

Gdańsk, 12 sierpnia 2022 r.

prof. hab. dr inż. Agata Kot-Wasik

Katedra Chemii Analitycznej

Wydział Chemiczny

Politechnika Gdańska

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Fidor

**pt.: „Peptides produced by the Baltic cyanobacterium *Nostoc edaphicum* CCNP1411 – structure and biological activity”** wykonanej w Zakładzie Biotechnologii Morskiej (Instytut Oceanografii)

Wydziału Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego  
pod kierunkiem promotora pani prof. dr hab. Hanny Mazur-Marzec

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska obejmuje wszechstronnie przeprowadzone badania strukturalne i aktywności biologicznej peptydów produkowanych przez bałtycką cyanobakterię *Nostoc edaphicum* CCNP1411. Podejmując się oceny recenzji pracy doktorskiej realizowanej w grupie badawczej pani Profesor Hanny Mazur-Marzec kierowałam się dużym zainteresowaniem i ciekawością naukową odnośnie postępów w analityce cyanobakterii. Osiągnięcia Zespołu Pani Profesor są duże i mają interdyscyplinarny charakter.

Cyanobakterie taksonomicznie należą do bakterii i zaliczane są do najstarszych organizmów występujących na Ziemi - są prawdziwymi pionierami świata organicznego. Większość z tych organizmów wykazuje dużą zdolność przystosowania się do warunków środowiska: mogą osiedlać się w najbardziej niegościnnych ekosystemach występując w glebie, na skałach, na korze drzew, na lodowcach, a nawet w gorących źródłach. Niektóre gatunki wchodzą w skład porostów, żyją w symbiozie z wodnymi paprociami (*Azolla*), sagowcami, wątrobowcami i gwałikami. Występują zarówno w wodach słonych, jak i śródlądowych, unosząc się swobodnie w toni wodnej pośród innych grup fitoplanktonu (m.in. zielenic, okrzemek, bruzdnic, kryptofitów, euglenin) lub tworząc maty bentosowe na dnie zbiorników. Mogą wykorzystywać szerokie spektrum światła, są odporne na złe warunki tlenowe, tolerują wysokie wartości pH. Cyanobakterie są źródłem biologicznie aktywnych metabolitów, w tym toksyn oraz związków o ogromnym potencjale zastosowania. Cyanobakterie stanowią cenne źródło substancji biologicznie czynnych posiadających m.in. właściwości związków przeciwnowotworowych, przeciwwirusowych, przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybowych, przeciwmalarycznych i algicydów - związki te mogą znaleźć szerokie zastosowanie w medycynie, farmacji, biotechnologii, a także w różnorodnych gałęziach przemysłu kosmetycznego, spożywczego, tekstylnego i morskiego.

Szczególna rola przypisywana jest peptydom. Ich identyfikacja i ujawnienie potencjału mikroorganizmów pochodzących z Morza Bałtyckiego jako związków o istotnej aktywności biologicznej skutkujących farmaceutycznym czy biotechnologicznym wykorzystaniem to tematyka badawcza - według mojej opinii - w pełni aktualna, a zaprezentowane obszerne badania nie są wcześniej opisywane w literaturze. Niewątpliwie wybór tematyki jest ważny z naukowego punktu widzenia, dlatego uważam go za w pełni uzasadniony. Przyznam, że wzbudził moje duże zainteresowanie.

Pod względem analitycznym cel postawiony został wysoko, doceniam zaplanowane logicznie eksperymenty, kolejność podejmowanych zadań świadcząca o metodycznym podejściu. Zastosowany warsztat aparaturowy także wzbudził moje uznanie.

Autorka badań postawiła sobie bardzo ambitny cel, zrealizowała go i przedstawiła w postaci rozprawy doktorskiej.

