

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Roberta Konkela

**Struktura i aktywność biologiczna anabaenopeptyn i cyjanopeptolin
produkowanych przez bałtycki szczep cyjanobakterii –
Nostoc edaphicum CCNP1411**

Substancje czynne wchodzące w skład stosowanych we współczesnej praktyce klinicznej leków dzielą się na otrzymywane na drodze syntezy chemicznej lub pochodzenia naturalnego. Leki należące do tej drugiej grupy są produktami końcowymi biosyntezy, w znakomitej większości przypadków tzw. metabolizmu wtórnego i jako takie określane są mianem idiolitów. Zdecydowanie największa liczba takich związków jest wytwarzana przez drobnoustroje, chociaż znane są także przykłady idiolitów wytwarzanych przez organizmy wyższe, jak np. lek przeciwnowotworowy Taksol wytwarzany przez cis kalifornijski. Wśród mikroorganizmów będących producentami leków, głównie antybiotyków, zdecydowany prym wiodą prokariotyczne drobnoustroje głębokie - promieniowce, w dalszej kolejności drobnoustroje grzybowe i bakterie. Pomimo iż do dnia dzisiejszego zidentyfikowano i scharakteryzowano około 20 000 produktów metabolizmu wtórnego drobnoustrojów, z których co prawda tylko znikomy ułamek znalazł zastosowanie w leczeniu, uważa się, że jeszcze ogromna liczba tych związków pozostaje nieodkryta, w tym szczególnie takich wytwarzanych przez drobnoustroje zamieszkujące słabo dotychczas przebadane pod tym kątem środowiska. Morza i oceany odgrywają w tym względzie wyjątkową rolę. Zamieszkujące je drobnoustroje, w tym cyjanobakterie, są obiektami wyraźnie rosnącego zainteresowania wielu światowych ośrodków badawczych jako producenci metabolitów wtórnych o potencjalnym zastosowaniu medycznym. Do ośrodków tych zalicza się także grupa badawcza pod kierunkiem p. prof. Hanny Mazur-Marzec z Wydziału Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego, mogąca poszczycić się zdecydowanie rozpoznawalnym i docenianym w skali ogólnoswiatowej wkładem w badania idiolitów wytwarzanych przez sinice (cyjanobakterie), głównie z Morza Bałtyckiego, której członkiem był autor recenzowanej rozprawy doktorskiej, p. mgr Robert Konkel.

W badaniach, których wyniki p. Konkel opisał w swojej rozprawie doktorskiej, zajmował się On związkami będącymi produktami metabolizmu wtórnego cyjanobakterii *Nostoc edaphicum* CCNP14111, drobnoustroju wyizolowanego z osadów Zatoki Gdańskiej. Idiolity wyizolowane i scharakteryzowane przez Doktoranta miały charakter cyklicznych peptydów, należących do grupy strukturalnej anabaenopeptyn lub cyklicznych depsipeptydów będących analogami cyjanopeptolin. Trzy z czterech analizowanych anabaenopeptyn oraz 79 z 93 cyjanopeptolin okazało się związkami nowymi, nieopisanymi dotychczas w literaturze. Dla związków wyizolowanych w stopniu czystości przekraczającym 95% przeprowadzone zostały badania ich aktywności biologicznej, w tym aktywności inhibicyjnej wobec kilku enzymów z grupy proteaz, takich jak trypsyna, chymotrypsyna, elastaza, karboksypeptydaza A, aktywności cytotoksycznej wobec komórek raka szyjki macicy oraz aktywności przeciwwirusowej wobec wirusa SARS-CoV-2. W wyniku tych badań

stwierdzono znaczący potencjał inhibicyjny badanych 3 anabaenopeptyn wobec karboksypeptydazy A oraz niektórych cyjanopeptolin wobec trombiny, chymotrypsyny lub elastazy. Niektóre cyjanopeptoliny posiadające resztę argininy w poz. 2 wykazały znaczącą aktywność przeciwwirusową na modelu komórek nabłonkowych zainfekowanych wirusem SARS-CoV-2.

Za najistotniejsze dokonania Doktoranta poczynione w trakcie realizacji doktorskiego projektu badawczego, którego wyniki opisano w recenzowanej rozprawie uważam:

- a) ustalenie lokalizacji w genomie i struktury klastra genowego obejmującego geny kodujące elementy nierybosomalnej syntetazy anabaenopeptynowej;
- b) opracowanie warunków izolacji i separacji 4 anabaenopeptyn i 93 cyjanopeptolin produkowanych przez *Nostoc edaphicum* CCNP1411 i ostateczne otrzymanie 3 anabaenopeptyn i 34 cyjanopeptolin w ilościach i stopniu czystości umożliwiających ocenę aktywności biologicznej tych związków;
- c) ustalenie struktury 3 z 4 anabaenopeptyn i 78 z 93 cyjanopeptolin w oparciu o analizę z użyciem spektroskopii NMR i MS jako związków nowych, nieopisanych we wcześniejszych publikacjach;
- d) wykazanie obiecującej aktywności przeciwwirusowej wobec wirusa SARS-CoV-2 jednej z wyizolowanych cyjanopeptolin (CP 978), wynikającej prawdopodobnie z wiązania się tej cząsteczki z białkiem S wirusa i w konsekwencji hamowania adhezji wirionów do ludzkich komórek nabłonkowych linii A549^{ACE2/TMPRSS2}.

