

WYDZIAŁ MATEMATYKI,
FIZYKI I CHEMII
UNIwersytetu Śląskiego



INSTYTUT CHEMII
UNIwersytetu Śląskiego

Prof. dr hab. Barbara Machura

Katowice, 19.08.2019

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Katarzyny Walencik,
pt. „Charakterystyka fizykochemiczna redoks – aktywnych układów typu
miedź – peptyd. Implikacje dla wolnorodnikowego mechanizmu
kancerogenezy”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Pauliny Katarzyny Walencik, wykonana pod kierunkiem dr hab. Aliny Bieńko, prof. UWśr, wpisuje się w ważny i aktualny nurt badań z pogranicza chemii koordynacyjnej i biochemii. Inspiracją do podjęcia badań były doniesienia naukowe dotyczące właściwości kancerogennych występującej powszechnie w jamie ustnej gram-ujemnej, beztlenowej bakterii *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), posiadającej na swojej błonie zewnętrznej białka zdolne do wiązania jonów metali przejściowych, w tym Cu(I), Cu(II). Dotychczasowe badania wykazały, że wzrostowi populacji tej bakterii w tkankach pacjentów z nowotworem jelita grubego towarzyszy podwyższony poziom jonów miedzi i nasilona generacja form rodnikowych prowadząca do stresu oksydacyjnego. Wskazywać to może na nadrzędną rolę w procesie nowotworzenia reakcji rodnikowych wynikających z aktywności metaloprotein drobnoustroju. Dokładny mechanizm powstawania raka jelita grubego z udziałem *Fn* nie został jednak jeszcze dokładnie określony.

Głównym celem badań Doktorantki była analiza wpływu struktury i trwałości termodynamicznej kompleksów Cu(II) i Cu(I) z ligandami peptydowymi na ich aktywność redoks. Jako ligandy wykorzystane zostały fragmenty peptydowe dwóch różnych typów białek, FomA i Aim1, wytwarzanych przez bakterię *Fusobacterium nucleatum* i mogących przyczyniać się do wzrostu komórkowego metabolizmu tlenowego i inicjacji stresu oksydacyjnego. Sekwencje peptydowe dobierane były w taki sposób aby zawierały ugrupowania zdolne do koordynacji jonów miedzi na obu stopniach utlenienia, wykazywały zróżnicowanie strukturalne w kontekście badań fizykochemicznych oraz elektrochemicznych, a co najważniejsze, aby możliwie jak najlepiej odzwierciedlały skład aminokwasowy i budowę określonych domen białkowych. Przy projektowaniu ligandów peptydowych Doktorantka uwzględniała dane strukturalne białek FomA i Aim1 oraz dotychczasowe doniesienia literaturowe. W szczególności opierała się na wynikach badań dotyczących aktywności prooksydacyjnej *in vitro* kompleksów Cu(II) z ligandami o krótszej sekwencji peptydowej (Cu^{II}-Fom3 i Cu^{II}-Fom4), dla których badania *in vitro* z wykorzystaniem

modelowej linii komórkowej mysiego raka okrężnicy (CT26) wykazały zdolność peptydowych kompleksów Cu(II) do stymulacji wewnątrzkomórkowej produkcji reaktywnych form tlenu [Dalton Trans., 2018, 47, 5445–5458]. Dla pełniejszego zrozumienia wpływu struktury kompleksów na aktywność centrum metalicznego i poznania mechanizmu konwersji redoks $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-peptyd} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}\text{-peptyd}$, analizie strukturalnej i elektrochemicznej poddawane były zarówno kompleksy Cu(II), jaki i Cu(I). Doktorantka badała również reaktywność kompleksów $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Fom}$ względem tlenu cząsteczkowego O_2 oraz kompleksów $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Fom}$ względem biologicznego reduktora - kwasu askorbinowego. W przeciwieństwie do szeroko badanych i opisywanych w literaturze peptydowych kompleksów z jonem Cu(II), połączenia $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-peptyd}$ są rzadko przedmiotem analiz strukturalnych lub elektrochemicznych. Zagadnienia te bez wątpienia są istotne w kontekście poznawania mechanizmów nowotworzenia tkanek przez *Fusobacterium nucleatum*.