Z formalnego punktu widzenia oceniana rozprawa napisana jest w języku angielskim i obejmuje 158 stron maszynopisu podzielonych na szereg rozdziałów, wśród których można wymienić części typowe dla tego typu dzieł: spis treści, wstęp (krótki, zwięzły, obejmujący 2 strony), cel pracy (jasno sformułowany i zawarty na 1 stronie), opis materiałów i metodyk pracy doświadczalnej (zebrany materiał zawarto na 5 stronach), wyniki i dyskusja (przestawione na 6 stronach), podsumowanie (zwięzłe, treściwe zamieszczone na 1 stronie) i literatura (7 stron, starannie dobrane 94 pozycje literaturowe) oraz 4 publikacje (łącznie obejmujące 125 stron). Efekty prac zawarte w czterech publikacjach naukowych stanowią zwartą całość przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej. Publikacje naukowe opublikowane są w renomowanych czasopismach: *Marine Drugs* (IF=5.79) oraz *Biomolecules* (IF=4.569). W trzech z tych prac pani mgr Anna Fidor jest pierwszym autorem. Taki dorobek naukowy w przypadku tak młodego naukowca, jakim jest pani mgr Anna Fidor, jest godny uznania.

Tekst rozprawy został napisany poprawnym językiem. Autorka rozprawy doktorskiej znacząco utrudniła recenzentowi zadanie doszukania się niejasności i uchybień dbając o poprawność pod kątem merytorycznym i językowym. Doszukałam się zaledwie kilku potknięć.

Opisy problemu badawczego, jak i sposobu jego realizacji oraz uzyskane wyniki są zaprezentowane kompleksowo i poruszają wszystkie ważne aspekty, co świadczy o dużej wiedzy Doktorantki i dobrej znajomości tematu. W tym miejscu przedstawię najważniejsze osiągnięcia Doktorantki zaprezentowane w publikacjach:

1. „*Bioactive Peptides Produced by Cyanobacteria of the Genus Nostoc: A Review*” Anna Fidor, Robert Konkel, Hanna Mazur-Marzec, *Marine drugs* 2019, 17(10), 561; doi.org/10.3390/md17100561

W w/w pracy przeglądowej autorzy skupili się na najszerzej zbadanych peptydach wytwarzanych przez cyjanobakterie z rodzaju *Nostoc*. Materiał przedstawiony jest w sposób logiczny, kompletny i przejrzysty, a treści wzbogacone licznymi rysunkami stanowią insertującą lekturę w oparciu o aktualny stan wiedzy. Omówiono strukturę i aktywność biologiczną biocząsteczek takich jak: peptydy nierybosomalne (NRP) i poliketydy (PK), kryptoficyny, nostocyklopeptydy, cyjanowiryna-

N, nostoficyna, nostosyna, nostopeptolidy, nostoweipeptydy i baniazyna, mikrocytyny, cyjanopeptoliny, mikroginy i anabaenopeptyny. Zamieszczone treści dowodzą wiedzy Doktorantki oraz umiejętności studiowania i analizowania problemów badawczych na podstawie odpowiednio dobranego piśmiennictwa. Niewątpliwie, ta część rozprawy stanowi właściwe wprowadzenie do realizacji zaplanowanego celu badań i interpretacji otrzymanych wyników. Ta obszerna praca przeglądowa zawiera 122 pozycje literaturowe i jest już cytowana 22 razy, co dobitnie świadczy o aktualności podjętej tematyki, jak i wartościowym opracowaniu. Wszyscy autorzy tej publikacji byli w równym stopniu zaangażowani w planowanie, dyskusję i pisanie artykułu.

2. „*Cyanopeptolins with Trypsin and Chymotrypsin Inhibitory Activity from the Cyanobacterium Nostoc edaphicum CCNP1411*” Hanna Mazur-Marzec, Anna Fidor, Marta Cegłowska, Ewa Wieczerek, Magdalena Kropidłowska, Marie Goua, Jenny Macaskill, Christine Edwards. *Marine drugs* 2018, 16(7), 220. doi.org/10.3390/md16070220

