



dr hab. Mikołaj Kokociński, prof. UAM
Zakład Hydrobiologii
Wydział Biologii UAM
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Poznań, 08.04.2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Roberta Konkela
pt. „Struktura i aktywność biologiczna anabaenopeptyn i cyjanopeptolin
produkowanych przez bałtycki szczep cyjanobakterii – *Nostoc edaphicum* CCNP1411”**

Wprowadzenie

Recenzja niniejsza została opracowana na zlecenie skierowane pismem z dnia 26.02.2024 roku przez Pana prof. dr. hab. Wojciecha Tylmanna, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego.

Układ i redakcja recenzowanej pracy doktorskiej

Struktura pracy jest prawidłowa. Praca składa się z wprowadzenia, celów badań, opisu materiałów i metod badawczych, wyników wraz dyskusją oraz podsumowania i bibliografii. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opisuje syntetycznie osiągnięcia naukowe opublikowane w pięciu artykułach naukowych załączonych wraz z oświadczeniami na końcu rozprawy doktorskiej. Ponadto praca zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim oraz listę skrótów. Wstęp i metody badań pozwalają bardzo precyzyjnie zapoznać się z podjętą tematyką i zastosowanymi metodami badawczymi, które nie budzą żadnych zastrzeżeń. Zagadnienia wstępne w pełni uzasadniają wybór tematu oraz celów badawczych. Wyniki zostały przedstawione w uporządkowany sposób, bogato zilustrowane oraz udokumentowane licznymi tabelami i rycinami przedstawiającymi struktury chemiczne i widma fragmentacyjne stwierdzonych związków chemicznych. Bardzo obszerna jest także dokumentacja wyników załączonych jako suplement do artykułów 3 i 4. Zabrakło jedynie zdjęcia przedstawiającego główny obiekt badań tj. szczep *Nostoc edaphicum*. Literatura natomiast obejmuje bogaty



przegląd doniesień naukowych w tym wiele bieżących pozycji. Pod względem redakcyjnym praca również nie budzi zastrzeżeń.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska Pana mgra Roberta Konkela, która została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Hanny Mazur Marzec oraz dr Marty Cegłowskiej.

Głównym celem pracy było poszerzenie wiedzy na temat związków produkowanych przez *Nostoc edaphicum* CCNP1411 – ich strukturalnej różnorodności oraz biologicznej aktywności.

W pracy nie przedstawiono hipotez badawczych, główny cel został jednak doprecyzowany poprzez cele cząstkowe, które umożliwiły jego realizację. Obejmowały między innymi założenie i prowadzenie hodowli *N. edaphicum*, optymalizację izolacji cyjanopeptolin i anabaenopeptyn, poznanie różnorodności strukturalnej tych związków oraz ich biologicznej aktywności w testach *in vitro* oraz względem wirusa SARS-CoV-2 a także zbadanie mechanizmów ich antywirusowego działania. Brak hipotezy badawczej może wydawać się pewnym brakiem w pracy naukowej jednak podjęta tematyka o charakterze poznawczo-opisowym szczególnie w artykule 3 i 4 uzasadniają taką decyzję. W artykule 5 podejmowane są już wyraźne problemy naukowe dotyczące mechanizmów antywirusowej natury badanych związków. Zastanawiam się zatem czy i jaką hipotezę badawczą postawiłby Doktorant na obecnym etapie wiedzy, którą pozyskał poprzez swoje badania?

Dotychczasowa wiedza na temat cyjanobakterii z rodzaju *Nostoc* jest bardzo duża. Należą do jednych z najczęściej badanych co potwierdza lista ok. 1000 artykułów obejmujących słowo *Nostoc* w bazie danych Scopus tylko za okres od 2020 roku. Nie zniechęciło to jednak Doktoranta do podjęcia się badań obejmujących właśnie ten rodzaj. Wyniki badań pokazały, że był to dobry wybór i ujawniły jak wiele jest wciąż niezbadanych obszarów szczególnie w zakresie produkowanych przez te organizmy metabolitów. Jeszcze mniej jest doniesień naukowych na temat ich znaczenia, roli w środowisku i aktywności biologicznej tych związków a szczególnie antywirusowego działania. Pod tym względem wybrany przedmiot badań stanowi zatem nowe, oryginalne ujęcie.