Doktorantka wyznaczyła sobie wyjątkowo ambitne cele, których realizacja wymagała zastosowania całej gamy eksperymentalnych metod badawczych, w tym spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego (z uwzględnieniem zarówno technik jednowymiarowych ^1H NMR, jak i dwuwymiarowych $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ TOCSY), absorpcyjnej i emisyjnej spektroskopii UV-Vis, dichroizmu kołowego (CD) i elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), metody miareczkowania potencjometrycznego, cyklicznej woltamperometrii (CV) i woltamperometrii pulsowej różnicowej (DPV) oraz miareczkowania kompetycyjnego z użyciem niskocząsteczkowych ligandów chelatujących jony Cu(II). Zastosowane przez Nią metody badawcze dostarczyły cennych informacji o strukturze, trwałości badanych układów, jak również mechanizmie konwersji redoks $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-peptyd} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}\text{-peptyd}$. Wybór technik badawczych uważam za właściwy i dobrze przemyślany.

Pod względem formalnym powierzona mi do oceny dysertacja ma klasyczny układ treści. Po wstępie, wykazie skrótów i sformułowaniu celu pracy następuje część literaturowa, w której Doktorantka omawia kolejno aktywność kancerogenną *Fusobacterium nucleatum*, chemię koordynacyjną jonów Cu(II) i Cu(I), aktywność redoks miedzi w procesach homeostatycznych, aktywność redoks miedzi w metaloenzymach i układach typu Cu-peptyd, rolę jonów miedzi w procesach wolnorodnikowych oraz techniki wykorzystywane w analizie strukturalnej i elektrochemicznej badanych układów. Omówione w tej części zagadnienia, ich wybór i kolejność, tworzą logiczną całość, stanowiąc dobrą podstawę do zrozumienia istoty prowadzonych przez Doktorantkę prac badawczych, ich dyskusji oraz interpretacji wyników badań własnych. W mojej ocenie jest to kompetentne opracowanie i uważam je za istotny element rozprawy. Pani mgr Paulina Walencik wykazała się znajomością specjalistycznej literatury naukowej. W bibliografii, obejmującej 260 pozycji, została uwzględniona kluczowa literatura przedmiotu.

Prezentacja i dyskusja badań własnych została podzielona na dwie zasadnicze części. Pierwsza z nich dotyczy układów zawierających ligandy peptydowe odpowiadające zewnątrzkomórkowej pętli białka FomA. Natomiast w drugiej, składającej się z dwóch rozdziałów, Autorka dyskutuje związki Cu(I) i Cu(II) z peptydami o różnych motywach strukturalnych (odpowiednio $\text{-H(X)}_n\text{H-}$ oraz $\text{-H(X)}_n\text{M-}$, gdzie H to histydyna, M-metionina, X- dowolna reszta aminokwasowa), które zaprojektowane zostały dla białka Aim1. Doktorantka argumentuje ten podział koniecznością stosowania odmiennego podejścia eksperymentalnego dla białek FomA i Aim1. Przedstawiona przez Autorkę argumentacja nie do końca mnie przekonuje. W rezultacie zastosowania takiego układu, nie sposób było uniknąć szeregu powtórzeń. Przykładowo, informacja o syntezie i identyfikacji ligandów („Ligandy peptydowe zsyntetyzowane zostały na zlecenie przez komercyjną firmę KareBay Biochem, Inc. Peptydy otrzymane zostały w postaci soli chlorkowych o certyfikowanych czystościach rzędu 98%. Dodatkowo czystość każdego z peptydów potwierdzana była na drodze eksperymentalnej poprzez zastosowanie spektroskopii NMR) pojawia się w pracy dwukrotnie, na stronie 81 oraz 142. W dużym stopniu pokrywają się również informacje dotyczące opisów eksperymentów, w szczególności dotyczące spektroskopii magnetycznego

