



prof. dr hab. Iwona Łakomska
Wydział Chemii UMK
Zespół naukowy Chemia Bionieorganiczna
ul. Gagarina 7
87-100 Toruń
email: iwolak@chem.umk.pl

Toruń, 27.08.2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Katarzyny Walencik

**pt: „Charakterystyka fizykochemiczna redoks – aktywnych układów typu miedź – peptyd.
Implikacje dla wolnorodnikowego mechanizmu kancerogenezy”**

wykonanej w Zespole Zastosowań Strukturalnych EPR Wydziału Chemii Uniwersytetu
Wrocławskiego pod kierunkiem dr hab. Aliny Bieńko, prof. UWr i dr. Macieja Witwickiego jako
promotora pomocniczego

Choroby nowotworowe stanowią globalny problem zdrowotny i są drugą, zaraz po chorobach układu krążenia, najczęstszą przyczyną zgonów na świecie, ze względu na nieskuteczną terapię przeciwnowotworową, która wynika z atypowej budowy guzów nowotworowych oraz wytworzenia przez nie licznych mechanizmów obronnych, takich jak brak odpowiedzi na reakcje układu immunologicznego oraz unikanie śmierci komórki. Dlatego też, przy naszej praktycznie bezsilności w obliczu tej choroby, wyzwaniem XXI wieku staje się dogłębne poznanie mechanizmu kancerogenezy, w których według przesłanek literaturowych nadrzędną rolę mogą pełnić reakcje rodnikowe z udziałem metaloprotein. Zgłębienie właśnie tej wiedzy zainspirowało Doktorantkę do podjęcia badań, których podstawowym celem było określenie wpływu trwałości termodynamicznej oraz struktury kompleksów Cu(II) i Cu(I) na ich aktywność utleniająco-redukującą w układach białkowych wytwarzanych przez bakterię z rodzaju *Fusobacterium nucleatum*, które najprawdopodobniej odpowiedzialne są za rozwój nowotworu jelita grubego. Realizacja powyższego celu wymagała przede wszystkim właściwego doboru reprezentatywnych fragmentów białek, a następnie przeprowadzenia skutecznej reakcji ich

kompleksowania jonami miedzi. W badaniach wykorzystano dziewięć różnych peptydów stanowiących syntetyczne mimetyki aktywnych fragmentów wytwarzanych przez beztlenową bakterię z rodzaju *Fusobacterium nucleatum*. Zastosowane peptydy zawierające histydyłowe i metionylowe motywy strukturalne typu $-H(X)_nH-$ oraz $-H(X)_nM-$ (gdzie H, M i X oznaczają odpowiednio histydynę, metioninę oraz dowolną resztę aminokwasową), cechowały się wysokim powinowactwem względem jonów miedzi. Warto wspomnieć, że tematyka oddziaływania jonów metali z biomolekułami od wielu lat była z powodzeniem realizowana w grupie badawczej prof. Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk[†], w której to mgr P. Walencik rozpoczynała swoją przygodę z nauką.

Z formalnego punktu widzenia oceniana rozprawa doktorska zawarta jest na 314 stronach maszynopisu i posiada układ typowy dla opracowań opartych na eksperymencie: wstęp, wykaz stosowanych skrótów, cele pracy i strategia ich realizacji, przegląd literaturowy, wyniki badań i dyskusja (część I, część II), podsumowanie i najważniejsze osiągnięcia, streszczenie w języku polskim i angielskim, dorobek naukowy, wykaz stosowanych odczynników, spis tabel i rysunków, suplement i literatura.

Ocena merytoryczna pracy

Przegląd literaturowy

Przygotowany w oparciu o bogatą bazę literaturową (213 pozycji literaturowych) bardzo dobrze wprowadza czytelnika w problematykę realizowaną w części doświadczalnej. Opracowanie to rozpoczyna się od omówienia hipotezy aktywności kancerogennej *Fusobacterium nucleatum* (Fn), która podkreśla ścisłą zależność między aktywnością białek bakteryjnych a właściwościami prooksydacyjnymi jonów miedzi. Konsekwencją tej aktywności jest stres oksydacyjny, który najprawdopodobniej odpowiedzialny jest za proces nowotworzenia komórek śródbłonkowych jelita grubego. Hipoteza ta jednak nie wyjaśnia, w jaki sposób koordynacja jonów miedzi do struktur białkowych determinuje ich prooksydacyjną aktywność. Wydaje się jednak, że zbadanie tego zagadnienia może okazać się istotne dla zrozumienia i zaproponowania mechanizmu patofizjologii nowotworu jelita grubego.

W dalszej części opracowania Doktorantka uwagę czytelnika kieruje najpierw na bardziej obszerną grupę strukturalnie scharakteryzowanych metaloproteiny Cu(II),

w przypadku których grupami inicjującymi proces koordynacji z atomem centralnym najczęściej jest N-terminalna grupa lub pierścień imidazolowy reszty His, a w wyższym pH ugrupowania amidowe. Dalej zaprezentowała znacznie uboższe dane literaturowe dotyczące peptydowych połączeń z Cu(I), które ograniczają się tylko do kilku fragmentów peptydowych β -amyloidu, synukleiny, białka prionowego PrP oraz N- i C-terminalnych domen transportera Ctr1, w których kluczowy do tworzenia liniowych kompleksów Cu(I) okazał się motyw strukturalny -H(X)nH-.