Główny cel badań został w pełni osiągnięty poprzez konsekwentną realizację celów i zadań cząstkowych. Pierwszym ważnym osiągnięciem było opracowanie warunków hodowli bałtyckiego szczepu *N. edaphicum* CCNP1411 wyizolowanego z osadów Zatoki Gdańskiej w 2010 roku przez dr Justynę Kobos i zdeponowanego w Kolekcji Kultur Północnej Polski Uniwersytetu Gdańskiego. W opisie metod zabrakło informacji czy badany szczep był akсенiczny czy nie, informacja ta znajduje się jedynie w cytowanej literaturze. Zastanawiam się jaki wpływ może mieć wykorzystanie do badań organizmu utrzymywanego w warunkach hodowlanych przez ponad 10 lat? Prosiłbym doktoranta o odpowiedź na to zagadnienie także w kontekście zmieniającego się zapewne metabolizmu organizmu pozbawionego naturalnego, towarzyszącego mu biomu bakteryjnego? Ponadto z opisu pozyskiwania materiału do badań wynika, iż w pożywce płynnej *Nostoc edaphicum* występuje w postaci pływających trychomów podczas gdy w środowisku naturalnym tworzy duże makroskopowe kolonie, występujące często na łądzie na wilgotnym, zasolonym podłożu. Proszę o opinię Doktoranta czy taka zmiana warunków może mieć jakiś wpływ na zdolność do produkcji metabolitów? Realizując kolejne cele cząstkowe Doktorant poznał zdolność badanego szczepu do produkcji wybranych związków peptydowych, ich strukturę oraz ocenił ich potencjalny wpływ na komórki czy aktywność enzymatyczną. Doktorant wykazał się dużą znajomością metod niezbędnych do ekstrakcji i izolacji ww. związków chemicznych, przeprowadzenia analiz chemicznych oraz biotestów. Zastosował prawidłowe, nowoczesne metody analityczne obejmujące między innymi chromatografię błyskawiczną i preparatywną. Ponadto wykonane zostały analizy NMR (Nuclear Magnetic Resonance) oraz analizy molekularne klastrów genowych anabaenopeptyn. Zastosowanie tak wielu metod wymagało wszechstronnej wiedzy od Doktoranta i dużego nakładu pracy. Większość analiz Doktorant wykonał sam lub we współpracy z doświadczonymi ekspertami. Posiadał zatem umiejętność pracy w zespołach badawczych i nabył solidne doświadczenie laboratoryjne.

Wyniki badań zostały opublikowane w pięciu, wieloautorskich artykułach w czasopismach znajdujących się na liście JCR tj. *Marine Drugs* (2019, 2023), *Biomolecules* (2021), *International Journal of Environmental Research and Public Health* (2022), *Antiviral Research*



(2023). Artykuły te składają się na cykl rozprawy doktorskiej. Dwa pierwsze artykuły mają charakter przeglądowy, w których Doktorant jest współautorem. Są to dość krótkie jak na ten rodzaj publikacji artykuły. Dotyczą one jednak bardzo wyspecjalizowanych zagadnień i podsumowują wciąż bardzo ubogą wiedzę na poruszane tematy. Wiedza na temat metabolitów antywirusowych jest szczególnie niewielka a badania prowadzone są zaledwie od kilku lat. Pisanie artykułów przeglądowych na pewno ugruntowało wiedzę Doktoranta i pomogło mu wyznaczyć cele badań. W pozostałych trzech artykułach Doktorant jest pierwszym autorem z wiodącym jak wynika z załączonych oświadczeń udziałem. Tematyka badawcza w pełni pasuje do profilu tych czasopism co tym samym zwiększa szanse na dotarcie do szerokiego grona międzynarodowych odbiorców.