rezonansu jądrowego, spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis, spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego i miareczkowania z zastosowaniem z niskocząsteczkowych ligandów chelatujących jony Cu(II). Rozdziały zatytułowane jako „Wnioski”, zamieszczone po każdej z części dotyczącej dyskusji wyników badań dla układów z motywami strukturalnymi $-H(X)_nH-$ oraz $-H(X)_nM-$, mają raczej formę podsumowania/streszczenia. Typowe wnioski badań własnych pojawiają się dopiero w rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie i najważniejsze osiągnięcia”.

Pod względem redakcyjnym rozprawa doktorska przygotowana została bardzo starannie. Jest napisana dobrym językiem, a edytorskie usterki są nieliczne i przypadkowe. W mojej opinii jednak zamiast określenia ekstremum w przypadku dyskusji wyników badań w zakresie spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis lepiej jest stosować maksimum. Za niefortunne uważam także sformułowanie: „Nierównomierny i nieliniowy zanik fluorescencji Tyr związany jest z heterogenicznością jej stanów podstawowych”. (strona 154).

Największym atutem recenzowanej pracy jest bogaty, wartościowy i nowy materiał doświadczalny. W roli modeli określonych motywów białkowych Doktorantka wykorzystwała 7 ligandów peptydowych (oznaczonych jako Fom1, Fom2, P1, H3A-P1, H11A-P1, M1 i M2), dla których scharakteryzowała związki miedzi o strukturach imitujących redoks-aktywne centra metaloprotein, prowadząc badania dla układów zawierających jako centrum metaliczne zarówno Cu(I) jak i Cu(II). Dla dwóch krótszych peptydów Fom3 i Fom4 przeprowadziła szczegółowe badania dla układów z jonem Cu(I) oraz wykonała analizę aktywności elektrochemicznej dla Cu^{II} -Fom3 i Cu^{II} -Fom4, a uzyskane wyniki dyskutowała w odniesieniu do wyników badań spektroskopowych dla Cu^{II} -Fom3 i Cu^{II} -Fom4 przedstawionych w pracy [Dalton Trans., 2018, 47, 5445–5458]. Szkoda jedynie, że Doktorantka nie zdecydowała się na wykonanie miareczkowania potencjometrycznego dla Cu^{II} -Fom1 i Cu^{II} -Fom2 i przedyskutowania ich w połączeniu z diagramami dystrybucji dla Cu^{II} -Fom3 i Cu^{II} -Fom4, zamieszczonymi w wyżej wymienionej publikacji. Nie znalazłam też wyjaśnienia dlaczego Autorka zrezygnowała z określenia właściwości koordynacyjnych ligandów peptydowych H3A-P1 oraz H11A-P1 względem jonu Cu(I) za pomocą spektroskopii NMR. Biorąc pod uwagę, że połączenia białka Aim1 z jonami miedzi mogą przyczyniać się do wzrostu komórkowego metabolizmu tlenowego i inicjacji stresu oksydacyjnego, oczekiwałabym również szerszego komentarza odnośnie przewidywanego zachowania układów zawierających fragmenty peptydowe białka Aim1 w procesach biochemicznych w oparciu o wyznaczone dla kompleksów miedzi(II) wartości parametrów $E_{1/2}$. Choć badania biologiczne nie wchodziły w zakres pracy doktorskiej Pani mgr Pauliny Walencik, to w kontekście uzyskanych wyników badań własnych Doktorantki, które potwierdziły, że struktura kompleksu może mieć wpływ na aktywność redoks centrum metalicznego oraz procesy generowania RFT, a krótsze fragmenty peptydowe Fom3 i Fom4 nie spełniają funkcji wiarygodnych mimetyków redoks-aktywnych centrów białek, jestem ciekawa opinii Autorki odnośnie wyboru układów do badań skupiających się na analizie skutków procesów wolnorodnikowych, to znaczy na uszkodzeniach oksydacyjnych biomolekuł. Czy w opinii Autorki stosowanie układów „uproszczonych” ma swoje uzasadnienie, czy raczej skłaniałaby się do wykorzystywania w tych eksperymentach połączeń stanowiących wiarygodne modele centrów aktywnych danego białka. Mam nadzieję, że będzie okazja do krótkiej dyskusji tych zagadnień w trakcie obrony pracy.

