

Gdańsk, 15.04.2024 r.

## RECENZJA

pracy doktorskiej autorstwa mgr Roberta Konkela pt.  
„Struktura i aktywność biologiczna anabaenopeptyn i cyjanopeptolin  
produkowanych przez bałtycki szczep cyjanobakterii - *Nostoc edaphicum*  
CCNP1411”  
„Structure and biological activity of anabaenopeptins and cyanopeptolins  
produced by the Baltic cyanobacterium *Nostoc edaphicum*, strain CCNP1411”  
wykonanej na Wydziale Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego

pod kierunkiem  
Prof. dr hab. Hanny Mazur-Marzec  
oraz  
Dr Marty Cegłowskiej

Sinice należą do grupy prokariotycznych glonów pojawiających się na wszystkich kontynentach i wykazujących cechy bakterii i roślin fotoautotroficznych. Szacuje się, że sinice prawdopodobnie pojawiły się na Ziemi około 3 miliardów lat temu. Znanych jest ok. 2 tys. gatunków. Zawierają barwniki fotosyntetyzujące, takie jak chlorofil a,  $\beta$ -karoten, fikocyjanina oraz fikoerytryna warunkujące charakterystyczne ich zabarwienie od niebieskiego do czerwonego z przewagą niebieskozielonego. Występują prawie w każdym środowisku naturalnym, z uwagi na ich odporność na ekstremalnie warunki klimatyczne. Nawet rodzaj podłoża charakteryzującego się niskim pH nie wpływa negatywnie na funkcje życiowe sinic. Do najdogodniejszych warunków sprzyjających ich rozwojowi można zaliczyć słoną wodę, jej wysoką temperaturę oraz zanieczyszczenie środowiska ściekami miejskimi i przemysłowymi, a także nawozami pochodzącymi z pól.

Sinice będące organizmami pionierskimi odgrywają znaczącą rolę w przyrodzie, a także z uwagi na ogromną liczebność ich populacji w ekosystemie. Masowy rozwój i rozkład sinic może skutkować niekorzystnym ubytkiem tlenu rozpuszczonego w wodzie, co prowadzi do obumierania innych organizmów w ekosystemach wodnych. Niektóre gatunki wykazują działanie toksyczne na organizmy zwierzęce, a także ludzi.

---

Na ogół u cyjanobakterii obecnych w znacznie zanieczyszczonych akwenach, np. w akwenach o wysokim stopniu eutrofizacji wykształciło się wiele różnorodnych strategii obronnych. Pojawiają się wówczas toksyny sinicowe sprzyjające powstawaniu różnorodnych metabolitów wtórnych, m.in. takich jak alkaloidy, peptydy, polisacharydy i terpenoidy. Chronią one zarówno przed szkodliwymi warunkami środowiskowymi, jak i oddziałują na inne organizmy.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że toksyny sinicowe charakteryzują się aktywnością biologiczną o znaczącej cytotoksyczności, ale z drugiej strony wykazują właściwości farmakologiczne. Dlatego też, rozpoznanie tak aktualnej, ważkiej, a zarazem złożonej problematyki badawczej było dużym wyzwaniem stojącym przed Doktorantem, a jego praca doktorska wpisuje się w interesujący i oryginalny nurt badawczy.

Zdaniem autora dysertacji, bałtyckie cyjanobakterie są istotnym źródłem substancji biologicznie aktywnych o działaniu terapeutycznym. Tak więc cyjanometabolity mogą stanowić alternatywę dla opracowania substancji leczniczych o działaniu przeciwwirusowym. Zatem produkty naturalne, a więc w tym konkretnym przypadku pochodzące z Morza Bałtyckiego okazały się obiecującym materiałem do badań nad cyjanometabolitami produkowanym przez różne szczepy cyjanobakterii

Najogólniej rzecz ujmując podstawowym celem pracy było poszerzenie wiedzy dotyczącej cyjanobakterii *Nostoc edaphicum* CCNP1411 z uwzględnieniem analizy produkowanych przez ww. organizmy metabolitów, a także ich strukturalnej różnorodności i aktywności biologicznej.

