



Kielce 10.08.2020r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Krupy zatytułowanej
„Oddziaływanie jonów Cu(II) z białkami FadA i P1
bakterii *Fusobacterium nucleatum*”

Przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska Pani mgr Katarzyny Krupy wykonana została pod kierunkiem naukowym Pani dr hab. Marii Korabik, Profesora UW. na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w Zespole Chemii Biomateriałów. Pragnę jednocześnie nadmienić, że Doktorantka rozpoczęła pracę badawczą nad tematem dysertacji u śp. Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk, uznanej specjalistki w dziedzinie chemii koordynacyjnej, która właśnie prowadziła na wysokim poziomie naukowym badania nad oddziaływaniami jonów metali z peptydami i kwasami nukleinowymi oraz cytotoksycznością kompleksów metali.

Tematyka dysertacji Pani mgr Katarzyny Krupy wpisuje się w nurt najbardziej aktualnych badań prowadzonych zarówno przez ośrodki naukowe w kraju, jak i za granicą, gdyż w pracy Doktorantka podjęła się przeprowadzenia badań zmierzających do wyjaśnienia jednego z postulowanych mechanizmów rozwoju nowotworu jelita grubego. Podjęte przez Doktorantkę zadanie jest bardzo trudne i jednocześnie bardzo ważne, gdyż pozwala włączyć się w rozwiązywanie istotnych problemów współczesnego społeczeństwa jakim jest próba pokonania chorób nowotworowych, zaliczanych do chorób cywilizacyjnych, nazywanych chorobami XXI wieku. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) nowotwory są współcześnie jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie, a ostatnie statystyki wskazują, że podobnie jest w Polsce, gdzie nowotwory złośliwe po chorobach układu krążenia są drugą najczęściej stwierdzaną przyczyną zgonów. Wśród wielu typów nowotworów do bardzo groźnych, uwzględniając śmiertelność, należy właśnie nowotwór jelita grubego. Ponadto Doktorantka wykazała, że przegląd literatury dokonany na potrzeby

pracy dowodzi, że w promocji tego nowotworu mogą być zaangażowane bakterie *Fusobacterium nucleatum*, które są obecne na płytce nazębnej każdego człowieka. Postuluje się, że w obecności tej bakterii, a szczególnie jej białek powierzchniowych FadA i P1 generowane są miejscowe stany zapalne jelita grubego. Dodatkowo obserwuje się w tych miejscach zwiększony poziom stężenia jonów miedzi(II), które nawet po skoordynowaniu do białek powierzchniowych bakterii, w obecności egzogennych reduktorów, mogą generować reaktywne formy tlenu (RFT). Przytoczone fakty wskazują na możliwość wystąpienia stanów chorobowych w organizmie, w tym procesów nowotworowych.

W tym kontekście główny cel badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej dotyczy: **określenia właściwości koordynacyjnych fragmentów dwóch białek powierzchniowych *Fusobacterium nucleatum* (FadA i P1) względem jonów miedzi(II).** Tak sformułowany główny cel pracy wymagał od Doktorantki dodatkowo przeprowadzenia badań nad:

- określeniem stałych trwałości powstających kompleksów oraz stechiometrii tworzących się miedziowych kompleksów w roztworze wodnym,
- wyjaśnieniem znaczenia kwasu glutaminowego w procesie koordynacji jonu miedzi(II), a także określenie jego wpływu na stabilność powstających kompleksów,
- ustaleniem czy wybrane peptydy oraz ich kompleksy z jonami miedzi(II) są zdolne do generowania reaktywnych form tlenu(RFT),
- określeniem zdolności do generowania reaktywnych form tlenu przez całą komórkę bakteryjną *Fusobacterium nucleatum*,
- sprawdzeniem miejsca powstawania wolnych rodników w przypadku komórki bakteryjnej,
- opracowaniem metody pomiaru RFT dla bakterii beztlenowych z wykorzystaniem odczynnika ABTS

Uwzględniając co powyżej, oceniam że cel pracy został przez Autorkę dobrze sprecyzowany, a tok badawczy do jego realizacji precyzyjnie przemyślany i zaprojektowany. Jednocześnie zaplanowane badania wskazują na interdyscyplinarny charakter pracy. Należy docenić, że aby sprostać temu zadaniu Doktorantka odbyła dwuletni staż naukowy w Instytucie Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Analizując pod względem formalnym przedstawioną do recenzji rozprawę Pani mgr Karoliny Krupy stwierdzam, że praca liczy 191 stron, posiada strukturę typową dla rozpraw opartych na badaniach eksperymentalnych i zawiera następujące rozdziały: obszerny wstęp, cel pracy, część eksperymentalną, wyniki i dyskusję, podsumowanie oraz bibliografię liczącą 231 pozycji. Dodatkowo w części końcowej pracy Autorka zamieściła: wykaz stosowanych

skrótów, spis rysunków, spis tabel, spis publikacji i artykułów naukowych oraz spis wystąpień konferencyjnych. Niestety praca nie zawiera wymaganego streszczenia pracy w języku angielskim natomiast są załączone 3 publikacje, zawierające część opublikowanych wyników badań uzyskanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Ocena merytoryczna pracy

