

Kraków, 16 sierpnia 2022

dr hab. Dariusz Dziga
Pracownia Metabolomiki
Uniwersytet Jagielloński
dariusz.dziga@uj.edu.pl



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI W
KRAKOWIE

Ocena

pracy doktorskiej mgr Anny Fidor

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

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy zagadnień związanych z analizą nowych metabolitów wtórnych produkowanych przez cyjanobakterie oraz możliwością ich wykorzystania w medycynie. Prace badawcze wykonywane były pod kierunkiem promotor prof. dr hab. Hanny-Mazur-Marzec w Zakładzie Biotechnologii Morza Uniwersytetu Gdańskiego. Podstawą pracy doktorskiej są 4 prace naukowe opublikowane w uznanych czasopismach naukowych w latach 2018-2021, z czego jedna ma charakter przeglądowy, a trzy pozostałe to prace oryginalne. Trzy prace opublikowano w *Marine Drugs* (aktualny IF = 6.085), a jedną w *Biomolecules* (IF = 6.064). W trzech z wymienionych publikacji Pani Fidor jest pierwszym autorem, a w jednej występuje jako drugi autor. Doktorantka pełniła we wszystkich publikacjach kluczową rolę zarówno w aspekcie planowania i wykonywania eksperymentów, jak też analizy danych i przygotowania manuskryptów. Na podstawie tych publikacji przygotowano zostało (w języku angielskim, ze streszczeniem w języku polskim) podsumowujące opracowanie o długości kilkunastu stron.

Ocena merytoryczna:

Badania będące podstawą pracy doktorskiej koncentrowały się na dwóch grupach metabolitów wtórnych (nostocycyklopeptydy – Ncps oraz cyjanopeptoliny – Cps) gatunku *Nostoc edaphicum* CCNP1411 wyizolowanego z Zatoki Gdańskiej. Należałoby wyróżnić kilka kluczowych etapów prowadzonych prac eksperymentalnych:

- a) detekcja peptydowych metabolitów wtórnych z grupy Ncps oraz Cps
- b) opis genomu *Nostoc edaphicum* CCNP1411 oraz szczegółowa charakterystyka klastra genów odpowiedzialnych za syntezę Ncps
- c) precyzyjne zdefiniowanie struktury Ncps oraz Cps produkowanych przez badany szczep, w tym nowych wariantów tych pochodnych
- d) izolacja oczyszczonych metabolitów
- e) testy aktywności metabolitów wobec enzymów proteolitycznych oraz ludzkiego proteasomu, ze wskazaniem, które fragmenty struktury metabolitów mogą być kluczowe w tej biologicznej aktywności.

Taki przebieg prac badawczych (poczynając od identyfikacji nowych pochodnych aż po wstępną charakterystykę ich potencjału farmakologicznego) wskazuje na bardzo systematyczny i dobrze zaplanowany, szeroko zakrojony plan badań oraz na dokładną realizację postawionych celów. W pracach tych należy wyróżnić bynajmniej nietrywialne etapy polegające na opracowaniu metodyki rozdziału i identyfikacji nowych metabolitów, a także ich oczyszczaniu. Szczególnie warte podkreślenia są badania zmierzające do opisu struktury wyizolowanych związków, co wymagało zarówno dużego doświadczenia metodycznego, jak też żmudnej i starannej analizy uzyskanych danych ze spektrometrii mas. Jak wynika z opisu udziału poszczególnych autorów w powstawaniu kolejnych prac, analiza NMR została wykonana przez innych współautorów, ale można zakładać, że Pani Fidor rozumie tę metodę i potrafi interpretować uzyskane dane. O jakości prowadzonych analiz może świadczyć fakt, jak dużo nowych związków zostało opisanych i scharakteryzowanych pod względem struktury (w pracy nr 2 na 13 zidentyfikowanych CPs aż 12 okazało się być nowymi, nieopisanymi wcześniej wariantami, w pracy nr 3 – na 10 Ncps 6 to nowo opisane związki). W publikacjach 2 oraz 3, zarówno w głównych manuskryptach jak też w suplementach zostały przedstawione bardzo szczegółowe

Wydział

Biochemii,

Biofizyki i

Biotechnologii

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 60 02

fax +48(12) 664 69 02

email:
sekretariat.wbbib@uj.edu.pl

dane (m.in. w postaci widm masowych i obrazowania NMR, rysunków struktur oraz tabel z jonami fragmentacyjnymi), które stanowią bogate i obszerne opracowanie wykonanych analiz.