W celu pełnej realizacji tak zdefiniowanego zadania badawczego należało przeprowadzić cykl badań polegających na:

- założeniu i prowadzeniu hodowli umożliwiającej pozyskanie odpowiedniej biomasy *Nostoc edaphicum* CCNP1411;
- zoptymalizowaniu procesu izolacji cyjanopeptolin i anabaenopeptyn przy użyciu technik chromatograficznych, tj. chromatografii błyskawicznej, preparatywnej i analitycznej;
- określeniu struktury chemicznej cyjanopeptolin i anabaenopeptyn przy użyciu chromatografii cieczowej połączonej z detekcją tandemowej spektrometrii mas (LC-MS/MS) i spektroskopii rezonansu jądrowego (NMR);
- ocenie aktywności biologicznej cyjanopeptolin z zastosowaniem testów *in vitro* przy wykorzystaniu enzymów oraz komórek nowotworowych, a także względem wirusa SARS-CoV-2 w kontekście rozpoznania mechanizmu antywirusowego działania tychże związków.

Przedłożona do zaopiniowania dysertacja liczy 253 strony. Na nią składa się Lista akronimów, Streszczenie polsko- i anglojęzyczne, Wprowadzenie, Główne cele pracy, Materiały i metody, Wyniki i dyskusja oraz Podsumowanie. W końcowej części rozprawy Autor zamieścił wykaz alfabetycznie zestawionego, poprawnie cytowanego piśmiennictwa w liczbie 122 pozycji literatury specjalistycznej. Rozprawę wieńczy Wykaz dorobku naukowego, dydaktycznego oraz organizacyjnego wypracowanego przez Doktoranta.

Przechodząc do krótkiej charakterystyki poszczególnych rozdziałów rozprawy, w przypadku części wprowadzającej pracy można stwierdzić, że Doktorant solidnie zapoznał się z aktualnym stanem wiedzy zbieżnej z jego zainteresowaniami badawczymi. Trafnie wyselekcjonował i wykorzystał liczne pozycje literaturowe, które okazały się wysoce przydatne na etapie redagowania części teoretycznej pracy. Tym sposobem praca doktorska

znacząco zyskała na wartości merytorycznej poprzez pogłębioną interpretację uzyskanych wyników badawczych. Świadczy to o przyswojeniu i zrozumieniu przez mgr Roberta Konkela współczesnych zagadnień dotyczących charakterystyki grupy organizmów, jakimi są cyjanobakterie. W tej części pracy, Autor scharakteryzował metabolity produkowane właśnie przez cyjanobakterie z rodzaju *Nostoc* z wyszczególnieniem związków modyfikujących aktywność enzymów, a także wykazujących działanie przeciwnowotworowe, czy przeciwwirusowe.

Odnosząc się do tej części rozprawy można stwierdzić, że została właściwie zredagowana i umiejętnie wprowadza czytelnika w całość zagadnień zaprezentowanych w kolejnych rozdziałach pracy, tj. w *Materiały i metody* oraz *Wyniki i dyskusja*. Struktura tej części pracy ułatwia czytelnikowi studiowanie zaprezentowanego w niej materiału faktograficznego.

Ustosunkowując się do części doświadczalnej pracy, należy podkreślić, że mgr Robert Konkel w pełni potwierdza poprawność przeprowadzonego przez niego cyklu prac badawczych, odznaczających się wysokim poziomem merytorycznym. Doktorant umiejętnie przybliży czytelnikowi rezultaty swoich badań rzetelnie udokumentowanych, zarówno w aspekcie metodyczno-analitycznym, jak i interpretacyjnym. Zostały one zaprezentowane w formie tabelarycznej oraz graficznej, np. odnośnie struktury związków produkowanych przez sinice, widm fragmentacyjnych anabaenopeptyny AP820Ne, sieci molekularnej wygenerowanej na podstawie widma HRMS/MS, czy analizy konfokalnej adhezji SARS-CoV-2). Podsumowując część eksperymentalną pracy można stwierdzić, że badania zostały od strony analitycznej właściwie zaplanowane i wykonane, dane pomiarowe poprawnie opisane i zinterpretowane, a założone cele konsekwentnie zrealizowane. Zatem cały warsztat badawczy nie budzi jakichkolwiek zastrzeżeń.

