



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

Toruń, 07.08.2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Katarzyny Lesiów

pt. *„Charakterystyka i aktywność prooksydatywna kompleksów Cu(II)
z fragmentami białka FomA Fusobacterium nucleatum”*

Recenzowana interdyscyplinarna rozprawa doktorska mgr Moniki K. Lesiów wykonana w Zespole Zastosowań Strukturalnych EPR Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem dr hab. Aliny Bieńko, prof. UW r i dr Urszuli Komarnickiej jako promotora pomocniczego, ukierunkowana jest na poznanie wolnorodnikowych procesów kancerogenezy jelita grubego. Aktualność tej tematyki badawczej wynika przede wszystkim z nieefektywności metod wykrywania, monitorowania i leczenia, które powodują, że nowotwór ten zajmuje drugie miejsce wśród zachorowań u obu płci, a drugie i trzecie miejsce, odpowiednio u mężczyzn i kobiet, w strukturze umieralności. W świetle tych statystyk istnieje więc pilna potrzeba opracowania skutecznej metody leczenia tego nowotworu. Dlatego też mgr Monika Lesiów włączyła swój wysiłek badawczy do współczesnych poszukiwań nauki światowej aby przybliżyć odpowiedź na pytanie: „Czy są szanse na skuteczniejsze leczenie nowotworu jelita grubego?” W tym kontekście głównym celem badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej było określenie wpływu kompleksowania białek powierzchniowych *Fusobacterium nucleatum* jonami miedzi(II) na generowanie RFT prowadzących ostatecznie do procesu nowotworzenia komórek śródbłonkowych jelita grubego. Realizacja nadrzędnego celu badań wymagała przede wszystkim reprezentatywnego doboru fragmentów peptydowych, imitujących potencjalne miejsca wiązania jonów miedzi(II). Autorka w oparciu o znajomość sekwencji aminokwasowej i struktury białka FomA wyselekcjonowała 7 fragmentów posiadających różną liczbę histydylowych reszt aminokwasowych w sekwencji peptydowej (od jednej do trzech reszt His) zdolnych do



koordynowania jonów miedzi(II). Tematyka ta jest kontynuacją badań realizowanych przez zespół Pani prof. Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk[†], w którym Autorka rozpoczynała badania naukowe w ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej.

Z formalnego punktu widzenia oceniana rozprawa doktorska zawarta jest na 318 stronach maszynopisu i posiada układ typowy dla opracowań opartych na eksperymencie: wprowadzenie, wykaz stosowanych skrótów i symboli, cele pracy oraz formy ich realizacji, przegląd literaturowy, metody stosowane w badaniach strukturalnych oraz aktywności rodnikotwórczej układów Cu(II)-peptyd; część doświadczalna, wyniki i dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis rysunków i tabel, dorobek naukowy, bibliografia. Dodatkowo do rozprawy doktorskiej dołączono kopie 5 własnych artykułów naukowych wchodzących w zakres badań opisanych w rozprawie doktorskiej oraz kartę z wzorami stosowanych fragmentów peptydowych.

Ocena merytoryczna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa rozpoczyna się krótkim ogólnym wprowadzeniem uzasadniającym potrzebę podjętych przez mgr M. Lesiów prac badawczych. Następnie, w rozdziale „Przegląd literaturowy” Doktorantka omówiła kluczową rolę mikroflory jelitowej (szczególnie *Fusobacterium nucleatum*) w procesie kancerogenezy, która prawdopodobnie odpowiedzialna jest za pobudzanie komórek do produkcji reaktywnych form tlenu poprzez adhezję błony zewnętrznej białka bakterii do receptorów znajdujących się na powierzchni jelita grubego lub koordynację jonów Cu(II) do białka powierzchniowego. W dalszej części Autorka uwagę czytelnika kieruje na rolę jonów miedzi(II) w układach biologicznych i ich oddziaływanie z ligandami. Rozbudowanie tego podrozdziału o aktualny przegląd piśmiennictwa dotyczący kompleksowania peptydów jonami Cu(II) oraz roli tych układów w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu ludzkiego dodatkowo przekonuje czytelnika o słuszności wyboru tematu rozprawy doktorskiej i pozwala Autorce na precyzyjne określenie celów pracy wśród których wymienić należy: **i)** określenie struktury i trwałości termodynamicznej kompleksów miedzi(II) z wybranymi fragmentami białka FomA *Fusobacterium nucleatum*; **ii)** zbadanie zdolności peptydowych kompleksów Cu(II) do generowania reaktywnych form tlenu (RFT) i określenie ich wpływu na peroksydację; **iii)** określenie cytotoksyczności *in vitro* oraz zdolności badanych kompleksów do akumulowania się we wnętrzu mysiej komórki nowotworowej okrężnicy CT26; **iv)** określenie