Recenzja kolejnych publikacji:

Publikacja 1

Jest to praca przeglądowa, w której w usystematyzowany sposób zawarte zostały szczegółowe informacje dotyczące metabolitów wtórnych syntetyzowanych przez rodzaj *Nostoc*, ze szczególnym uwzględnieniem tych metabolitów, które (wg dotychczasowej wiedzy) są produkowane jedynie przez szczepy należące do tego rodzaju cyjanobakterii. Po krótkim wprowadzeniu, w rozdziale 2 została przedstawiona schematyczna charakterystyka budowy i szlaków syntezy peptydów nierybosomalnych (Non-Ribosomal Peptides - NRPs) oraz poliketydów (Polyketides - PKs). W kolejnych rozdziałach (2-4) opisane są występowanie, struktura, oddziaływanie na organizmy/komórki/tkanki i możliwe zastosowanie medyczne kolejnych grup związków produkowanych przez *Nostoc*. Cały artykuł, opatrzone rysunkami przykładowych struktur oraz (w suplemencie) tabelą z wszystkimi znanymi peptydami produkowanymi przez *Nostoc* wymagał tytanicznej pracy nad obszerną literaturą (122 cytowane prace), aby możliwie całościowo zaprezentować ten temat. Publikacja pochodząca z końca 2019 roku ma jak dotychczas (lipiec 2022) 19 cytacji, co wskazuje na spore zainteresowanie tematem oraz przydatność tej pracy przeglądowej dla innych naukowców zajmujących się metabolitami wtórnymi cyjanobakterii. Taki bardzo szeroki przegląd literatury był także zapewne kluczowy dla Doktorantki w planowaniu i przebiegu prac eksperymentalnych przedstawionych w kolejnych publikacjach. Jedyne zastrzeżenie to krótka i zbyt ogólnikowa konkluzja pracy. Bazując na posiadanej wiedzy nt metabolitów produkowanych przez *Nostoc* można byłoby pokusić się o bardziej rozbudowane wnioski czy spostrzeżenia, dotyczące np. ograniczeń w identyfikacji czy analizie aktywności biologicznej poszczególnych metabolitów, perspektyw aplikacyjnych itp.

Publikacja 2

W niniejszej pracy wykonano identyfikację wariantów cyjanopeptolin produkowanych przez *Nostoc edaphicum* CCNP1411, opisując strukturę 13 wariantów (z czego 12 wariantów Cps po raz pierwszy zidentyfikowanych) oraz przeprowadzono analizę aktywności kilku oczyszczonych metabolitów wobec proteaz serynowych i fosfatazy PP1, a także wobec linii komórek nowotworowych MCF-7.

Deklarowany wkład Doktorantki w powstanie tej publikacji jest znaczący, Pani Fidor brała udział w analizach LC-MS/MS, interpretacji danych ze spektrometrii mas, wykonywała testy inhibicji enzymatycznej i uczestniczyła w przygotowaniu manuskryptu.

Opis wyników w sekcji 2.1. zawiera bardzo staranne i precyzyjne wyjaśnienie danych spektrometrii mas, które umożliwiły zaproponowanie struktur nowych CPs. W sekcji 2.2 te dane zostały zweryfikowane metodą NMR dla dwóch wariantów: CP962 and CP985. W sekcji 2.3 opisano analizę aktywności CPs wobec wybranych enzymów, która dostarczyła ciekawych spostrzeżeń co do roli poszczególnych elementów struktury Cps w inhibicji enzymatycznej. Szczególnie istotne wydaje się wykazanie, że jedynie te warianty CPs, które posiadają Arg w pozycji 2 wykazywały hamowanie aktywności trypsyny. W dyskusji fakt ten został nieco szerzej omówiony poprzez porównanie z innymi pracami opisującymi relacje między strukturą, a aktywnością. Jednakże, o ile szersza dyskusja w manuskrypcie być może nie była możliwa, warto byłoby się pokusić o nieco szerszy kontekst w podsumowującym opracowaniu (rozprawie). Wyniki aż się proszą o postawienie hipotezy, dlaczego akurat aminokwas w pozycji 2 może być kluczowy w aktywności wobec badanych enzymów. Czy chodzi tu o strukturalne dopasowanie (?), a może o tworzenie silnych oddziaływań (wiązań?) pomiędzy aminokwasem zasadowym lub hydrofobowym, a aminokwasami w centrum aktywnym odpowiednio trypsyny lub chymotrypsyny.