. Wyniki badań prowadzonych przez Doktoranta, samodzielnie i we współpracy z innymi naukowcami oraz wynikające z nich wnioski mają w mojej opinii oczywisty charakter nowości naukowej, czego potwierdzeniem jest opublikowanie tych wyników w trzech wieloautorskich publikacjach w czasopismach *Marine Drugs*, *International Journal of Environmental Research and Public Health* oraz *Antiviral Research*, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, a w których Doktorant jest pierwszym autorem. W skład tej rozprawy wchodzi także dwie prace o charakterze przeglądowym w *Marine Drugs* i *Biomolecules*.

Nie ulega dla mnie wątpliwości, że realizując swój projekt doktorski Doktorant wykazał się biegłością laboratoryjną jako eksperymentator, szczególnie w zakresie stosowania separacyjnych technik chromatograficznych, metod analizy strukturalnej, w tym spektroskopii NMR i MS oraz oznaczania aktywności enzymów proteolitycznych. Uzyskane wyniki zostały opracowane i opisane w sposób profesjonalny. Ich analiza i dyskusja przeprowadzona przez p. Konkela jest dojrzała i kompetentna. W konkluzji mogę z przekonaniem stwierdzić, że Pan mgr Robert Konkela wykazał się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Sama rozprawa doktorska została przygotowana starannie, poziom edytorski tego dzieła jest odpowiedni. Na rozprawę składa się 5 współautorskich publikacji poprzedzonych szczegółowym i bardzo wyczerpującym opisem obejmującym 40 stron + streszczenia w języku polskim i angielskim. Szukając tzw. „dziury w całym” mogę stwierdzić, że w przypadku rozpraw doktorskich w postaci cyklu publikacji, zwykle poprzedzający opis jest znacznie krótszy, natomiast ten przedstawiony przez p. Konkela mógłby zapewne stanowić samodzielną rozprawę w układzie tradycyjnym. Układ tego opisu jest typowy dla klasycznej rozprawy doktorskiej, a w jego skład wchodzi: streszczenie w języku polskim i angielskim, rozdział zatytułowany *Wprowadzenie* stanowiący przegląd literatury, założenia i cel pracy, opis materiałów i

metod eksperymentalnych, opis uzyskanych wyników połączony z dyskusją, podsumowanie oraz spis piśmiennictwa.

Część rozprawy obejmująca teksty 5 publikacji wieloautorskich, zawiera dla każdej z nich oświadczenia współautorów umożliwiające w sposób jednoznaczny jakościową ocenę wkładu w jej powstanie. Nie ma najmniejszej wątpliwości, że w przypadku trzech publikacji omawiających wyniki prac eksperymentalnych, wkład Doktoranta był bardzo znaczący na wszystkich etapach ich powstawania, w tym planowania eksperymentów, wykonania istotnej części badań, w tym szczególnie analizy genomowej drobnoustroju produkcyjnego, izolacji związków, ich analizy strukturalnej, oraz oceny niektórych właściwości biologicznych, w tym aktywności inhibicyjnej wobec wybranych enzymów proteolitycznych i wreszcie napisania tekstów publikacji. W dwóch publikacjach o charakterze przeglądowym, p. Konkel jako jeden z trzech lub czterech współautorów partycypował w planowaniu, dyskusji i napisaniu ich tekstów w stopniu zapewne trudnym do oceny ilościowej, ale jak przypuszczam, istotnym.

Streszczenia rozprawy zostały napisane w sposób zwięzły, ale wyczerpujący. Zawierają wszystkie najistotniejsze informacje dotyczące najważniejszych wyników badań prowadzonych przez Doktoranta. Jedyna uwaga co do treści streszczeń dotyczy zawartej w nich błędnej informacji o znaczącej aktywności inhibicyjnej cyjanopeptolin zawierających resztę Arg w pozycji 2 wobec trombiny, zamiast tak jak to miało miejsce w rzeczywistości, wobec trypsyny.

Uwagi szczegółowe do poszczególnych części opisu.