przeżywalności szczepu bakteryjnego *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* DSM 20482 w obecności badanych związków.

Pragnę podkreślić, że Doktorantka bardzo starannie przygotowała się teoretycznie do wykonania części oryginalnej pracy. Wnikliwie przedstawiła najbardziej istotne zagadnienia, stanowiące tło problemów poruszanych bezpośrednio już w badaniach objętych rozprawą doktorską. Zrobiła to w bardzo dobrym stylu językowym w oparciu o najnowsze piśmiennictwo naukowe (175 pozycji literaturowych), w dużej mierze pochodzące z ostatnich 10 lat, co świadczy o aktualności tematyki badawczej.

„Część doświadczalna” rozprawy zawiera szczegółowe wyjaśnienie wyboru 7 fragmentów białka FomA bakterii *Fusobacterium nucleatum*, które zostały syntezowane przez zespół prof. dr. hab. Krzysztofa Rolki z Wydziału Chemii UG, jak również metodologię eksperymentów obejmujących badania strukturalne, aktywności rodnikotwórczej, mikrobiologicznej i cytotoksycznej *in vitro*.

Kolejny rozdział „Wyniki i dyskusja” jest najobszerniejszy (161 stron) i zawiera wyniki badań własnych oraz ich wnikliwą analizę i dyskusję, które stanowi wiarygodną bazę do formułowania wniosków końcowych. W pierwszej części tego opracowania przedstawiono dane eksperymentalne dotyczące określenia sposobu wiązania jonów Cu(II) z wybranymi ligandami peptydowymi w szerokim zakresie pH (2,5-10,5) z wykorzystaniem miareczkowania potencjometrycznego, MS, CD, UV-Vis i EPR.

W drugiej części tego rozdziału Doktorantka zaprezentowała wyniki własne dotyczące oceny aktywności prooksydacyjnej kompleksów Cu(II) z badanymi fragmentami białka FomA, gdzie monitorowała tworzenie reaktywnych form tlenu w obecności H₂O₂, Asc lub H₂O₂/Asc z wykorzystaniem elektronowej spektroskopii emisyjnej i absorpcyjnej UV-Vis, pułapkowania spinowego EPR, elektroforezy żelowej. Uzyskane rezultaty potwierdzające obecność RFT w badanych układach zachęciły Doktorantkę do podjęcia dalszych badań na mysich komórkach raka okrężnicy CT26 i szczepie *F. nucleatum* DSM 20482. Godnym podkreślenia jest fakt samodzielnego wykonania przez Doktorantkę badań mikrobiologicznych i cytotoksycznych *in vitro* w ramach stażów naukowych w Zespole Fizykochemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej Wydziału Chemii UJ w Krakowie kierowanym przez prof. dr. hab. Grażynę Stochel i Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Wydziału Nauk



Biologicznych UW we Wrocławiu kierowanym przez prof. dr hab. Gabrielę Bugłę-Płoskońską. Często tego rodzaju badania odbywają się w zaprzyjaźnionym zespole bez udziału chemika.

Wszystkie dane eksperymentalne są bardzo starannie opracowane i udokumentowane reprezentatywnymi widmami oraz opatrzone odpowiednim komentarzem. Szczególnie pomocne w analizie danych otrzymanych przez Doktorantkę jest ich prezentacja na rysunkach (159 rysunków) i zestawienie w tabelach (43 tabele), co pozwala na ich szybką analizę i porównanie.

