INSTYTUT BIOLOGII
UNIWERSYTETU SZCZECIŃSKIEGO

dr hab. Lidia Skuza, prof. US
Centrum Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Instytut Biologii
Uniwersytet Szczeciński
ul. Wąska 13
71-415 Szczecin

Szczecin, 18.10.2024 r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr. Michała Grabskiego
pt. „Analizy genomiczne jako podstawy szacowania potencjału metabolicznego mikroorganizmów morskich"
wykonanej w Katedrze Biologii Molekularnej
Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego
pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna

Cyanobakterie, będące szeroko zróżnicowaną grupą prokariotycznych organizmów fotosyntetycznych, odgrywają kluczową rolę w ekosystemach, a jednocześnie stanowią przedmiot intensywnych badań zarówno w naukach podstawowych, jak i stosowanych. Ich zdolność do syntetyzowania szerokiego wachlarza metabolitów wtórnych pozwala im przystosować się do różnych stresów środowiskowych. Substancje te mają wysoką wartość bioaktywną i znajdują zastosowanie w licznych dziedzinach, w tym w badaniach farmaceutycznych i biotechnologii.

Pomimo trzech dekad intensywnych badań nad genomami cyjanobakterii, wciąż istnieje duża liczba genów i małych RNA (sRNA), których funkcje pozostają nieznane. Dodatkowo, wiele genów przypisanych na podstawie analogii sekwencji z modelami takimi jak *Escherichia coli* może pełnić inne role w cyjanobakteriach, co stanowi wyzwanie dla porównawczej genomiki oraz modelowania metabolicznego. Złożoność genomów cyjanobakterii, w tym wielogenowych rodzin o słabo poznanych funkcjach, wymaga dalszych badań w celu pełniejszego zrozumienia ich biochemicznego potencjału.

Proces tworzenia modeli genomowych na dużą skalę (GSM) jest wieloetapowy i zależy od weryfikacji i aktualizacji na podstawie dostępnych danych eksperymentalnych, takich jak pomiary strumieni metabolicznych i poziomów metabolitów. Niestety, wiele z tych modeli opiera się na przewidywaniach funkcji genów poprzez analogię sekwencyjną z innymi organizmami modelowymi, co może prowadzić do błędnych interpretacji w przypadku cyjanobakterii. Co więcej, białka w tych organizmach mogą pełnić więcej niż jedną funkcję, co dodatkowo komplikuje badania.

Celem recenzowanej pracy doktorskiej było nie tylko zsekwencjonowanie genomów wybranych szczepów sinic, ale także szczegółowa analiza genów kodujących enzymy kluczowe dla produkcji biologicznie aktywnych metabolitów. Autor zastosował nowatorskie podejście do genomiki, próbując przewidzieć zdolności sinic do syntezy związków przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Wyniki tych badań mogą znacząco przyczynić się do zrozumienia biosyntezy w sinicach oraz otworzyć nowe możliwości w kontekście ich biotechnologicznego wykorzystania.

Wobec powyższego uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Michała Grabskiego podejmuje ważną i aktualną problematykę badawczą, a wyniki dotyczące analizy genomów bałtyckich cyjanobakterii *Nostoc edaphicum* (szczep CCNP1411) i *Pseudanabaena galeata* (szczep CCNP1313) oraz ich zdolności do biosyntezy biologicznie aktywnych metabolitów są bardzo wartościowe zarówno pod względem poznawczym, jak i aplikacyjnym i mogą stanowić ważny punkt wyjścia do dalszych analiz.

Mam jedynie uwagę dotyczącą sformułowania tytułu rozprawy doktorskiej. Co prawda cel opisany w streszczeniu odpowiada tytułowi pracy, jednak w mojej opinii jest zbyt ogólny. Uważam, że wskazanie w tytule, że badanie skupione było na peptydach nierybosomalnych w sinicach z rodzaju *Nostoc*, które są szeroko rozpowszechnione we wszystkich rodzajach siedlisk i często wytwarzają bioaktywne peptydy o unikalnych modyfikacjach w strukturze oraz z rodzaju *Pseudanabaena*, które są źródłem metabolitów o silnej aktywności, znacznie lepiej oddawałoby główne treści zamieszczone w ocenianej rozprawie. Tym bardziej, że w literaturze światowej niewiele jest prac z tego zakresu.