Część literaturowa

Część literaturową pracy stanowi obszerny rozdział zatytułowany "Wstęp", w którym Doktorantka w oparciu o przegląd oryginalnych artykułów naukowych starała się przedstawić motywację, którą kierowała się przy wyborze tematyki badawczej zawartej w dysertacji, a tym samym umotywować podjęcie w/w celu badań. Część wstępna pracy została zrehabilitowana w oparciu o przegląd 95 pozycji literaturowych i składa się z 4 głównych podrozdziałów przedstawiających wiedzę z zakresu czynników warunkujących proces nowotworowy w organizmie i jego etapy rozwoju w tym, wyjaśnieniem poglądów na temat związku pomiędzy powstawaniem nowotworu jelita grubego, a obecną w organizmie każdego człowieka bakterią *Fusobacterium nucleatum*, oraz zwięzłą charakterystykę tej bakterii i jej głównych białek powierzchniowych: FadA i P1 wraz z podaniem ich sekwencji aminokwasowej. Drugi podrozdział dotyczy nakreślenia biologicznej roli miedzi. Kolejny podrozdział dotyczy zwięzłej charakterystyki reaktywnych form tlenu i omówienia ich najważniejszych właściwości, oraz ostatni podrozdział, bardzo istotny w nawiązaniu do tematu dysertacji, zawiera przegląd najnowszych badań nad oddziaływaniem jonów miedzi(II) z peptydami.

Lektura tej części dysertacji dowodzi, że przedstawiona przez Autorkę tematyka w sposób wyczerpujący wprowadza w zagadnienia związane z planowanymi badaniami oraz jednocześnie świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki od strony teoretycznej do realizacji części doświadczalnej pracy.

Część eksperymentalna

Analizując eksperymenty przeprowadzone w części doświadczalnej pracy można wyodrębnić część chemiczną i mikrobiologiczną badań.

W części chemicznej doktorantka prowadziła obszerne badania nad właściwościami koordynacyjnymi i oksydacyjnymi wybranych peptydów. Materiał badawczy stanowiły fragmenty białka FadA oraz P1, przy czym Doktorantka do badań wybrała 2 peptydy, składniki białka FadA, które w ramach współpracy naukowej pozyskała z Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie zostały zsyntezowane przez zespół prof. Krzysztofa Rolki. Natomiast 9

peptydów będących fragmentami białka powierzchniowego P1 zakupiono z firmy KareBayBiochem (USA). Na szczególne wyróżnienie zasługuje fakt, że aby zrealizować zakreślone w dysertacji ambitne i trudne cele Doktorantka wykorzystwała cały wachlarz metod badawczych takich jak miareczkowanie potencjometryczne wraz z wykorzystaniem do obliczeń programów SUPERQUAD oraz HYPERQUAD, spektroskopię UV-Vis, spektroskopię dychroizmu kołowego(CD), spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego(EPR), spektroskopię ^1H NMR, ^{13}C NMR, spektrometrię mas(MS), oraz obliczenia DFT.

W części mikrobiologicznej Doktorantka uzupełniła badania nad detekcją wolnych rodników przez układy zawierające szczep bakterii *Fusobacterium nucleatum* DSM 15643 mając na uwadze fakt, że badania nad peptydami, a więc fragmentami białka nie mogą w pełni służyć do wyciągnięcia wniosków dotyczących właściwości całej komórki bakteryjnej. Materiał badawczy został pozyskany z Niemiec z Instytutu Laibniz. Należy podkreślić, że badania mikrobiologiczne Doktorantka wykonała samodzielnie podczas stażu naukowego odbytego w Zakładzie Mikrobiologii UW, pod opieką naukową dr Anny Kędziory i prof. Gabrieli Bulga-Płoskońskiej. Przy realizacji tej części pracy Doktorantka musiała zastosować dodatkowo nowe metody badawcze (obok spektroskopii UV-Vis, pomiary luminescencji i elektroforezę żelową), które posłużyły do: i) wyznaczenia wartości minimalnego stężenia hamującego wzrostu bakterii (MIC), ii) określenia przeżywalności bakterii, iii) detekcji wolnych rodników przy użyciu metody ABTS.