W końcowej części rozprawy, Doktorant dokumentuje fakt opublikowania wyników swoich badań w pięciu artykułach na łamach periodyków naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania, tj. *Marine Drugs* (IF = 5,4), *Biomolecules* (IF = 5,5), *International Journal of Environmental Research and Public Health* (IF = 4,6), *Marine Drugs* (IF = 5,4) oraz *Antiviral Research* (IF = 7,6).

Recenzja nie byłaby pełna, gdyby nie zawierała uwag krytycznych, chociaż należy podkreślić, że są nieliczne i głównie natury redakcyjnej, czy interpunkcyjnej. Otóż, niektóre z nich:

- str. 10, wiersz 17 i 16 od dołu; jest: „na wielofunkcyjnych kompleksach” zamiast „na bazie wielofunkcyjnych kompleksów”;
- str. 10, wiersz 4 od dołu; jest: ”modułowa a ich” zamiast ”modułowa, a ich”;
- str. 11, wiersz 1 od dołu; jest: „Barrientos i in., 2005 & 2003” zamiast „Barrientos i in., 2005, 2003”;
- str. 18, podrozdz. 3.1: wiersz 2 od dołu; jest: „zebrane materiał” zamiast „zebrany materiał”;
- str. 18, podrozdz. 3.2: wiersz 2 od góry; jest: „następnie działanie ultradźwięków” zamiast „następnie poddano działaniu ultradźwięków”;

- str. 18, podrozdz. 3.2: wiersz 5 od góry; jest: „Proces ekstrakcji takiej ilości biomasy sinic powtarzano 7 razy” zamiast „Proces ekstrakcji powtarzano 7-krotnie”;
- str. 19, podrozdz. 3.3: wiersz 6 od góry; jest: „określenia zawartości próbek analizy wykonano w” zamiast „określenia analitów procedurę analityczną przeprowadzono w”;
- str. 28, wiersz 5 od dołu; jest: „strukturą APs a aktywnością” zamiast „strukturą APs, a aktywnością”.

Odnosnie spisu piśmiennictwa, nie zawsze przestrzegano znormalizowanego systemu obowiązującego dla tytułów artykułów naukowych. Przykładowo jest:

Al-Awadhi, F.H.; Paul, V.J.; Luesch, H. Structural Diversity and Anticancer Activity of Marine-Derived Elastase Inhibitors: Key Features and Mechanisms Mediating the Antimetastatic Effects in Invasive Breast Cancer. *ChemBioChem* 2018, 19, 815–825.

Zamiast:

Al-Awadhi, F.H.; Paul, V.J.; Luesch, H. Structural diversity and anticancer activity of marine-derived elastase inhibitors: Key features and mechanisms mediating the antimetastatic effects in invasive breast cancer. *ChemBioChem* 2018, 19, 815–825.

Ten niewłaściwy sposób podawania tytułu publikacji w spisie piśmiennictwa występuje w poniżej przytoczonych przypadkach:

- Str. 42: Fidor et al.; Str. 43: Itou et al.; Str. 44: Leusch et al.; Str. 46: Pettit et al.; Str. 46: Kizu; Str. 46: Piret et al.; Str. 47: Salvador et al.; Spooft et al.; Str. 48: Williams et al.; Zafrir et al.