W tej pracy przedstawiono badania trzynastu cyjanopeptolin (CP). Cyjanopeptoliny to jedne z najczęściej występujących peptydów sinicowych, wiele z nich to inhibitory proteaz serynowych. Niektóre warianty CP są także ostro toksyczne dla organizmów środowiska wodnego. Zidentyfikowano dwanaście nowych wariantów CP wykrytych w cyjanobakterii *Nostoc edaphicum* CCNP1411 wyizolowanej z Zatoki Gdańskiej (południowy Bałtyk). Identyfikację struktury przeprowadzono tandemową spektrometrią mas, a weryfikacji dokonano techniką NMR (dla CP962 i CP985). CP zawierające argininę (CPs-Arg2) hamowały trypsynę przy niskich wartościach IC50 i wykazywały łagodną aktywność przeciw chymotrypsynie, podczas gdy CP zawierające tyrozynę (CPs-Tyr2) były selektywnie i silnie aktywne przeciw chymotrypsynie. Podczas testów enzymatycznych zaobserwowano brak degradacji peptydów. Żaden z CP nie był aktywny przeciw trombinie, elastazie lub fosfatazie białkowej 1. Dwa CP (CP962 i CP985) nie miały wpływu cytotoksycznego na komórki raka piersi MCF-7. Silne i selektywne działanie nowych wariantów cyjanopeptolin sprawia, że są to potencjalni kandydaci do opracowania leków przeciw zaburzeniom metabolicznym i innym chorobom. Praca oparta jest na 58 odnośnikach literaturowych. Ogrom pracy badawczej przedstawionej w tej publikacji jest godny podziwu. Pani Fidor odpowiedzialna była za analizy LC-MS/MS, testy hamowania enzymów, interpretację wyników, przygotowanie manuskryptu.

3. „*Nostoc edaphicum CCNP1411 from the Baltic Sea-A New Producer of Nostocyclopeptides*” Anna Fidor, Michał Grabski, Jan Gawor, Robert Gromadka, Grzegorz Węgrzyn, Hanna Mazur-Marzec, *Marine Drugs* 2020, 18(9) 442. doi: 10.3390/md18090442.

Jak dotąd tylko trzy analogi strukturalne, Ncp-A1, Ncp-A2 i Ncp-M1 oraz ich formy liniowe zostały zidentyfikowane w szczepach *Nostoc* jako naturalnie wytwarzane cyjanometabolity. W pracy określono pełną sekwencję genomu nowego producenta Ncps, *N. edaphicum* CCNP1411 z Morza Bałtyckiego. Genom składa się z kolistego chromosomu (7733505 pz) i pięciu kolistych plazmidów (od 44,5 kb do 264,8 kb). Zidentyfikowano i scharakteryzowano *in silico* klaster genów biosyntezy nostocyclopeptydów (zlokalizowany pomiędzy pozycjami 7 609 981-7 643 289 pz chromosomu).

Analizy LC-MS/MS ekstraktów komórkowych *N. edaphicum* CCNP1411 ujawniły kilka produktów genów. Oprócz znanych peptydów, Ncp-A1 i Ncp-A2, wykryto sześć innych związków zdefiniowanych jako nowe analogi noktocyklopeptydów. Obejmuje to Ncp-E1 i E2 oraz ich formy liniowe (Ncp-E1-L i E2-L), cykliczny Ncp-E3 i liniowy Ncp-E4-L. Stwierdzono, że zawartość liniowych nostocyklopeptydów w komórkach jest wyższa niż cyklicznych, co sugeruje wolne tempo procesu makrocyklizacji. Badania przeprowadzono na szczepie *Nostoc* CCNP1411 wyizolowanym w 2010 roku z Zatoki Gdańskiej południowego Bałtyku. Praca oparta jest na 60 odnośnikach literaturowych. Pani Fidor odpowiedzialna była za część badawczą i przygotowanie manuskryptu. Dołączone oświadczenia współautorów nie budzą wątpliwości co do wiodącej roli pani Fidor.

4. „*Nostocyclopeptides as New Inhibitors of 20S Proteasome*” Anna Fidor, Katarzyna Cekała, Ewa Wieczerzak, Marta Cegłowska, Franciszek Kasprzykowski, Christine Edwards, Hanna Mazur-Marzec, *Biomolecules* 2021, 11(10), 1483; doi.org/10.3390/biom11101483