Omówienie dotychczasowego stanu wiedzy, zatytułowane jako *Wprowadzenie* zajmuje 8 stron i jest poświęcone omówieniu wybranych przykładów metabolitów wtórnych wytwarzanych przez cyjanobakterie z rodzaju *Nostoc*. Ta część rozprawy zawiera szereg cennych, interesujących danych, wspartych cytatami do wielu pozycji literaturowych, w znakomitej większości bardzo aktualnych, z lat dwutysięcznych co bardzo dobrze świadczy o wysokim poziomie ogólnej wiedzy teoretycznej Autora, a w szczególności o znajomości aktualnej literatury. Nie znalazłem we *Wprowadzeniu* istotnych błędów merytorycznych, pozwalam sobie jedynie na kilka drobnych uwag.

- Omawiając przykłady metabolitów wtórnych produkowanych przez cyjanobakterie, autor rozprawy skupił się na związkach toksycznych o strukturze peptydowej, jednakże drobnoustroje te produkują także szereg ciekawych idiolitów toksycznych i nietoksycznych o innych strukturach, jak np. siderofory hydroksamowe. Kompleksowe opracowanie na ten temat zostało opublikowane stosunkowo niedawno: Cepoi C., Secondary metabolites in cyanobacteria, In: Cyanobacteria. From metabolism to molecules., pp. 283-311. *Progress in Biochemistry and Biotechnology*, Academic Press, 2024.
- Cytat [Eggen & Georg, 2002] do zdania dotyczącego stwierdzonej aktywności przeciwgrzybowej kryptoficyn wobec *Cryptococcus* spp. nie wydaje się właściwy. Jest to artykuł przeglądowy, w którym znajduje się odniesienie do oryginalnej publikacji zawierającej odpowiednią informację: Hirsch CF, Liesch JM, Salvatore MJ, Schwartz RE, Sesin DF, 1990, US Patent 4946835.
- Jednym z leków stosowanych w chemoterapii przeciwnowotworowej jest cisplatyna, a nie jak napisano – platyna.

- W legendzie do rys. 1. przedstawiającego strukturę kryptoficyny Cr-1 fragment A określono jako kwas fenylooktanowy. W rzeczywistości jest to pochodna kwasu fenylooktanowego zawierająca ugrupowanie epoksydowe oraz grupę metylową i hydroksylową.
- Opisując strukturę i właściwości biologiczne Cyjanowiryny-N należało wspomnieć, że w odróżnieniu od innych opisywanych w tym rozdziale produktów metabolizmu wtórnego cyjanobakterii, związek ten nie powstaje w wyniku nierybosomalnej syntezy peptydów, lecz jako produkt biosyntezy rybosomalnej może być uznany za odpowiednik bakteriocyn – niewielkich białek o aktywności przeciwdrobnoustrojowej produkowanych przez bakterie.

Opisy metod eksperymentalnych zostały przez Autora rozprawy umieszczone w rozdziale *Materiały i Metody*. Są to opisy generalnie precyzyjne i kompletne.

Uwagi do tej części rozprawy:

- Z opisu sposobu hodowli komórek *N. edaphicum* CCNP1431 wynika, że nie podjęto prób optymalizacji warunków hodowli w kierunku maksymalizacji wydajności produktów metabolizmu wtórnego. Takie podejście, głównie ukierunkowane na optymalizację składu pożywki jest normą w przypadku hodowli promieniowców, bakterii lub grzybów wytwarzających antybiotyki i zwykle daje dobre rezultaty.
- Czy podczas dezintegracji komórek działaniem ultradźwięków stosowano chłodzenie w przerwach pomiędzy cyklami sonifikacji? Jest to zalecane z uwagi na istotny efekt cieplny działania ultradźwięków, który może powodować destrukcję wrażliwych produktów metabolizmu wtórnego.

Uzyskane rezultaty przedstawione zostały skrótowo w głównym rozdziale opisu pt. *Wyniki i dyskusja* o objętości 16 stron oraz w pełnej wersji w 3 publikacjach wchodzących w skład rozprawy. Odpowiednia analiza statystyczna została zastosowana wszędzie, gdzie było to konieczne. W opisie wyników wplecione zostały elementy komentarza w stopniu uprawnionym, a niekiedy nawet koniecznym. Jakość zamieszczonych zdjęć, rysunków i wykresów na ogół nie budzi wątpliwości.

Uwagi do tej części rozprawy:

- W opisie wyników nie zostały przedstawione chromatogramy separacji mieszaniny anabaenopeptyn i cyjanopeptolin przy użyciu preparatywnej HPLC. Oczywiście, nawet bez tych chromatogramów można być świadomym z jak trudnym zadaniem mierzył się Doktorant próbując rozdzielić mieszaniny wieloskładnikowe bardzo podobnych strukturalnie związków (szczególnie w przypadku mieszaniny cyjanopeptolin), jednakże przedstawienie chromatogramów, jak przypuszczam, pozwoliłoby w sposób bardziej oczywisty docenić Jego osiągnięcie.