Wyniki badań, uzyskane przy pomocy powyżej wymienionych metod, Doktorantka zawarła w rozdziale czwartym zatytułowanym „Wyniki i dyskusja”. Jest to obszerna część pracy gdzie w czterech podrozdziałach przedstawione są wyniki badań i ich analiza wraz z odniesieniem do danych literaturowych. Autorka przedstawiła badania nad: (1) kompleksami jonów miedzi(II) z fragmentami białka FadA, (2) kompleksami jonów miedzi(II) z fragmentami białka P1 z rozróżnieniem koordynacji do jonów Cu(II) peptydów zawierających odpowiednio jedną, dwie i trzy reszty histydylowe w sekwencji aminokwasowej, (3) badania nad reaktywnością kompleksów miedzi(II) z fragmentami białka P1, (4) badania mikrobiologiczne nad detekcją wolnych rodników w obecności całej komórki bakteryjnej *Fusobacterium nucleatum* DSM 15643.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki wynikających z realizacji badań prowadzonych w pracy należy zaliczyć:

- (1) Wyznaczenie przy użyciu metody potencjometrycznej oraz przy wykorzystaniu w/w programów obliczeniowych wartości skumulowanych (sumarycznych) stałych protonacji i stopniowych stałych dysocjacji kwasowych dla 11(2 i 9) peptydów

- będących składnikami odpowiednio białka FadA i P1 oraz wyznaczenie sumarycznych stałych trwałości dla równowagowych reakcji koordynacji jonów miedzi(II) z badanymi peptydami w szerokim zakresie pH.
- (2) Określenie chromoforów koordynacyjnych wokół jonów Cu(II) dla każdego z badanych peptydów, przedyskutowanie różnic w sposobie koordynacji badanych ligandów z jonem centralnym jak i próby porównania i wyjaśnienia różnic w trwałości powstałych kompleksów.
- Uważam, że to jest bardzo istotny ale również i najtrudniejszy etap badań doświadczalnych, który wymagał od Doktorantki znajomości i zaangażowania całego szeregu metod spektroskopowych UV-Vis, CD, EPR, a w przypadku badań procesu koordynacji fragmentów białka FadA również wykonane zostały badania ^1H i ^{13}C NMR, które należą do rzadkości w przypadku badań kompleksów z paramagnetycznym centrum metalicznym. Ostateczny werdykt dotyczący określenia atomów donorowych i stechiometrii kompleksów Autorka wsparła analizą widm masowych oraz dla kompleksów Cu(II) z peptydami białka FadA, obliczeniami teoretycznymi DFT.
- (3) Przedyskutowanie zależności pomiędzy składem aminokwasowym badanych peptydów, a typem chromoforu i trwałością kompleksów miedzi(II).
- (4) Przeprowadzenie badań: (1) modelowych z udziałem wybranych peptydów białka P1 oraz ich kompleksów z jonami miedzi(II) nad procesem generowania reaktywnych form tlenu w obecności nadtlenu wodoru oraz kwasu askorbinowego jako reduktorów, które wykazały, że zarówno ligandy jak i większość kompleksów jest zdolna do generowania rodnika hydroksylowego wyłącznie w obecności kwasu askorbinowego, (2) badań mikrobiologicznych na całej komórce bakteryjnej *Fusobacterium nucleatum* DSM 15643 w obecności jonów Cu(II) i H_2O_2 i udowodnienie, że bakteria jest zdolna do produkcji rodników.
- (5) Opracowanie przez Doktorantkę procedury pomiaru wolnych rodników metodą ABTS dla bakterii beztlenowych.

Tym samym, na tym poziomie eksperymentu, Doktorantka potwierdziła, że obrany w dysertacji kierunek badań zmierzający do wyjaśnienia założonej ścieżki powstawania nowotworu jelita grubego miał swoje podstawy, a postawiony cel pracy został zrealizowany. W mojej ocenie wyniki przedstawione w pracy doktorskiej są bardzo dobrze udokumentowane w postaci 78 rysunków prezentujących wykresy i widma, rozkłady form kompleksowych, schematy i wzory strukturalne oraz zestawione w 33 tabelach. Praca jako całość jest dobrze zredagowana ale wywiązując się z powierzonego obowiązku recenzenta muszę jednocześnie zaznaczyć, że Doktorantce (jak przeważnie każdemu) nie udało się uniknąć w pracy pewnych usterek stylistycznych i edytorskich głównie wynikających z braku

precyzji w formułowaniu zdań oraz nadmiernym korzystaniu z określeń z języka angielskiego. Na potwierdzenie przytaczam przykładowo kilka nieścisłości zawartych w pracy z prośbą o ustosunkowanie się i wyjaśnienie oraz dodatkowo poproszę Doktorantkę o przedyskutowanie pewnych zagadnień zamieszczonych poniżej w trakcie obrony pracy doktorskiej:

- w pracy często zamiast stosować w nazwie duże litery przy pisaniu nazwy Tabela i skrótów Rys. od Rysunek używane są oznaczenia pisane małą literą (np. na stronach: 12,45, 66,69, 83,84,104,159,160,161)
- część używanych w pracy określeń może być niezrozumiała dla czytelnika np.: „uprotonowana całkowicie cząsteczka liganda” „molekuła raportująca” czy „bis-kompleksy miedzi(II)” - raczej stosuje się: cząsteczka liganda całkowicie sprotonowana; substancja będąca wskaźnikiem poziomu np. RFT, kompleksy zawierające w sferze koordynacyjnej Cu(II) dwie cząsteczki peptydu,
- str. 165, co znaczy stwierdzenie „kompleksy o dużym rozpowszechnieniu w pH=5,5?
- str.166, co oznacza „oddziaływanie kation- π ”?
- str. 163, czy można na tym etapie badań stwierdzić, że badane fragmenty białka FadA to markery nowotworowe?
- str.49 winno być „zastosowanie w tym przypadku **wyższego** (a nie niższego) stosunku molowego ” na co wskazuje odniesienie do Rys.11B.
- określenie wielkości pierścieni: pierścień pięciocząłowy, sześciocząłowy zarówno chemii organicznej jak i koordynacyjnej pisze się łącznie.

Zagadnienia do przedyskutowania podczas obrony:

1. Na podstawie przeprowadzonych badań modelowych w pracy przedyskutować, w którym kierunku jest przesunięta równowaga pomiędzy działaniem toksycznym a ochronnym badanych kompleksów Cu(II) z peptydami białka P1 i jakie wnioski można wyciągnąć z korelacji tych właściwości z wartościami skumulowanych stałych trwałości analizowanych kompleksów miedzi(II).
2. W zakończeniu pracy Autorka stwierdza, „że obrany kierunek badań jest prawidłowy i stwarza możliwość dalszych eksperymentów, które pozwolą na wskazanie, które z białek powierzchniowych jest w największym stopniu związane z procesem generowania wolnych rodników”. Proszę o rozwinięcie tematu i wskazanie jakie by Pani zaproponowała eksperymenty gdyby praca była przez Panią kontynuowana?

Podsumowując moją ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Krupy chciałabym zwrócić uwagę, że Doktorantka podjęła się realizacji interdyscyplinarnego, bardzo ambitnego przy czym ważnego społecznie ale również bardzo trudnego tematu. Pragnę podkreślić bardzo wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań. Wskazują one na kompetencje Doktorantki w zakresie chemii koordynacyjnej, metod badania reakcji równowagowych w roztworze pomiędzy jonami miedzi(II) a wielodonorowymi ligandami przy udziale metody potencjometrycznej oraz bardzo szerokiej gamy metod spektroskopowych. Dodatkowo na uwagę zasługuje otwartość Doktorantki w kierunku badań mikrobiologicznych i zdobyte w tym kierunku doświadczenie w czasie dwuletniego stażu w Instytucie Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Wyniki badań recenzowanej pracy doktorskiej zostały już częściowo opublikowane w trzech artykułach oryginalnych w czasopismach z bazy JCR: *J. Inorg. Biochem.*, 2018, **189**, 69. (gdzie Doktorantka jest pierwszym współautorem) *J. Inorg. Biochem.*, 2019, 201, 110819. (gdzie Doktorantka jest nie tylko pierwszym współautorem ale również autorem do korespondencji). oraz *Future Microbiol.*, 2020, **15**, 259. Pani Krupa jest również współautorem publikacji w *Metallomics*, 2019, **11**, 1700. 3, która tematyką wykracza poza rozprawę oraz 3 artykułów przeglądowych opublikowanych w *Wiadomościach Chemicznych* związanych tematycznie z problemami poruszonymi w dysertacji. Dodatkowo Pani mgr Katarzyna Krupa prezentowała wyniki swoich badań na 7 konferencjach międzynarodowych w kraju i za granicą. Należy nadmienić, że nie opublikowane dotychczas wyniki badań zostały przez Doktorantkę przygotowane do druku w postaci trzech nowych artykułów naukowych.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdzając wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę, zatem spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art.13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami*. Wnoszę więc o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Krupy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto z uwagi na interdyscyplinarność badań, włączenie się w rozwiązywanie istotnych problemów współczesnego społeczeństwa jakim jest próba pokonania chorób nowotworowych, wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników oraz ich opublikowanie w uznanych czasopismach, stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