Do innych bardzo drobnych i nielicznych błędów z wykazie piśmiennictwa należą m.in.:

Str. 40: Adiv et al.: jest: *Microcystis aeruginosa* zamiast *Microcystis aeruginosa*;

Str. 40: Ashhurst et al.: jest: 65, , 2956-2970. zamiast 65, 2956-2970.;

Str. 45: Ocampo Bennet: Pominięto informację, że cytowana pozycja dotyczy dysertacji: Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Fakultät für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, 88p.;

Str. 45: Ocampo Bennet: jest: Bennet zamiast Bennett;

Str. 45: Ocampo Bennet: jest: au zamiast aus;

Str. 45: Ocampo Bennet: jest: Seiner zamiast einer;

Str. 45: Ocampo Bennet: jest: and zamiast und;

Str. 45: Ocampo Bennet: jest: Wannsee/Berli zamiast Wannsee/Berlin;

Str. 47: Sano et al.: jest: *Oscillatoria Agardhii* zamiast *Oscillatoria agardhii*;

Str. 47: Shah et al.: jest: Mar. Drugs zamiast *Mar. Drugs*.

Ponadto, odnośnie przytaczanego w wykazie piśmiennictwa numeru tomu artykułu, jest naprzemiennie zapisany kursywą, albo typową czcionką, Należy ujednoczyć ten zapis.

Zatem przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest przykładem uwieńczonej pełnym sukcesem próby, przeprowadzonego po raz pierwszy wnikliwego opisu bałtyckiego szczepu cyjanobakterii - *Nostoc edaphicum* CCNP1411.

Na szczególną uwagę zasługują nie tylko nowatorskie elementy poznawcze prowadzonych badań, ale także ich wielodyscyplinarny charakter, wymagający opanowania

rzetelnej wiedzy i praktycznych umiejętności m.in. z zakresu analityki chemicznej. Ponadto, przedłożona do zaopiniowania rozprawa została starannie zaplanowana i zrealizowana, zarówno pod względem poznawczym jak i metodycznym. Wymownym przykładem jest również jej tak powszechnie ceniony utylitarny aspekt przeprowadzonych przez Doktoranta badań.

Wśród znaczących osiągnięć naukowo-badawczych Doktoranta można wymienić takie jak:

- wnikliwa charakterystyka dwóch klas peptydów, tj. cyjanopeptolin i anabaenopeptyn wyróżniających się obniżoną podatnością na proteolityczne działanie enzymów, a z drugiej strony wykazujących silną aktywność biologiczną względem różnych proteaz serynowych. Te właściwości obu klas peptydów czynią je potencjalnymi substancjami wyjściowymi do opracowania nowych pochodnych o właściwościach farmakologicznych;
- opisanie 93, w tym 79 nowych analogów cyjanopeptolin, które stanowią największą liczbę cyjanopeptydów należących do jednej klasy, opisaną w jednym szczepie cyjanobakterii;
- uzyskanie zbieżnych wyników analizy porównawczej dotyczącej dwóch niezależnych procedur, tj. klasycznych metod identyfikacji cyjanopeptydów oraz nowoczesnych technik bioinformatycznych bazujących na niecelowanych analizach metabolomicznych z wykorzystaniem bazy GNPS. Co więcej, dla sześciu cyjanopeptolin potwierdzono zgodność ich struktur ze strukturami CPs na podstawie analizy widm fragmentacyjnych za pomocą spektroskopii NMR;
- wyizolowanie 34 czystych związków spośród 93 strukturalnie różnych cyjanopeptolin syntezowanych przez szczep CCNP1411, a przeprowadzone testy potwierdziły znaczenie reszty aminokwasowej zlokalizowanej między Thr1 a Ahp3 odpowiedzialnej za aktywność biologiczną tych związków. I tak, CPs zawierające Arg2 były najbardziej aktywne względem trypsyny, a z hydrofobową komponentą aminokwasową w pozycji 2 hamowały działanie chymotrypsyny, podczas gdy z Leu2 selektywnie hamowały działanie elastazy;
- ocena aktywności 15 CPs względem wirusa SARS-CoV-2, co zasługuje na uznanie zważywszy, że zgodnie z informacją Doktoranta dotychczas tylko w jednej publikacji scharakteryzowano aktywność przeciwwirusową peptydów podobnych do CP, zwanych ichtiopeptynami, a ściśle mówiąc frakcję zawierającą głównie ichtiopeptyny, a nie czyste związki. W przeprowadzonych w dysertacji testach wykazano, że CP 978 wykazywał zależne od stężenia działanie na replikację wirusa SARS-CoV-2 w komórkach A549ACE2/TMPRSS2. Trudno nie zgodzić się z opinią Doktoranta, że zidentyfikowanie dokładnej lokalizacji miejsca wiązania CP 978 z białkiem S ułatwiłoby przeprowadzenie procesów modyfikacji i optymalizacji struktury CP, co umożliwiłoby otrzymanie pochodnych o najlepszym potencjale terapeutycznym;
- Ze względu na aktywność cytotoksyczną, enzymatyczną oraz skuteczność względem SARS-CoV-2, związki produkowane przez bałtycki szczep *Nostoc edaphicum* CCNP1411 mogą być klasyfikowane jako związki wyjściowe do dalszych badań nad ich potencjałem farmaceutycznym.