Konkluzja (As the new CP variants identified in *N. edaphicum* CCNP1411 inhibited the activity of trypsin or chymotrypsin at low concentrations and were inactive against the other tested enzymes and MCF-7 breast cancer cells, their possible use as therapeutic agents should be further explored) dotycząca aktywności CPs wobec enzymów i linii komórkowej powinna być bardziej precyzyjna, aby nie było wątpliwości, co wynika z uzyskanych danych. Czytelnik musi się domyślać, że chodzi o to (jak miemam), iż z jednej strony metabolity powinny

hamować/regulować aktywność enzymów proteolitycznych, aby być wykorzystane w zwalczaniu nowotworów, a z drugiej strony brak aktywności wobec komórek nowotworowych (linia MCF-7) świadczy o braku cytotoksyczności, a więc jest pożądaną własnością.

Uwagi krytyczne:

Na zakończenie wprowadzenia wzmiankowane zostały jedynie efekty zrealizowanych badań (opisanie struktur CPs oraz ich aktywność biologiczna), natomiast wyraźnie brakuje hipotez, a cele badań są zdefiniowane nieprecyzyjnie.

Rys. 1 i 2 - podpisy pod rysunkami są enigmatyczne, skróty COSY, ROESY i HMBC powinny być szczegółowo wyjaśnione.

Tabela 1 – tytuł tabeli jest zbyt ogólnikowy, a tytuł kolumny „Enzyme inhibition” nieprecyzyjny, może lepszy byłby „determined biological activity”.

Konkluzja pracy jest w zasadzie powtórzeniem abstraktu, brakuj szerszego kontekstu.

Publikacja 3

Deklarowany udział Doktorantki w powstaniu tej pracy to: realizacja prac eksperymentalnych, analiza formalna, przygotowanie manuskryptu (włączając wykonanie opracowań graficznych) i jego recenzja.

W pracy tej zostały przedstawione szczegółowe wyniki analizy genomu *N. edaphicum* CCNP1411, którego długość ustalono na 8,316,316 bps (sumarycznie chromosom oraz plazmidy). W obrębie genomu zidentyfikowano prawie 7000 genów, podzielonych na te kodujące białka, pseudogeny oraz geny cząsteczek RNA innych niż mRNA. W obrębie chromosomowej nici zidentyfikowano 4 klastry związane z syntezą NRPs, koncentrując się w dalszych analizach na klastrze przypuszczalnie kodującym nostocyklopeptydy (zlokalizowanym między 7,609,981–7,643,289 bps). W obrębie tego fragmentu chromosomu znaleziono 9 otwartych ramek odczytu, transkrybowanych w kierunkach reverse (7) i forward (2). Bardziej szczegółowe analizy umożliwiły opisanie klastra oraz poszczególnych genów odpowiedzialnych za syntezę Ncps. W drugiej części tej pracy przeprowadzono identyfikację i charakterystykę strukturalną Ncps produkowanych przez *N. edaphicum* CCNP1411; w sumie opisano 10 metabolitów, z których aż 6 to po raz pierwszy zidentyfikowane związki. Ustalenie struktur nowych związków wymagało pracochłonnej i specjalistycznej analizy danych pochodzących z widm fragmentacyjnych zarówno własnych jak też dostępnych w literaturze.

Oprócz analizy strukturalnej wykonano analizy względnej zawartości poszczególnych Ncps produkowanych przez badany szczep, biorąc pod uwagę zarówno liniowe jak i cykliczne warianty tych metabolitów, wykazując przy okazji, że cyklizacja Ncp-A1 z resztą Leu na końcu C-terminalnym zachodzi łatwiej, stąd proporcje pomiędzy liniową, a cykliczną formą mogą zależeć od tego elementu struktury Ncp.

