



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

Prof. zw. dr hab. n. farm. Justyn Ochocki
Kierownik Katedry Chemii Medycznej
i Zakładu Chemii Bionieorganicznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Muszyńskiego, 90-151 Łódź
tel. 42 677 92 20
e-mail: justyn.ochocki@umed.lodz.pl

Łódź, 15 sierpnia 2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Krupy pt.

„Oddziaływanie jonów Cu(II) z białkami FadA i P1 bakterii *Fusobacterium nucleatum*”

Tematyka rozprawy doktorskiej obejmuje ocenę i charakterystykę właściwości koordynacyjnych dwóch fragmentów białka FadA oraz dziewięciu fragmentów białka P1 bakterii *Fusobacterium nucleatum* wobec jonów miedzi(II).

Cele badań prowadzonych w ramach tej dysertacji były następujące:

określenie właściwości koordynacyjnych fragmentów dwóch białek powierzchniowych *Fusobacterium nucleatum* (FadA i P1) względem jonów miedzi(II).

wyznaczenie stałych trwałości powstających kompleksów oraz stechiometrii tworzących się miedziowych kompleksów w roztworze wodnym.

wyjaśnienie znaczenia kwasu glutaminowego w procesie koordynacji jonu miedzi(II), a także określenie jego wpływu na stabilność powstających kompleksów.

ustalenie czy cała komórka bakteryjna *Fusobacterium nucleatum* ma zdolność do generowania reaktywnych form tlenu (RFT).

Autorka rozprawy w swoich badaniach zastosowała szereg metod spektroskopowych takich jak: UV-Vis, CD, EPR, a także NMR. Ponadto, wykorzystwała obliczenia teoretyczne (DFT) które potwierdziły zaproponowane modele koordynacyjne dla kompleksów z fragmentami białka FadA.

Pani mgr Katarzyna Krupa przeprowadziła miareczkowanie potencjometryczne w funkcji pH roztworu w celu określenie stechiometrii i wyznaczenia stałych trwałości powstających kompleksów miedzi w roztworze wodnym.

Autorka wykorzystała programy SUPERQUAD oraz HYPERQUAD do wyliczenia sumarycznych stałych trwałości ($\log\beta$) zarówno ligandów i ich kompleksów z jonami miedzi(II).

Doktorantka potwierdziła stechiometrię powstających kompleksów techniką spektrometrii mas (MS).

Autorka wykazała, że badane peptydowe ligandy zdolne są do tworzenia z jonem miedzi(II) w roztworze wodnym zarówno kompleksów monojądrowych (o stosunku molowym metalu do liganda 1:1 oraz 1:2) jak i polijądrowych.

Pani mgr Małgorzata Krupa obliczyła wartości $\log K^*$, co umożliwiło Jej porównanie siły oddziaływania pomiędzy poszczególnymi kompleksami o tym samym sposobie wiązania jonu miedzi(II).

Zgodnie z założeniami podjętych badań bardzo ważne było zbadanie czy wybrane ligandy peptydowe i ich kompleksy z jonami miedzi(II) wykazują zdolność generowania reaktywnych form tlenu (RFT). Do detekcji RFT Autorka rozprawy zastosowała metody spektroskopowe (UV-Vis i luminescencję) wraz z odpowiednio selektywnymi związkami będącymi molekułami raportującymi. Doktorantka dla wybranych związków zastosowała technikę poziomej elektroforezy żelowej która umożliwiła Jej nie tylko identyfikację powstających rodników ale również ocenę uszkodzeń plazmidowego DNA.

Bardzo ważny etap badań prowadzonych w ramach tej dysertacji obejmował określenie zdolności przez całą komórkę bakteryjną *Fusobacterium nucleatum*, do generowania RFT a także wykazanie czy wolne rodniki powstają na zewnątrz czy wewnątrz komórki bakteryjnej.

Praca doktorska została opublikowana w trzech artykułach w bardzo dobrych czasopismach *J. Inorg. Biochem.* (2018, 2019) i *Future Microbiol.*, (2020) z listy JCR. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w dwóch publikacjach (*J. Inorg. Biochem.*) Pani mgr Katarzyna Krupa jest pierwszym autorem a w jednej z nich (2019) autorem korespondencyjnym.

Pani mgr Katarzyna Krupa prezentowała wyniki swoich badań w trakcie siedmiu konferencji (w kraju - pięć konferencji i za granicą dwie konferencje). Na trzech Autorka przedstawiała wyniki w formie prezentacji ustnej, a na czterech konferencjach w formie plakatów. Jako pierwszy autor na pięciu konferencjach. Jest to bardzo dobry dorobek naukowy.

Badania mikrobiologiczne zostały wykonane we współpracy z dr Anną Kędziorą oraz dr hab. Gabrielą Buglą-Płoskońską, prof. UW. z Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej wykonane zostały samodzielnie w ramach stażu naukowego, w zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Należy w tym miejscu podkreślić fakt samodzielnego przeprowadzenia badań przez Autorkę rozprawy.