W dalszej części recenzji skupię się na ocenie dorobku naukowego publikacji 3-5. Do najważniejszych osiągnięć naukowych trzeciej publikacji zatytułowanej „Anabaenopeptins from *Nostoc edaphicum* CCNP1411” należy stwierdzenie zdolności badanego szczepu do produkcji anabaenopeptyn. Zostało to potwierdzone zarówno poprzez analizy molekularne, które wykazały obecność genów odpowiedzialnych za syntezę tych związków jak i poprzez analizę chromatograficzną ekstraktów. Podkreślić jednak należy, iż pozytywny wynik potwierdzający obecność anabaenopeptyn uzyskano dopiero po analizie zatężonej frakcji otrzymanej z dużo większej ilości suchej masy materiału. W tym miejscu nasuwa się pytanie o stężenia tych związków występujące w środowisku naturalnym, czy Doktorant prowadził takie badania oraz jaki jest ich potencjalny wpływ na inne organizmy przy mniejszych stężeniach? Proszę o odpowiedź na powyższe pytania. Anabaenopeptyny produkowane przez szczep *N. edaphicum* zostały zakwalifikowane jako 4 strukturalne analogi tej grupy związków o typowej strukturze. Jednakże tylko jeden z analogów był opisany wcześniej a pozostałe trzy są nowe opisane przez Doktoranta. W swojej pracy Doktorant słusznie zwraca uwagę na rosnącą liczbę opisywanych analogów anabaenopeptyn i związaną z tym potrzebą usystematyzowania ich nazewnictwa. Świadczy to o jego dojrzałości naukowej i dostrzeganiu problemów badawczych w szerszej perspektywie. Powstaje pytanie jaki proces odpowiada za powstawanie tak licznych



analogów? Czy jest to rodzaj adaptacji cyjanobacterii do środowiska? Rozważań na te problemy zabrakło w dyskusji, zatem proszę o wyrażenie opinii przez Doktoranta na te zagadnienia. Poza poznanie i opisem struktury anabaenopeptyn ważnym osiągnięciem była ich ocena aktywności biologicznej wobec wybranych enzymów. Rezultaty tych badań nie były tym razem zaskakujące i potwierdziły, iż największą aktywność trzy badane anabaenopeptyny wykazywały względem karboksypeptydazy A (CPA), najczęściej hamowanego przez te peptydy enzymu. Nie wykazano natomiast aktywności względem trypsyny i chymotrypsyny. Natomiast aktywność względem elastazy była różna dla poszczególnych analogów. Dość zaskakującym wynikiem był silny efekt anabaenopeptyny AP SA6 opisanej już wcześniej podczas gdy nowo opisany analog AP806Ne nie wykazywał żadnej aktywności. Czy tak duże różnice w aktywności poszczególnych analogów względem tego samego enzymu wynika tylko z ich różnej struktury chemicznej czy jest inne wyjaśnienie tego fenomenu? Proszę o odpowiedź.

W czwartej publikacji Doktorant wraz z współautorami opisał 79 nowych analogów spośród 93 stwierdzonych cyjanopeptolin produkowanych przez szczep *N. edaphicum* CCNP1411. Tym samym Doktorant znacząco przyczynił się do powiększenia światowej bazy danych wszystkich opisanych cyjanopeptolin. Jest to istotny wkład młodego naukowca do poszerzenia ogólnej wiedzy na temat produkowanych przez cyjanobakterie metabolitów. Osiągnięcie to było możliwe dzięki zastosowaniu wielu nowoczesnych metod od klasycznych metod identyfikacji po zaawansowane techniki bioinformatyczne. Do ważnych osiągnięć Doktoranta było wyizolowanie ponad 30 czystych związków spośród różniących się strukturalnie cyjanopeptolin. Zostały one następnie wykorzystane do poznania ich aktywności biologicznej. Badania te podobnie jak badania wcześniejsze wykazały zróżnicowaną aktywność wobec badanych enzymów. Czy Doktorant potrafi odpowiedzieć dlaczego żaden z tak wielu analogów nie wykazał aktywności wobec trombiny? Od czego zależy „odporność” tego enzymu na działanie cyjanopeptolin? Ponadto zbadano aktywność 17 opisanych i wyizolowanych analogów cyjanopeptolin względem ludzkich komórek raka szyjki macicy.