Poziom naukowy recenzowanej rozprawy i osiągnięcia Doktorantki oceniam bardzo wysoko. Złożoność podjętej w dysertacji problematyki badawczej wymagała od Autorki korelacji wyników badań na wielu płaszczyznach. Doktorantka zestawiała ze sobą dane elektrochemiczne z danymi potencjometrycznymi oraz spektroskopowymi, co w efekcie pozwoliło Jej określić wpływ struktury kompleksów i koordynacji określonych atomów donorowych na właściwości redoks centrum metalicznego. Wyniki tych badań są dobrze udokumentowane i wnoszą istotny wkład w rozwój wiedzy z zakresu chemii koordynacyjnej,

bionieorganicznej oraz elektrochemii peptydowych kompleksów miedzi, a zgromadzony tutaj materiał znacznie przekracza wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Hipoteza naukowa, zakres prac badawczych oraz opis i dyskusja wyników badań dowodzą, że Autorka jest wnikliwym badaczem, który potrafi planować i realizować eksperymenty, jak również wyciągać prawidłowe wnioski. Jestem w pełni przekonana, że Doktorantka zdobyła umiejętność prowadzenia pracy naukowej, co jest warunkiem koniecznym przy ubieganiu się o stopień naukowy doktora.

Dojrzałość naukową Doktorantki potwierdza także Jej aktywność w zakresie prezentacji i popularyzacji wyników badań własnych, jak również umiejętność pozyskiwania funduszy na realizację badań. Pani mgr Pauliny Walencik jest współautorką czterech publikacji w renomowanych czasopismach z zakresu chemii koordynacyjnej i bionieorganicznej oraz dwóch artykułów w czasopismach spoza listy filadelfijskiej. Jej dorobek naukowy uzupełniają cztery prezentacje posterowe i cztery komunikaty ustne przedstawiane/ wygłoszone na konferencjach międzynarodowych. Z załączonych materiałów wynika również, że trzy kolejne prace, bezpośrednio związane z tematyką rozprawy doktorskiej zostały wysłane do redakcji czasopism. Pani mgr Paulina Walencik kierowała dwoma projektami badawczymi z dotacji celowej z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz odbyła dwa naukowe staże zagraniczne w ramach programów ERASMUS+ oraz IRSES.

W podsumowaniu pragnę jeszcze raz podkreślić, że Autorka podjęła ważny problem badawczy, rozprawa zawiera nowy i wartościowy materiał eksperymentalny. Doktorantka w sposób właściwy dobrała metody badawcze i przedstawiła prawidłową interpretację wyników swoich badań, wykazując się dużą wiedzą i umiejętnościami w obszarze badań i stosowanych technik badawczych. Przeprowadzone analizy pozwoliły Autorce zidentyfikować szereg czynników strukturalnych, które decydują o mechanizmie konwersji redoks $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-peptyd} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}\text{-peptyd}$. Wyniki badań Doktorantki znacząco poszerzyły stan wiedzy w zakresie chemii koordynacyjnej, bionieorganicznej oraz elektrochemii peptydowych kompleksów Cu(I) i Cu(II). Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. *„Charakterystyka fizykochemiczna redoks – aktywnych układów typu miedź – peptyd. Implikacje dla wolnorodnikowego mechanizmu kancerogenezy”* autorstwa Pani mgr Pauliny Walencik spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach w zakresie sztuki” (Dz. U. nr. 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami), a także rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 15 stycznia 2004 roku (Dz.U. nr 15 poz. 128 wraz z późniejszymi zmianami). Z prawdziwą przyjemnością wnioskuję o dopuszczenie mgr Pauliny Walencik do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnoszę o wyróżnienie pracy.