- Hamowanie aktywności karboksypeptydazy A przez badane anabaenopeptyny, a z drugiej strony aktywność inhibicyjna cyjanopeptolin zawierających resztę Arg w pozycji 2 wobec trypsyny, a cyjanopeptolin zawierających w tej pozycji resztę Tyr, Phe lub Leu wobec chymotrypsyny, wydaje się dość jednoznacznie wskazywać na sposób wiązania tych związków w centrum aktywnym odpowiednich enzymów. Z dużym prawdopodobieństwem można na podstawie tych wyników założyć, że anabaenopeptyny wiążą się z karboksypeptydazą A w taki sposób, że katalityczna cząsteczka wody aktywowana przez jon cynku w centrum aktywnym tej metaloproteazy znajduje się w sąsiedztwie wiązania peptydowego pomiędzy resztami Val¹ (wolna grupa karboksylowa) i Lys². Z kolei, trypsyna i chymotrypsyna najprawdopodobniej wiążą odpowiednie cyjanopeptoliny w sposób zapewniający lokalizację wiązania peptydowego pomiędzy resztami w pozycjach 1 i 2 w pobliżu katalitycznej seryny. Potwierdzenie tego przypuszczenia można było zapewne uzyskać w wyniku dokowania molekularnego inhibitorów do centrów aktywnych odpowiednich enzymów.
- Uważam, że w przyszłych badaniach aktywności biologicznej peptydowych i peptydomimetycznych idiolitów produkowanych przez cyjanobakterie warto sprawdzić ich ewentualną aktywność inhibicyjną także wobec ważnych z medycznego punktu widzenia proteaz cysteinylowych, takich jak np. kaspazy lub katepsyny.
- Nie jest dla mnie jasne, w jaki sposób została wyznaczona wartość IC₅₀ związku CP 978 względem SARS-CoV-2 na podstawie danych przedstawionych na rys. 19 A. Powinno to być zrobione na podstawie krzywej z wykresu $\log[\text{replikacja wirusa}] = f([\text{stężenie związku}])$. Z drugiej strony, brak wyraźnej proporcjonalnej zależności wielkości efektu od stężenia, jest w mojej opinii nieco zaskakujący.

Rozprawa napisana jest generalnie dobrym językiem, czyta się ją z zainteresowaniem. Jedyna uwaga językowa dotyczy stosowania przez Autora określenia „rozdział” w odniesieniu do wyniku stosowania chromatografii. Powinno ono być zastąpione określeniem „rozdzielanie” lub „separacja”.

Dorobek publikacyjny p. mgr. Konkela obejmuje oprócz 5 publikacji składających się na rozprawę doktorską jeszcze 2 inne artykuły wieloautorskie w czasopiśmie *Toxicology In Vitro* oraz *Toxins*, oba z roku 2020. W jednej z tych publikacji p. Konkel jest pierwszym autorem. Ponadto w tym dorobku znajduje się jeszcze zestaw danych badawczych zdeponowany w repozytorium Zenodo. Wyniki badań Doktoranta przedstawiane były przez Niego jako komunikaty ustne (referaty) na czterech krajowych konferencjach naukowych oraz jako osiem komunikatów posterowych. Pan Konkel uczestniczył jako wykonawca w realizacji 7 projektów badawczych finansowanych przez NCN lub NCBiR. Biorąc ponadto pod uwagę zaangażowanie Doktoranta w różne aktywności o charakterze organizacyjnym na forum WOIG oraz w działalności w zakresie popularyzacji nauki, można Go z całą pewnością uznać za osobę szczególnie aktywną.

Analiza treści przedstawionych powyżej uwag i zastrzeżeń wyraźnie wskazuje, że po pierwsze jest ich niewiele, a ponadto, że większość kwestii, do których się one odnoszą, wynika prawie na pewno z niedokładności lub niezręczności opisu, a nie

rzeczywistych błędów. Część uwag, szczególnie te dotyczące opisu wyników i dyskusji nie ma charakteru krytycznego, lecz jedynie głosu w dyskusji naukowej. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że przedstawiona rozprawa spełnia warunki ustawowe, tj. prezentuje wysoki poziom ogólnej wiedzy teoretycznej, stanowi dowód na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz zawiera istotne elementy nowości naukowej, innymi słowy – oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Moja jednoznacznie pozytywna ocena jej zawartości skłania mnie do sformułowania wniosku o dopuszczenie p. mgr. Konkela do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jestem także całkowicie przekonany, że dorobek naukowy Doktoranta, w tym znacząca wartość ocenianej przeze mnie Jego rozprawy doktorskiej, uzasadniają nadanie mgr. Robertowi Konkelowi stopnia naukowego doktora.