Olbrzymi nakład pracy włożony w realizację założonych celów ma swoje odzwierciedlenie w kolejnym rozdziale, gdzie Autorka przedstawiła najważniejsze wnioski. Do niewątpliwych osiągnięć wśród bogatego materiału doświadczalnego prezentowanego w tej części rozprawy doktorskiej należy zaliczyć:

- 1) przedstawienie szerokiej i bardzo merytorycznej dyskusji nad czynnikami determinującymi geometrię i sposób koordynacji fragmentów peptydowych do Cu(II) oraz ich termodynamiczną stabilność;
- 2) wykazanie, że fragmenty białka FomA z jonami Cu(II) w obecności H_2O_2 , Asc i H_2O_2 /Asc generują RFT i mogą stanowić reprezentatywny model do badania interakcji Cu(II)-białko;
- 3) udowodnienie, że peptydowe kompleksy Cu(II) stymulują nowotworowe komórki jelita grubego CT26 do wewnątrzkomórkowego wyrzutu RFT prowadzącego do uszkodzenia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

Praca została napisana bardzo dobrze od strony językowej. Za szczególnie mocną jej stronę należy uznać też szaty graficzną i edytorską. Oczywiście w tego rodzaju rozprawach nie sposób uniknąć pewnego rodzaju nieścisłości i nielicznych błędów edytorskich. Usterki te nie wpływają jednak na moją całkowitą bardzo pozytywną ocenę pracy. W trakcie lektury nasunęły mi się pewne uwagi i problemy do dyskusji o wyjaśnienie, których poproszę Autorkę dysertacji:

uwagi

- 1) stężenie mianowanego roztworu należy podawać z większą dokładnością (rozdział 4.2.1.1)
- 2) w przypisach bibliograficznych zabrakło nr tomu i nr stron.

problem do dyskusji

- 1) proszę o wykazania korelacji pomiędzy sposobem wiązania jonów Cu(II) a aktywnością prooksydatywną ich kompleksów, o których Autorka wspomina na stronie 264.



- 2) czy Doktorantka mogłaby przedstawić kierunki dalszych badań stanowiących kontynuację prac badawczych ujętych w pracy doktorskiej, czy też propozycję innych tematów badawczych, które warto byłoby zainteresowania?

Podsumowując swoją recenzję stwierdzam, że mgr Monika K. Lesiów wykazała się umiejętnością posługiwania się współczesnymi technikami spektroskopowymi, analitycznymi i eksperymentami biologicznymi do rozwiązywania problemów naukowych z pogranicza chemii i biologii. W pełni zrealizowała ambitny cel pracy uzyskując bardzo ważne wyniki naukowe, które z powodzeniem opublikowała w 5 wieloautorskich artykułach w bardzo dobrych czasopismach z bazy JCR o zasięgu światowym: *Dalton Trans.*, *Metallomics* (2); *Chemical Research in Toxicology*; *Future microbiology* (sumaryczny IF > 17). W czterech publikacjach mgr M. Lesiów jest pierwszym autorem, co wyraźnie wskazuje na Jej wiodącą rolę w przeprowadzaniu eksperymentów i dyskusji wyników. Dorobek naukowy Doktorantki uzupełniają kolejne 3 wieloautorskie publikacje naukowe (IF>10), 3 artykuły w *Wiadomościach Chemicznych* oraz 8 prezentacji na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Intensywny rozwój naukowy Doktorantki o którym wspomniałam powyżej to w dużej mierze zasługa promotorki dysertacji, Pani Profesor Aliny Bieńko, która jak to podkreśliła na wstępie Autorka była „Idealnym Szefem”.

W konkluzji stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdzające 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.* (wraz z późniejszymi zmianami). Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Moniki K. Lesiów do dalszych etapów przewodu doktorskiego i do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Jednocześnie z uwagi na innowacyjność i wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej, omówioną przeze mnie we wcześniejszej części recenzji, wnoszącej znaczący wkład nie tylko do rozwoju chemii koordynacyjnej i bionieorganicznej, ale również w rozwiązywanie problemów farmakologicznych w leczeniu nowotworu jelita grubego **wnioskuję** do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne UW r o **wyróżnienie** rozprawy.