Wyniki badań pozwoliły jednak na wytypowanie tylko jednego analogu cyjanopeptoliny, która wykazywała właściwości cytotoksyczne względem komórek raka przy wysokich stężeniach. Doktorant w interpretacji wyników dotyczących aktywności biologicznej i cytotoksyczności słusznie dużo uwagi przywiązuje do struktury chemicznej stwierdzonych analogów cyjanopeptolin oraz zastosowanego stężenia. Czy jednak poza tymi dwoma bardzo ważnymi czynnikami Doktorant wskazałby na rolę innych jeszcze czynników determinujących aktywność biologiczną cyjanometabolitów?

Artykuł piąty natomiast moim zdaniem zawiera najważniejsze a zarazem najbardziej nowatorskie badania skupione na poznaniu potencjału antywirusowego cyjanopeptolin produkowanych przez badany szczep *Nostoc*. Analizę aktywności przeprowadzono względem SARS-CoV-2. Tym samym badania Doktoranta wpisały się w ogromną potrzebę takich badań związanych z panującą w ich trakcie pandemią. Doktorant bardzo poważnie i rzetelnie podjął się rozwiązania problemu badawczego przeprowadzając szereg testów przesiewowych a następnie funkcjonalnych. Pozwoliły one wybrać cyjanopeptolinę o największym potencjale przeciwwirusowym oraz wykluczyć kolejne hipotezy sposobu hamowania aktywności wirusa przez cyjanopeptoliny. Do najważniejszego osiągnięcia z pewnością należy zaliczyć wykazanie, że inaktywacja wirusa następuje poprzez bezpośrednie oddziaływanie cyjanopeptoliny z cząstkami wirusa. Ten mechanizm został dodatkowo potwierdzony poprzez zastosowanie mikroskopii konfokalnej z wykorzystaniem techniki znakowania białek wirusa. Ponadto badania Doktoranta pozwalają na uznanie wybranych cyjanopeptolin produkowanych przez szczep bałtycki szczep *Nostoc* jako związków o dużym potencjale farmaceutycznym. Taki efekt badań ma ogromny walor nie tylko poznawczy ale również aplikacyjny. Wirusy obecne w środowisku cyjanobakterii zapewne wymuszają adaptacje obronne przed cyjanofagami. Czy Doktorant uważa, iż nabycie zdolności przez cyjanobakterie do produkcji takich metabolitów jak cyjanopeptoliny lub innych metabolitów mogło być związane z obecnością wirusów w ich otoczeniu?



Ocena końcowa

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej mgra Roberta Konkela uważam, że Doktorant zrealizował ambitny plan badawczy a praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje pogłębioną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie Nauk o Ziemi i Środowisku. Dzięki zastosowaniu wielu nowoczesnych, interdyscyplinarnych technik laboratoryjnych praca doktorska stanowi znaczący wkład do teoretycznej wiedzy z zakresu cyjanometabolitów. Szczególnie wyniki dotyczące aktywności antywirusowych cyjanopeptolin należą do pionierskich o dużym potencjale aplikacyjnym. Doktorant nabył duże doświadczenie jak i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską oceniam zatem bardzo wysoko. Dysertacja w pełni odpowiada ustawowym wymogom określonym dla rozpraw doktorskich. W związku z powyższym zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgra Roberta Konkela do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgra Roberta Konkela.

dr hab. Mikołaj Kokociński prof. UAM