Część badań prowadzonych w ramach dysertacji “*Oddziaływanie jonów Cu(II) z białkami FadA i P1 bakterii Fusobacterium nucleatum*” zrealizowano w ramach grantu naukowego Narodowego Centrum Nauki grant 2014/13/B/ST5/04359. Kierownikiem Projektu była Pani Prof. dr hab. Małgosia Jeżowska – Bojczuk.

Wstęp pracy jest napisany w sposób precyzyjny i logiczny, a cel podjętych badań dobrze uzasadniony. Dyskusja wyników dowodzi dużej dojrzałości naukowej. Rozprawa jest przygotowana niezwykle starannie pod względem edytorskim. Zawarty w niej został bardzo szeroki i kompetentny przegląd aktualnej literatury naukowej.

Dysertację kończy podsumowanie w którym Autorka stwierdza że przeprowadzone badania na całej komórce bakteryjnej *Fusobacterium nucleatum* pozwoliły zweryfikować hipotezę, o możliwości generowania RFT przez bakterię. Doktorantka udowodniła, że w obecności jonów miedzi(II), a także nadtlenu wodoru, który pełni rolę reduktora, *Fusobacterium nucleatum* jest zdolne do generowania wolnych rodników. Autorka stwierdziła, że wolne rodniki powstają na zewnątrz komórki bakteryjnej, co potwierdza tezę o zaangażowaniu białek powierzchniowych w proces powstawania rodników.

Wyniki badań wskazują jednoznacznie, że bakteria *F. nucleatum* w obecności Cu^{2+} i H_2O_2 jest zdolna do wytwarzania wolnych rodników. Reaktywne formy tlenu wytwarzane są

głównie poza komórką bakteryjną. Wynik ten sugeruje, że białka błony zewnętrznej mogą brać udział w procesie utleniania.

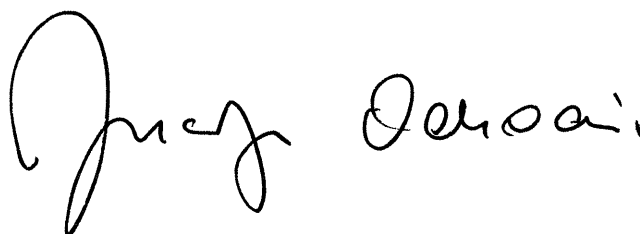
Przedstawione wyniki są istotne dla rozwoju chemii bionieorganicznej i stwarzają możliwość dalszych badań, które pozwolą na stwierdzenie, które z białek powierzchniowych w największym stopniu są związane z procesem generowania wolnych rodników.

Interdyscyplinarny charakter badań pozwala na powiązanie funkcji bakterii *Fusobacterium nucleatum* z nowotworem jelita grubego i może przyczynić się do zaproponowania nowego mechanizmu nowotworzenia.

Mam pytanie do doktorantki, czy na obecnym etapie badań, przedstawione wyniki mogą mieć charakter aplikacyjny? Prosiłbym doktorantkę o ustosunkowanie się do pytania podczas obrony.

Wniosek końcowy.

Stwierdzam, że rozprawa pt. „Oddziaływanie jonów Cu(II) z białkami FadA i P1 bakterii *Fusobacterium nucleatum*”, w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i składam wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Chemiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Krupy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy.



Prof. dr hab. Justyn Ochocki, prof. zw. UM
Kierownik Katedry Chemii Medycznej
Kierownik Zakładu Chemii Bionieorganicznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Muszyńskiego 1
90-151 Łódź
e-mail: justyn.ochocki@umed.lodz.pl

Łódź, 15 sierpnia 2020

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej
mgr Katarzyny Krupa pt.

„Oddziaływanie jonów Cu(II) z białkami Fada i P1 bakterii Fusobacterium nucleatum”

Rozprawa doktorska zasługuje na wyróżnienie ze względu na nowatorski oraz interdyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań, który pozwoli na powiązanie bakterii *Fusobacterium nucleatum* z nowotworem jelita grubego i może przyczynić się do zaproponowania nowego mechanizmu nowotworzenia.

Przeprowadzone przez Autorkę badania na całej komórce bakteryjnej *Fusobacterium nucleatum* udowodniły, że w obecności jonów miedzi(II) i nadtlenu wodoru, bakteria ta zdolna jest do generowania wolnych rodników. Autorka rozprawy stwierdza, że powstają one na zewnątrz komórki bakteryjnej, co może potwierdzać tezę o zaangażowaniu białek powierzchniowych w proces powstawania wolnych rodników. Reaktywne formy tlenu są wytwarzane głównie poza komórką bakteryjną, co sugeruje, że białka błony zewnętrznej mogą brać udział w procesie utleniania.

Wyniki badań zostały opublikowane w postaci 3 oryginalnych prac w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym w latach 2018-2020 : *Journal of Inorganic Biochemistry* (2018, 2019) i *Future Microbiology* (2020) z listy JCR. Należy podkreślić fakt, że w dwóch publikacjach (*J. Inorg. Biochem.*) Pani mgr Katarzyna Krupa jest pierwszym autorem a w jednej z nich autorem do korespondencji.

Praca jest opracowana bardzo starannie w aspekcie edytorskim i graficznym.

