pewnością stwierdzić, iż Doktorantka zdobyła warsztat badawczy w zakresie prowadzonych eksperymentów oraz umiejętność analizy i prezentacji otrzymanych wyników. W ostatnim rozdziale rozprawy mgr Rajczak podsumowała wyniki swoich badań, wskazując potencjał wybranych metod oraz przebadanych związków.

Doktorantka zamieściła również listę prac wchodzących w skład rozprawy. Pani mgr Ewa Rajczak jest autorką ośmiu prac, w tym trzy to artykuły naukowe opublikowane w czasopiśmie z listy JCR (Metallomics, IF 3.975, J. Inorg. Biochem. IF 3.348, Chem. Pap. IF 1.258), trzy artykuły spoza listy, oraz dwie prace w materiałach pokonferencyjnych. Cztery spośród ośmiu prac opublikowane zostały w języku polskim. Szkoda, że kopie tych prac nie zostały dołączone do rozprawy, szczególnie że prace 4-8 nie są łatwe do odnalezienia.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej mgr Ewy Rajczak stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam:

- zaprojektowanie, otrzymanie i scharakteryzowanie oddziaływań z GQ DNA dwóch nowych ligandów karbazolowych, wykazując ich znaczne powinowactwo poprzez oddziaływanie typu '*end-stacking*' z zewnętrzną tetradą;
- przeprowadzenie pionierskich badań i analizy oddziaływań z GQ DNA dla ośmiu kompleksów MC (spośród 19-tu zsyntezowanych), które wykazały się wystarczającą trwałością w roztworze buforowym w skali czasowej niezbędnej do przeprowadzenia badań z GQ;
- Opracowanie metodologii pomiarów oddziaływania badanych związków z GQ z zastosowaniem kombinacji technik bezpośrednich (miareczkowania spektrofluorymetrycznego, spektroskopii CD, pomiarów temperatur topnienia) oraz indykatorowych metod pośrednich (wypierania fluoryzującego interkalatora oraz wygaszania luminescencji Tb³⁺/GQ);

- wykazanie, że związki typu Ln(III) 15-MC_{Cu(II)pheHA/tyrHA}-5 posiadają tendencję do destabilizacji struktury GQ, większą w przypadku MC z centralnym jonem Tb(III), w porównaniu do MC z jonami Eu(III);
- udokumentowanie destabilizacyjnego wpływu MC typu Sm(III) 12-MC_{Ga(III)shiHA}-4 oraz Sm(III)/Tb(III) [12-MC_{Ga(III)shiHA}-4]₂, przebiegające poprzez początkowe oddziaływania planarne typu 'end-stacking', a następnie asocjację MC i niespecyficzne oddziaływania z nadmiarem kompleksu;
- wykazanie selektywnego oddziaływania stabilizującego GQ dla kompleksu Cu(II) 12-MC_{Cu(II)PyrAcHA}-4 i scharakteryzowanie zmian strukturalnych GQ, polegających na transformacji struktury hybrydowej w formę równoległą.

Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana, a interpretacja, prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone w bardzo systematyczny i czytelny sposób. Prawidłowe przygotowanie próbek oraz trafny wybór zestawu technik obrazowania pozwolił na uzyskanie wysokiej czułości analitycznej i monitorowanie subtelnych zmian, często trudnych do interpretacji.

Należy podkreślić, że rozprawa doktorska opiera się na wynikach częściowo opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu, jak *Metalomics* czy *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, i część przedstawionych wyników była już poddana ocenie merytorycznej przez recenzentów poszczególnych artykułów. Poniżej jednak wymieniam pytania pojawiające się po lekturze rozprawy doktorskiej:

1. W tytule pracy, rozprawie i w artykule opublikowanych w języku polskim Pani mgr stosuje termin „metalokorony”, który jednak nie wydaje się być poprawny. W języku angielskim nazwa tej klasy związków brzmi „metalacrowns”. Metala- zamiast metalo- wskazuje na inny charakter wiązania w obu klasach związków. Czy Autorka umiałaby wytłumaczyć się ze stosowania terminu metalokorony, w analogii np. do metalamakrocikli, metalobiałek czy metaloporfiryn?
2. Jak pokazuje lektura przedstawionej pracy, interpretacja widm spektroskopowych wymaga wnikliwej analizy popartej wielkim doświadczeniem. Tutaj zastanawiający jednak fakt interpretacji pasm kompleksów metalakoronowych w zakresie 310-340 nm, które Doktorantka przypisuje w każdym przypadku przejściom $\pi \rightarrow \pi^*$ ligandów aminohydroksamowych. Analizując wartości molowych współczynników absorpcji przedstawionych w Tabeli 8, widzimy dużą różnicę dla MC kompleksów opartych o jony Ga(III) i Cu(II), świadczące o innym charakterze przejść. O ile dla kompleksów typu 12-[MC_{Ga(III)shiHA}]-4 przejścia pochodzą od liganda, to dla kompleksów Cu(II) taka interpretacja jest błędna. W wielu pracach dotyczących MC kompleksów Cu(II) pasma 300-340 nm są wyraźnie przypisywane przejściom z przeniesieniem ładunku (LMCT, $N^- - O^- \rightarrow Cu(II)$), hydroksamowy azot/tlen na Cu(II)). Poproszę o komentarz Pani mgr w tej kwestii.

Na koniec, z obowiązku recenzenta zwracam jeszcze uwagę na drobne, w mojej ocenie, mankamenty rozprawy - dużą liczbę błędów językowych oraz tzw. literówek. W języku polskim używa się raczej sformułowania „tworzenie” czy „powstawanie”, a nie „formowanie”, a wyrażenia takie jak „kolejnymi przykładem”, „tak ja w przypadku”, „do tej port” i wiele innych mogły w łatwy sposób zostać wyeliminowane. Zauważam też pewną niezgodność pomiędzy podpisami związków DIGPc oraz Zn(II)DIGPc na rysunku 16, a ich opisem na str. 52: DIGFc oraz Zn(II)DIGFc.

Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany, a uzyskane z dużą starannością wyniki należy uznać za istotny wkład w poszerzenie wiedzy na temat oddziaływań ligandów karbazolowych, a w szczególności kompleksów metalakoronowych z cząsteczkami o dużym znaczeniu biologicznym. Prowadząc kompleksowe badania oddziaływania metalakoronowych kompleksów ze strukturami DNA wyższego rzędu, Pani mgr Ewa Rajczak pokazała, że oferują one pewien potencjał biomedyczny, ale przede wszystkim wzbogacają wiedzę o supramolekularnych oddziaływniach kompleksów tego typu z cząsteczkami o znaczeniu biologicznym.

Należy podkreślić dorobek publikacyjny Doktorantki oraz udział w projektach naukowych. Praca powstała w ramach projektu PRELUDIUM (nr 2014/13/N/ST4/04099) finansowanego przez NCN, którego Doktorantka była kierownikiem, oraz grantu międzynarodowego programu wymiany personelu naukowego, IRSES „Metallacrowns”, finansowanego ze środków 7PR UE w ramach Akcji Marii Skłodowskiej-Curie. Pierwsze miejsce Doktorantki na liście autorów siedmiu publikacji wchodzących w skład rozprawy wyraźnie wskazuje na wiodącą rolę Doktorantki w przeprowadzeniu eksperymentów, opisie i interpretacji otrzymanych wyników.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia w pełni ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Ewy Rajczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