Ważny fragment dyskusji to rozważania nad różnorodnością wariantów różnych NRPs takich jak mikrocystyny czy cyjanopeptoliny. W porównaniu z tymi grupami metabolitów, zidentyfikowana została bardzo nieliczna grupa nostocyklopeptydów. W tym miejscu warto byłoby pokusić się jednak o omówienie czynników, które mogą mieć wpływ na ten fakt. Czy może to wynikać z większej konserwatywności klastra kodującego enzymy syntezy Ncps lub nielicznej grupy organizmów syntetyzujących Ncps? A może po prostu istnieje luka w identyfikacji tej grupy związków i w przyszłości może się okazać, że liczba ich wariantów jest równie duża. Identyczna uwaga krytyczna jak w przypadku publikacji nr 2 dotyczy braku hipotezy i jasno określonych celów.

Publikacja 4

W tej pracy opublikowanej jako Communication, przedstawiono uzupełniającą analizę NMR wyizolowanych wariantów Ncps oraz ich aktywność wobec ludzkiego proteasomu 20S.

Deklarowany udział Doktorantki: koncepcja pracy, analiza LC-MS/MS, ekstrakcja, frakcjonowanie i izolacja metabolitów, testy hamowania aktywności proteasomu, przygotowanie manuskryptu, recenzja manuskryptu, wizualizacja wyników.

Praca ta ma szczególnie istotny charakter w kontekście przyszłego możliwego wykorzystania metabolitów wtórnych cyjanobakterii w medycynie, gdyż przedstawia dane o biologicznej aktywności kilku Ncps przy wykorzystaniu modelu (proteasom 20S), który może stanowić bezpośrednie odniesienie do analiz różnych potencjalnych farmaceutyków testowanych pod

kątem terapii przeciwnowotworowych. We wprowadzeniu znajduje się ważny fragment dotyczący roli proteasomu 20S oraz roli regulacyjnej wobec tego kompleksu różnych cząsteczek, w tym pochodzenia naturalnego. Uzupełniające fragmenty dotyczące tego aspektu zawarte są także w dyskusji.

Testy aktywności wykazały selektywne działanie wariantów Ncps wobec chymotrypsyno-podobnej i trypsyno-podobnej aktywności proteasomu. Należy jednak zaznaczyć, że te wstępne wyniki powinny być jednoznacznie potwierdzone, aby mogły posłużyć jako punkt wyjścia do dalszych, bardziej zaawansowanych analiz.

Ponownie, uwaga krytyczna jak w przypadku publikacji nr 2 dotyczy braku hipotezy i jasno określonych celów.

Rozprawa doktorska

Opracowanie to, będące skrótem wersją rozprawy doktorskiej, zawiera zwięzły i systematyczny opis wyników prac zawartych w publikacjach 2-4 oraz najważniejszych aspektów opisanych w pracy przeglądowej (publikacja nr 1). Całość jest przedstawiona w sposób klarowny i zrozumiały i została oceniona bardzo pozytywnie.

Ponowny, bardziej ogólny zarzut dotyczy braku wyraźnego wskazania hipotez oraz celów badawczych. Mimo, że większość badań przedstawionych w poszczególnych pracach ma charakter analityczny, można było pokusić się o sformułowanie hipotez, które podlegały weryfikacji. Cele, w kontekście dalszego ciągu rozprawy są dość oczywiste, ale powinny być wyraźnie sformułowane.

W części rozprawy zawierającej dyskusję dość skrótowo zawarte są podstawowe wątki dyskusji umieszczonych w poszczególnych manuskryptach, co oczywiście jest zrozumiałe. Jednakże, o ile w publikacjach autorzy są zobligowani do bardzo ścisłej tematycznie dyskusji, w rozprawie doktorskiej można/należałoby poszerzyć rozważania/dodać nowe wątki, szczególne istotne z punktu widzenia realizowanych prac. Np. chętnie zapoznałbym się z argumentami popierającymi sensowność pracochłonnych badań nad metabolitami cyjanobakterii w kontekście ich wykorzystania w medycynie (w porównaniu z wysokoprzepustową analizą podobnych strukturalnie analogów syntetyzowanych chemicznie). Inny ciekawy aspekt, zaledwie wspomniany w rozprawie to hipotezy o potencjalnych funkcjach metabolitów wtórnych cyjanobakterii.