W kontekście realizowanych w ramach rozprawy badań reakcji wolnorodnikowych i redoks, układów metal-peptyd wynikających z głównego celu pracy, szczególnie wartościowy jest materiał prezentujący aktualny stan wiedzy w temacie stanowiącym przedmiot rozprawy doktorskiej, który dodatkowo uzasadnienia celowości prowadzonych badań zawartych w rozprawie doktorskiej.

Część oryginalna pracy

Przedstawia szeroki materiał badawczy, słusznie podzielony na dwie części, stanowiący dobrą bazę do dyskusji i formułowania wniosków końcowych. Pierwsza część obejmuje badania z udziałem silnie ustrukturyzowanego białka FomA zawierającego liczne zewnątrzkomórkowe pętle, z których jedna, określana jako L5, wskazana została jako motyw o największym powinowactwie do jonów metali. W oparciu o strukturę pierwszo- i drugorzędową białka FomA, zaprojektowano 4 ligandy peptydowe (Fom1, Fom2, Fom3 i Fom4) i zbadano ich oddziaływanie z jonami Cu(II), jak i Cu(I). Druga część dyskusji wyników własnych dedykowana jest białku wykazującemu względem limfocytów właściwości apoptyczne i posiadającemu zdolność do autoprotolizy (Aim1 - generujące śmierć komórkową). Również w oparciu o strukturę pierwszorzędową białka Aim1 Doktorantka zaprojektowała reprezentatywne peptydy (P1 i jego dwie modyfikacje; M1 oraz M2), które następnie zastosowała do zbadania ich oddziaływań z jonami Cu(II) i Cu(I) i określenia ich aktywności utleniająco-redukującej w obecności tlenu cząsteczkowego O₂ i kwasu askorbinowego.

Autorka w badaniach eksperymentalnych zastosowała szeroki wachlarz metod spektroskopowych (UV-Vis, CD, EPR, NMR) i elektrochemicznych (CV, DPV), a zaprezentowane wyniki i dyskusja wskazują, że Doktorantka nie tylko opanowała stosowane techniki badań i opracowanie otrzymanych danych, ale również potrafi je przeanalizować

i wykorzystać do planowania dalszych badań. Przeprowadzone badania są obszerne i przejrzyste zaprezentowane z wykorzystaniem 36 tabel i 147 rysunków.

Do niewątpliwych osiągnięć wśród bogatego materiału doświadczalnego prezentowanego w tej części rozprawy doktorskiej na poziomie badań międzynarodowych należy zaliczyć:

- 1) nowatorskie zastosowanie peptydowych kompleksów Cu(II) i Cu(I) do otrzymania mimetycznych metaloprotein;
- 2) przedstawienie szerokiej i bardzo merytorycznej dyskusji nad czynnikami determinującymi sposób koordynacji fragmentów peptydowych do Cu(II) i Cu(I); termodynamiczną trwałość kompleksów; potencjał redukcji;
- 3) wnikliwą analizę wyników eksperymentalnych, która znacząco wzbogaca chemię bionieorganiczną i koordynacyjną o nową wiedzę;
- 4) sformułowanie nowatorskiej koncepcji procesów wolnorodnikowych w układach biologicznych typu Cu-peptyd, zgodnie z którą kwas askorbinowy pełni nie tylko funkcję inicjatora procesu redoks, ale także generatora form rodnikowych zdolnych do wywołania uszkodzeń oksydacyjnych.

W streszczeniu Autorka stwierdza, że *"Korelacja danych elektrochemicznych, spektroskopowych i potencjometrycznych pozwoliła zidentyfikować, w jaki sposób struktura kompleksów i obecność poszczególnych ugrupowań donorowych wpływa na aktywność redoks miedziowego centrum metalicznego i potencjał redukcji"*. Pewnym niedosytem jest brak takiego podsumowania w opracowaniu rozprawy doktorskiej, dlatego prosiłabym Doktorantkę, aby w trakcie publicznej obrony zaprezentowała w zwięzły i przejrzysty sposób korelacje, o których wspomniała.

Rozprawa jest napisana starannie, a mimo to Autorka nie uniknęła w opracowaniu pewnych drobnych błędów edytorskich i potknięć językowych, np. „*dolnopolowe*”; „*górnopolowe*” (przy opisie zmian obserwowanych w NMR - np. roz. 2.1), czy „*W naturze miedź występuje głównie w postaci mono- diwalentnej*” (s. 35), o których z pewnością recenzenta wspominam. Chciałabym też zwrócić jednak uwagę na brak odnośników literaturowych przy opisach rysunków. Jeśli jakiś rysunek zapożycza się z dostępnej literatury, to trzeba go zacytować.

W konkluzji stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska w nadmiarze spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim zawarte w art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r.



(Dz. U. 2003 r. numer 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) o tytułach i stopniach naukowych i z całym przekonaniem przedkładam wniosek Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Pauliny K. Walencik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Halomne