W tej pracy przedstawiono sześć nostocyklopeptydów (Ncps) wyizolowanych z *Nostoc edaphicum* szczep CCNP1411. Nostocyklopeptydy to niewielka klasa wytwarzanych bioaktywnych peptydów nierybosomalnych wyłącznie przez cyjanobakterie z rodzaju *Nostoc*. Bioaktywność tych związków została przetestowana *in vitro* wobec 20S proteasom, kompleks proteolityczny, który odgrywa ważną rolę w utrzymaniu proteostazy komórkowej. Dysfunkcja kompleksu prowadzi do wielu zaburzeń patologicznych. Testy wykazały selektywną aktywność określonych wariantów Ncp. Dla dwóch liniowych aldehydów peptydowych, Ncp-A2-L i Ncp-E2-L, wykazano hamujący wpływ na aktywność chymotrypsynopodobną, podczas gdy wariant cykliczny Ncp-A2, inaktywował podobne do trypsyny miejsce tego kompleksu enzymatycznego. Potwierdzono, że grupa aldehydowa jest ważnym elementem inhibitorów aktywności podobnej do chymotrypsyny. Nostocyklopeptydy, jak nowe inhibitory proteasomu 20S, zwiększyły liczbę naturalnych produktów, które można wziąć pod uwagę jako potencjalne regulatory procesów komórkowych. Praca oparta jest na 60 odnośnikach literaturowych. Pani Fidor odpowiedzialna była za koncepcję pracy, wykonanie części badawczej i przygotowanie manuskryptu. Dołączone oświadczenia współautorów nie budzą wątpliwości co do wiodącej roli pani Fidor.

Z nieukrywanym zainteresowaniem zapoznałam się treścią wyżej omówionych publikacji. Są one wszystkie dowodem dojrzałości naukowej pani mgr Anny Fidor oraz naukowym potwierdzeniem słuszności podjętych badań.

Po lekturze nasunęły się mi następujące pytania:

Czy podczas identyfikacji z użyciem techniki LC-MS określała Pani dokładność wyznaczenia masy? czy zmierzona wartość zgodna była z wartością rzeczywistą?

Czy obserwowała Pani niestabilność w odpowiedziach detektora MS w dłuższym przedziale czasowym i jak ją eliminowała? - to znany problem podczas stosowania techniki LC-MS.

Publikacja 2, Supplementary materials, Rysunek S1: czy to jest chromatogram LC-QTOF (SCAN) czy LC-MS/MS?

Liczę na dyskusję w w/w zakresie podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Podsumowując uważam, iż badania i ich wyniki będące przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Fidor ujawniają wysoki potencjał bałtyckiego szczepu *Nostoc edaphicum* CCNP1411 jako źródła związków o istotnej aktywności biologicznej i stanowią silne podstawy do dalszych badań nad ich biotechnologicznym i/lub farmaceutycznym wykorzystaniem. Uważam, że prawdopodobny aplikacyjny charakter uzyskanych wyników ma ogromne znaczenie poznawcze także z naukowego punktu widzenia. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż **rozprawa doktorska autorstwa mgr Anny Fidor zatytułowana „Peptides produced by the Baltic cyanobacterium *Nostoc edaphicum* CCNP1411 – structure and biological activity” (Peptydy produkowane przez bałtycką cyjanobakterię *Nostoc edaphicum* CCNP1411 – struktura i aktywność biologiczna)** wykonana w Zakładzie Biotechnologii Morskiej (Instytut Oceanografii) Wydziału Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem pani prof. dr hab. Hanny Mazur-Marzec spełnia ustawowe wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora, określone ustawą o stopniach i tytułach naukowych – uwzględnione w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669). Na tej podstawie **wniosuję do Rady Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Wydziału Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Anny Fidor do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.**

**Wniosek o wyróżnienie.** Chciałabym podkreślić, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Anny Fidor wpisuje się we współczesny nurt badań niezwykle istotnych i wzbudzających zainteresowanie wśród naukowców. Biorąc pod uwagę złożoność rozwiązywanego zagadnienia, obszerny zakres pracy przekraczający zwyczajowo przyjęty, dużą wnikliwość i rzetelność Doktorantki w prowadzeniu pracy naukowej popartą aktywnością i efektywnością naukową (4 publikacje będące bezpośrednio trzonem rozprawy doktorskiej, w tym 3 o charakterze oryginalnym i 1 praca przeglądowa), pozwalam sobie na postawienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Fidor. Wyróżnieniu w mojej opinii podlega innowacyjność badań, ich interdyscyplinarny charakter, duży ładunek nowości naukowej, możliwość wykorzystania w przyszłości potencjału bałtyckiego szczepu *Nostoc edaphicum* w medycynie lub biotechnologii – wszystkie te elementy pracy doktorskiej zaprezentowane zostały w literaturze po raz pierwszy.



Prof. dr hab. inż. Agata Kot-Wasik