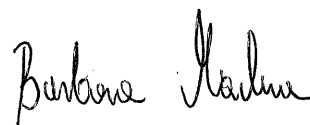
Instytut Chemii Uniwersytetu Śląskiego	ul. Szkolna 9 40-006 Katowice	tel.: (32) 359 15 45 fax: (32) 259 99 78	www.chemia.us.edu.pl
--	----------------------------------	---	----------------------

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pt. „Charakterystyka fizykochemiczna redoks – aktywnych układów typu miedź – peptyd. Implikacje dla wolnorodnikowego mechanizmu kancerogenezy”, przedstawionej przez mgr Paulinę Katarzynę Walencik

Pani mgr Paulina Walencik podjęła się realizacji trudnych i złożonych problemów, a Jej prace badawcze wpisują się w ważny i aktualny nurt badań z pogranicza chemii koordynacyjnej i biochemii. Złożoność podjętej w dysertacji problematyki badawczej wymagała od Autorki zastosowania szeregu eksperymentalnych metod badawczych, a następnie korelacji wyników badań na wielu płaszczyznach. Doktorantka zestawiała ze sobą dane elektrochemiczne z danymi potencjometrycznymi oraz spektroskopowymi, co w efekcie pozwoliło Jej zidentyfikować szereg czynników strukturalnych, które decydują o mechanizmie konwersji redoks $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-peptyd} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}\text{-peptyd}$. Wyniki tych badań wnoszą istotny wkład w rozwój wiedzy z zakresu chemii koordynacyjnej, bionieorganicznej oraz elektrochemii peptydowych kompleksów miedzi, a zgromadzony materiał znacznie przekracza wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Lektura rozprawy przekonuje, że Doktorantka posiada dużą wiedzę i umiejętności z zakresu fizykochemii związków koordynacyjnych oraz cechuje się dużą wnikliwością w interpretacji wyników, a to wszystko razem potwierdza Jej dojrzałość naukową. Na podkreślenie zasługuje również aktywność Autorki w zakresie prezentacji i popularyzacji wyników badań własnych, jak również umiejętność pozyskiwania funduszy na realizację badań. Pani mgr Paulina Walencik jest współautorką czterech publikacji w renomowanych czasopismach z zakresu chemii koordynacyjnej i bionieorganicznej oraz dwóch artykułów w czasopismach spoza listy filadelfijskiej. Jej dorobek naukowy uzupełniają cztery prezentacje posterowe i cztery komunikaty ustne przedstawiane/ wygłoszone na konferencjach międzynarodowych. Z załączonych materiałów wynika również, że trzy kolejne prace, bezpośrednio związane z tematyką rozprawy doktorskiej zostały wysłane do redakcji czasopism. Pani mgr Paulina Walencik kierowała także dwoma projektami badawczymi z dotacji celowej z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz odbyła dwa naukowe staże zagraniczne w ramach programów ERASMUS+ oraz IRSES.

Oceniając bardzo wysoko poziom badań naukowych przedstawionych w rozprawie oraz wiedzę, umiejętności i zaangażowanie Doktorantki składam wniosek do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



Instytut Chemii Uniwersytetu Śląskiego	ul. Szkolna 9 40-006 Katowice	tel.: (32) 359 15 45 fax: (32) 259 99 78	www.chemia.us.edu.pl
--	----------------------------------	---	--