Na szczególną uwagę zasługuje również fakt wzorcowego opracowania dwóch prac poglądowych ze znaczącym udziałem Doktoranta jak i obu promoterek jego dysertacji, przy czym Profesor Hanna Mazur-Marzec odgrywa wiodącą rolę w charakterze autora korespondującego obu artykułów, które ukazały się drukiem na łamach czasopism o zasięgu międzynarodowym. Dotyczą one aktualnej tematyki badawczej, tj. bioaktywnych peptydów produkowanych przez cyjanobakterie z rodzaju *Nostoc*, a także cyjanometabolitów wykazujących działanie przeciwwirusowe. Należy podkreślić trafnie dobrane i liczne, bo 256 pozycje literaturowe o zasięgu światowym. Tym sposobem dysertacja dzięki obu publikacjom poglądowym znacząco zyskała na wartości merytorycznej w aspekcie pogłębionej interpretacji uzyskanych rezultatów badawczych. Możliwe było wówczas zintegrowanie wyników badań własnych z tymi uzyskanymi w innych ośrodkach światowych, co z kolei umożliwiło trafne i krytyczne rozpoznanie aktualnych światowych trendów i strategii badawczych. Ponadto, nabyta przez mgr Roberta Konkela wiedza w zakresie jego zainteresowań badawczych umożliwiła szersze i pogłębione postrzeganie problematyki dotyczącej perspektywicznego wykorzystania wtórnych metabolitów cyjanobakterii do biotechnologicznego ich wykorzystania. Zdaniem Doktoranta, rozwój technik i technologii, m.in. spektrometrii mas oraz sekwencjonowania nowej generacji, przybliży perspektywę opracowania zaawansowanych narzędzi badawczych, czy metodologii odznaczających się większą czułością oraz mniejszą kosztochłonnością i czasochłonnością. W Jego opinii otwierają się również nowe możliwości w kontekście powiększenia zakresu uszczegółowienia eksploracji materiału badawczego poprzez analizy specyficznych genów, kodowanych białek, a także ścieżek metabolicznych, czy wytwarzanych metabolitów. Taka perspektywa sprzyja zarówno możliwości pozyskiwania nowych substancji o dużej aktywności terapeutycznej pochodzących bezpośrednio ze środowiska morskiego, jak również tworzeniu innowacyjnych związków. Faktycznie, bioróżnorodność bałtyckich cyjanobakterii, a także produkowane przez nie metabolity wtórne nie są jak dotychczas wystarczająco zbadane. Jednakże obserwowany postęp naszej wiedzy w tym zakresie otwiera szerokie perspektywy ich biotechnologicznego wykorzystania. Recenzent w całej rozciągłości podziela ten punkt widzenia Doktoranta.

Podsumowując, Doktorant przeprowadził w sposób poprawny interpretację udokumentowanych publikacją wyników swoich badań.

Dzięki umiejętnemu wykorzystaniu szeregu zaawansowanych narzędzi badawczych wniósł nowatorskie elementy poznawcze do swoich prac badawczych przyczyniając się do wzbogacenia naszej wiedzy dotyczącej charakterystyki metabolitów testowanych cyjanobakterii. Zatem cykl interdyscyplinarnych badań został ukoronowany pełnym sukcesem. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska w pełni odpowiada ustawowym kryteriom stawianym pracom doktorskim.