Odrębny, niezwykle ważny aspekt to forma strukturalna badanych metabolitów, omówiona w sekcji 4.1.2. i czynniki, od których zależy czy Ncps występują w formie cyklicznej, czy liniowej. Jak wskazano na stronie 19, cyklizacja Ncps jest procesem spontanicznym, a równowaga między formą liniową i cykliczną może zależeć od pH, sposobu przechowywania i traktowania biomasy itp. Ten aspekt jest szczególnie ważny, jeśli bierzemy pod uwagę biologiczne (np. antynowotworowe) własności badanych metabolitów. Linearyzacja/cyklizacja może w bardzo znaczący sposób zmieniać zdolność tych związków do oddziaływania z enzymami.

Na stronie 19 wspomniano także o problemie określenia stężenia oczyszczonych metabolitów, ze względu na brak jakichkolwiek standardów. W związku z tym względne stężenia oszacowano na podstawie powierzchni pików jonów macierzystych. Chętnie zapoznałbym się z opinią Doktorantki, na ile wiarygodne jest określenie stężenia w ten sposób i czy były brane pod uwagę inne możliwości oznaczenia stężeń badanych związków.

Warto byłoby szerzej wyjaśnić, dlaczego akurat te testy wobec badanych enzymów (publikacja nr 2) zostały wybrane do wstępnego opisu aktywności różnych metabolitów i dlaczego te właśnie testy mogą zostać uznane za miarodajny sposób selekcji potencjalnych terapeutyków. Kilka wersów dyskusji tego aspektu w pracy nr 2 (str 11-12) wydaje się zbyt skromnym opisem. Konkluzja 2 na stronie 22 (The peptides produced by *N. edaphicum* CCNP1411 were revealed to be either serine protease inhibitors (Cps) or human 20S proteasome inhibitors (Ncps). The amino acid composition and form of the compounds was proved to have significant effect on their activity.) wskazująca, że skład i struktura związków ma decydujący wpływ na aktywność biologiczną, jest zbyt uproszczeniem. To jest oczywista sprawa, należałoby wskazać/powtórzyć, jakie elementy struktury są/mogą być kluczowe w badanej aktywności.

Podsumowując, w mojej opinii rozprawa doktorska mgr Anny Fidor jest dużym sukcesem naukowym zarówno jej samej, jak też jej promotor, Prof. Hanny Mazur-Marzec. Najważniejszym aspektem prac zawartych w rozprawie doktorskiej jest systematyczny i dobrze zaplanowany ciąg eksperymentów, od identyfikacji poprzez charakterystykę strukturalną, aż po analizy aktywności biologicznej metabolitów produkowanych przez szczep *Nostoc*. Podjęcie takiej tematyki badań uważam za trafne i w pełni uzasadnione. Uzyskanie wyników w ramach niniejszych badań, ich interpretacja oraz szersza dyskusja zostały wykonane w pełni profesjonalnie, wskazując na bogaty i nowoczesny warsztat badawczy Doktorantki, głęboką wiedzę teoretyczną i umiejętność prawidłowej analizy uzyskanych danych. To wszystko zostało potwierdzone opublikowaniem wyników badań w cenionych czasopismach międzynarodowych i najpewniej będzie stanowić ważny element wiedzy w kontekście biotechnologicznego wykorzystania metabolitów wtórnych cyjanobakterii w medycynie.

Należy także podkreślić, że prowadzone prace były w dużej mierze realizowane w ramach projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, co jeszcze bardziej podkreśla ich znaczenie, zweryfikowane pozytywną oceną ekspertów i recenzentów powołanych w ramach procesu ewaluacji wniosków.

W związku z powyższym, z uwagi na duży wkład pracy, wagę i oryginalność uzyskanych wyników uznaję, że rozprawa doktorska Pani mgr Anny Fidor pod tytułem „Peptides produced by the Baltic cyanobacterium *Nostoc edaphicum* CCNP1411 – structure and biological activity” spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Anny Fidor do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Podpisano – recenzent, Dariusz Dziga

