

Streszczenie

Inspiracją do podjęcia badań opisanych w niniejszej dysertacji były przesłanki literaturowe świadczące o istnieniu silnego związku pomiędzy obecnością bakterii *Fusobacterium nucleatum* (Fn) w tkankach jelita grubego, a nowotworem tego narządu. Do tej pory, udowodniono znaczne nagromadzenie populacji Fn, wysoki poziom jonów miedzi(II) a także wzmożoną generację reaktywnych form tlenu (RFT) w tkankach nowotworowych jelita grubego. ***Wymienione składowe zatem stały się wyznacznikiem do powstania tej dysertacji, która jest swoistą próbą opisanie wstępnego mechanizmu wolnorodnikowych procesów kancerogenezy jelita grubego z udziałem Fn i jonów Cu(II).***

W pierwszej części pracy przedstawiono charakterystykę sposobu wiązania jonów Cu(II) do siedmiu ligandów peptydowych (sześć liniowych i jeden cykliczny), będących fragmentami białka FomA bakterii Fn. Zaprojektowane ligandy charakteryzują się różną ilością reszt histydylowych (His) w sekwencjach (od jednej do trzech reszt His). Miareczkowanie potencjometryczne umożliwiło wyznaczenie sumarycznych stałych trwałości ($\log\beta$) i stałych deprotonacji (pK_a) poszczególnych form kompleksowych. Ponadto, określono stechiometrię powstałych kompleksów i ich stabilność (wartość $\log K^*$), którą porównano z literaturowymi kompleksami Cu(II). Dodatkowo, stechiometrię kompleksów potwierdzono poprzez wykorzystanie spektrometrii mas (MS). Komplementarne metody spektroskopowe: elektronowa spektroskopia absorpcyjna w zakresie UV-Vis, spektroskopia dichroizmu kołowego (CD) oraz spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) pozwoliły na zaproponowanie modeli koordynacyjnych dla określonych form kompleksowych. ***Udowodniono tworzenie mono-, di- lub trijądrowych kompleksów Cu(II) w roztworze wodnym w zależności od badanego układu.***

Nadrzędnym celem pracy było jednak zbadanie aktywności prooksydatywnej jonów Cu(II) po ich skoordynowaniu do ligandów peptydowych w obecności H_2O_2 , kwasu askorbinowego (Asc) lub ich mieszaniny H_2O_2 /Asc. Znając model koordynacyjny układów Cu(II)-peptyd w pH jelita grubego (zakres 5,5-7,5), zbadano ich reaktywność w roztworze wodnym. Stosując elektronową spektroskopię absorpcyjną i emisyjną, technikę pułapkowania spinowego EPR oraz elektroforezę w żelu agarozowym udowodniono, że najwyższy poziom RFT tworzą peptydowe kompleksy Cu(II). ***Tworzące się RFT zidentyfikowano jako rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), tlen singletowy (1O_2) oraz rodnik nadtlenkowy ($RO_2\cdot$). Udowodniono natomiast, że kompleksy Cu(II) nie generują anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2\cdot^-$).*** Ponadto, wyprodukowane RFT przyczyniają się do jedno- i dwuniciowych cięć DNA. ***Co więcej, spostrzeżono, że liczba imidazolowych atomów azotu skoordynowanych do jonu Cu(II) jak i cyklizacja łańcucha peptydowego wpływa na ilość tworzonych RFT.***

Ważnym aspektem pracy była jej interdyscyplinarność, która znacznie wykracza poza dziedzinę chemii. W związku z tym, w ramach staży naukowych, samodzielnie wykonano liczne eksperymenty biologiczne (*in vitro* na komórkach jelita grubego CT26) oraz mikrobiologiczne (z wykorzystaniem szczepu bakteryjnego *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* DSM 20482).

Wykazano, że fragmenty białka FomA wraz z jonami Cu(II) mogą stanowić reprezentatywny model do badania interakcji Cu(II)-białko bakterii-komórka gospodarza, ponieważ nie wnikają do wnętrza komórki (zastosowanie spektrometrii mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie, ICP-MS). Peptydowe kompleksy Cu(II) stymulują komórkę CT26 do wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej produkcji RFT (wykorzystanie elektronowej spektroskopii emisyjnej w zakresie UV-Vis oraz techniki pułapkowania spinowego EPR). ***Ostatecznie wykazano, że***

badane kompleksy Cu(II) prowadzą do wewnątrzkomórkowego wyrzutu RFT, które uszkadzają wielonienasycone kwasy tłuszczowe, prowadząc do powstawania dialdehydu malonowego (MDA) w komórce.

Ponadto, przeprowadzono badania, które pozwoliły określić przeżywalność beztlenowej *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* DSM 20482 w obecności jonów Cu(II) i H₂O₂ w ekspozycji na warunki tlenowe. Udowodniono, że śmierć komórek bakteryjnych następuje po 90 minutach. W ostatecznym kroku udowodniono, że żywy organizm jakim jest *Fn* w obecności jonów Cu(II) i H₂O₂ jest zdolny do generacji RFT (zastosowanie elektronowej spektroskopii absorpcyjnej w zakresie UV-Vis).

Powyższe osiągnięcia szczegółowo zostały opisane w następujących publikacjach:

1. Lesiów M. K., Komarnicka U. K., Stokowa-Soltys K., Rolka K., Łęgowska A., Ptaszyńska N., Wieczorek R., Kyziół A., Jeżowska-Bojczuk M., „Relationship between copper(II) complexes with FomA adhesin fragments of *F. nucleatum* and colorectal cancer. Coordination pattern and ability to promote ROS production.” **Dalton Transactions**, 2018, **47**, 5445-5458.
2. Lesiów M. K. (autor korespondencyjny), Pietrzyk P., Bieńko A., Kowalik-Jankowska T., “Stability of Cu(II) complexes with FomA protein fragments containing two His residues in the peptide chain.” **Metallomics**, 2019, **11**, 1518-1531.
3. Lesiów M. K. (autor korespondencyjny), Komarnicka U. K., Kyziół A., Bieńko A., Pietrzyk P., “ROS-mediated lipid peroxidation as a result of Cu(II) interaction with FomA protein fragments of *F. nucleatum*: relevance to colorectal carcinogenesis.” **Metallomics**, 2019, **11**, 2066-2077.
4. Lesiów Monika K. (autor korespondencyjny), Pietrzyk P., Kyziół A., Komarnicka U. K. “Cu(II) complexes with FomA protein fragments of *Fusobacterium nucleatum* increase oxidative stress and malondialdehyde level.” **Chemical Research in Toxicology**, 2019, **32**, 2227-2237.
5. Kędziora A., Lesiów M. K., Krupa K., Korzeniowska-Kowal A., Adamski R., Komarnicka U. K., Stokowa-Soltys K., Bugla-Płoskońska G., Jeżowska-Bojczuk M. “Protocol of proceedings with *Fusobacterium nucleatum* and optimization of ABTS method for detection of reactive oxygen species.” **Future Microbiology**, 2020, **15**, 259-271.