Ponadto, należy podkreślić, że przeprowadzony przez mgr Roberta Konkela cykl badań wyróżniający się dużym ładunkiem nowości naukowej można uznać za właściwie zaprojektowany, a także poprawnie wykonany. Doktorant odznaczał się w czasie realizacji zadań badawczych dużą biegłością analityczną, imperatywem, a także dociekliwością na etapie interpretacji danych pomiarowych. Uzyskał wysoce znaczące, interesujące, a także obiecujące wyniki na podstawie właściwie przeprowadzonych interdyscyplinarnych badań.


Wnioski zostały zredagowane z właściwą dozą ostrożności samokrytycyzmu naukowego i znajdują one pełne potwierdzenie w bogatym i różnorodnym materiale faktograficznym. Powyższe argumenty świadczą jednoznacznie o dojrzałości naukowej Doktoranta.

Odnosnie wkładu intelektualnego Doktoranta w opracowanie artykułów naukowych składających się na dysertację, dotyczy on 5 publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej, które ukazały się na łamach czasopism filadelfijskich o łącznym współczynniku oddziaływania, tj. IF = 28,50. Mgr Konrad Konkel jest pierwszym autorem we wszystkich trzech publikacjach eksperymentalnych, i do tego w dwóch z nich występuje w charakterze autora korespondującego. Odnosnie pozostałych 2 prac poglądowych, jego udział w ich opracowaniu można uznać za znaczący. W nawiązaniu do dorobku publikacyjnego po wyłączeniu ww. 5 artykułów wchodzących w skład doktoratu, mgr Konrad Konkel jest współautorem 3 innych publikacji oraz współautorem raportu. Wygłosił 4 referaty w sesji wykładowej uzyskując 4 nagrody za najlepsze wystąpienie. Ponadto wygłosił 8 referatów w sesji posterowej zdobywając 4 nagrody za najlepszy poster. We wszystkich 12 wystąpieniach konferencyjnych występuje w charakterze pierwszego autora. Ponadto, efektywnie pozyskiwał zewnętrzne środki finansowe na wykonywanie prac badawczych. Był wykonawcą 7 projektów badawczych, tj. OPUS23, OPUS17; OPUS 13; OPUS 11; RESEARCH & INNOVATION FOUNDATION, Restart 2016-2020, EXCELENCE/0421/0212. 2022-2024; FOCUS, STHB.04.01.00-LT-0071/16-00 realizowanego w konsorcjum z partnerami z Litwy, Szwecji i Danii oraz Polish-Norwegian Grant, 2014-2017. Na szczególną uwagę zasługuje tematyka naukowa dwóch projektów badawczych, tj. OPUS23 i OPUS17, zbieżna z profilem badawczym dysertacji, bowiem dotyczy ona metabolitów bałtyckich cyjanobakterii jako związków wyjściowych do opracowania nowych leków antywirusowych. .

**Biorąc powyższe pod uwagę, recenzent z pełnym przekonaniem stawia wniosek o wyróżnienie dysertacji z uwzględnieniem znaczącego dorobku naukowego Doktoranta. Jak już wspomniano, praca doktorska odznacza się dużym ładunkiem aktualności oraz nowości naukowej, a ponadto oprócz walorów poznawczych ma również wartość aplikacyjną.**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Roberta Konkela pt. "Struktura i aktywność biologiczna anabaenopeptyn i cyjanopeptolin produkowanych przez bałtycki szczep cyjanobakterii - *Nostoc edaphicum* CCNP1411" w pełni odpowiada wymogom ustawowym stawianym pracom doktorskim w świetle art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie Wyższym i Nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) oraz warunków określonych w art.13 ust.1 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). Wobec tego mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie Pana mgr Roberta Konkela do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład Bromatologii  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

  
prof. dr hab. n. farm. Piotr Szefer