

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

mgr Katarzyna Krupa

Promotor: dr hab. Maria Korabik, prof. UW

Wiele badań wskazuje na związek pomiędzy rakiem jelita grubego, a bakterią *Fusobacterium nucleatum*. Dokładny mechanizm prowadzący do rozwoju tej choroby jest cały czas badany przez naukowców z różnych ośrodków. Jedną z hipotez zakłada zdolność bakterii *Fusobacterium nucleatum* do generowania reaktywnych form tlenu (RFT) w obecności jonów metali przejściowych np.: miedzi(II) oraz endogennych utleniaczy. Wiadomo, że nagromadzenie się RFT w organizmie może skutkować wystąpieniem stanu zapalnego, w trakcie którego obserwuje się również podwyższony poziom jonów miedzi(II). Ta dość silna korelacja pomiędzy RFT, a jonami miedzi(II) oraz *Fusobacterium nucleatum*, a rakiem jelita grubego stała się punktem wyjścia dla badań prowadzonych w ramach tej dysertacji.

W ramach przedstawianej pracy scharakteryzowano właściwości koordynacyjne dwóch fragmentów białka FadA oraz dziewięciu fragmentów białka P1 bakterii *Fusobacterium nucleatum* względem jonów miedzi(II). Do realizacji postawionego celu zastosowano szereg metod spektroskopowych takich jak: UV-Vis, CD, EPR, a także NMR. Ponadto, wykonane obliczenia teoretyczne (DFT) potwierdziły i wsparły zaproponowane modele koordynacyjne dla kompleksów z fragmentami białka FadA. Równie istotnym celem badań było określenie stechiometrii oraz stałych trwałości powstających miedziowych kompleksów w roztworze wodnym. W celu realizacji tego założenia przeprowadzono miareczkowanie potencjometryczne w funkcji pH roztworu. Dodatkowo do potwierdzenia stechiometrii powstających kompleksów wybrano spektrometrię mas (MS). Obliczone zostały także wartości $\log K^*$, które umożliwiły porównanie siły oddziaływania pomiędzy poszczególnymi kompleksami o tym samym sposobie wiązania jonu miedzi(II).

Z punktu założeń tematyki podjętych badań niezwykle istotne okazało się również zbadanie czy wybrane ligandy peptydowe, a także ich kompleksy z jonami miedzi(II) są zdolne do generowania reaktywnych form tlenu (RFT). Do detekcji RFT zastosowano metody spektroskopowe (UV-Vis i luminescencję) wraz z odpowiednio selektywnymi związkami będącymi molekułami raportującymi. Dodatkowo dla wybranych związków zastosowano

także technikę poziomej elektroforezy żelowej za pomocą której możliwa była nie tylko identyfikacja powstających rodników ale również ocena uszkodzeń plazmidowego DNA.

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

Przeprowadzone badania wykazały, że badane peptydowe ligandy zdolne są do tworzenia w roztworze wodnym z jonem miedzi(II) zarówno kompleksów monojądrowych (o stosunku molowym metalu do liganda 1:1 oraz 1:2) jak i polijądrowych. Nie wykazano udziału grupy karboksylowej z łańcucha bocznego kwasu glutaminowego w wiązaniu jonu miedzi(II). Natomiast stwierdzono, że pozycja reszty histydylowej wpływa na kierunek procesu wiązania jonu metalu. Ponadto wszystkie ligandy zawierające dwie reszty histydylowe

w sekwencji aminokwasowej tworzą kompleksy o dużym rozpowszechnieniu w pH 5,5 charakteryzujące się podobną stabilnością. Wyjątkiem okazuje się kompleks Cu(II)-Ac-FGEH⁴EH⁶GRDYKNGWE-NH₂ dla którego wartość logK* była o około rząd wielkości wyższa w porównaniu do wszystkich pozostałych kompleksów. Najprawdopodobniej na stabilizację tego kompleksu ma wpływ obecność reszty tryptofanu i wynikające z tego oddziaływania kation- π oraz interakcje pomiędzy pierścieniami reszty tryptofanu i histydyny.

Zaobserwowano, że efektywność generowania rodnika hydroksylowego związana jest z ilością reszt histydylowych w badanych sekwencjach aminokwasowych. Bowiem wiązanie jonu miedzi(II) przez ligandy zawierające jedną resztę histydylową stymuluje do tworzenia większych ilości tego rodnika w porównaniu do wolnych ligandów. Z kolei w przypadku kompleksów z ligandami zawierającymi dwie lub trzy reszty histydylowe w sekwencjach aminokwasowych reakcja ta przebiega z mniejszą wydajnością w porównaniu do wolnych ligandów.

Przeprowadzone wstępne badania na całej komórce bakteryjnej *Fusobacterium nucleatum* udowodniły, że w obecności jonów miedzi(II), a także nadtlenu wodoru, bakteria ta zdolna jest do generowania wolnych rodników. Dodatkowo stwierdzono, że powstają one na zewnątrz komórki bakteryjnej, co częściowo może potwierdzać tezę o zaangażowaniu białek powierzchniowych w proces powstawania rodników.

Badania prowadzone w ramach tej dysertacji stanowią duży wkład oraz wzbogacenie wiedzy z zakresu chemii bionieorganicznej. Ponadto interdyscyplinarny charakter badań

pozwala na powiązanie *Fusobacterium nucleatum* z nowotworem jelita grubego i zaproponowanie nowego mechanizmu nowotworzenia.