Rozprawę doktorską stanowi zbiór trzech oryginalnych, powiązanych tematycznie artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych o łącznym współczynniku oddziaływania IF 9,0 (wg roku wydania publikacji 13,832) i liczbie punktów ministerialnych 160 (wg roku wydania publikacji 280). W jednej pracy Doktorant jest pierwszym autorem, w dwóch pozostałych Jego nazwisko jest na drugim miejscu.

Do wykazu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej Autor dołączył streszczenie w języku polskim i angielskim, w którym wprowadza w problematykę badawczą, przedstawia jasno sprecyzowany cel pracy oraz syntetycznie opisuje tematykę i wyniki otrzymane w kolejnych pracach. Do artykułów dołączone są oświadczenia współautorów. Wkład autorski Doktoranta w powstanie publikacji nie budzi wątpliwości. Układ przedłożonej do recenzji rozprawy nie budzi zastrzeżeń pod względem formalnym.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy:

1. Fidor A., Grabski M., Gawor J., Gromadka R., Węgrzyn G., Mazur-Marzec H. (2020). *Nostoc edaphicum* CCNP1411 from the Baltic Sea - A new producer of nostocyclopeptides. Marine Drugs, 18: 442.

2. Konkel R., Grabski M., Cegłowska M., Wieczerzak E., Węgrzyn G., Mazur-Marzec, H. (2022). Anabaenopeptins from *Nostoc edaphicum* CCNP1411. International Journal of Environmental Research and Public Health, 19: 12346.
3. Grabski M., Gawor J., Cegłowska M., Gromadka R., Mazur-Marzec H., Węgrzyn, G. (2024). Genome mining of *Pseudanabaena galeata* CCNP1313 indicates a new scope in the search for antiproliferative and antiviral agents. Microorganisms, 12: 1628.

Pierwsza publikacja opisuje szczegółowe badania genomu szczepu *Nostoc edaphicum* CCNP1411, które dostarczają cennych informacji na temat biosyntezy peptydów nierybosomalnych (NRPS) w sinicach. Kompletny genom tego szczepu został zsekwencjonowany *de novo*, zidentyfikowano także klaster genów odpowiedzialnych za biosyntezę nostocyklopeptydów oraz przeprowadzono ich charakterystykę *in silico*.
Dodatkowo, analiza struktury produktów genów *ncp* doprowadziła do odkrycia nowych analogów nostocyklopeptydów, z niewielkimi modyfikacjami strukturalnymi, głównie w postaci liniowych aldehydów peptydowych. To odkrycie jest interesujące, ponieważ sugeruje, że proces cyklizacji tych związków może zachodzić znacznie wolniej niż wcześniej sądzono. Publikacja dostarcza zatem nowych informacji na temat różnorodności biochemicznej *N. edaphicum* oraz wskazuje na potencjalne kierunki przyszłych badań w zakresie biosyntezy związków bioaktywnych w sinicach.
Ważnym wynikiem w pracy jest przewidywanie specyficzności substratowej na podstawie kodu specyficzności adenylacji, co potwierdzono analizami LC-MS/MS. Wyniki te podkreślają ogromny potencjał biosyntezy peptydów nierybosomalnych w szczepie *N. edaphicum* CCNP1411, co ma ważne implikacje dla przyszłych badań nad bioaktywnymi metabolitami.

Wyniki badań dostarczyły nowych informacji na temat mechanizmów biosyntezy Ncps oraz ich potencjalnej roli jako inhibitorów transporterów organicznych anionów, co może mieć znaczenie w dalszych badaniach nad terapiami przeciwnowotworowymi.
Podsumowując, praca ta dostarcza cennych informacji na temat biosyntezy metabolitów wtórnych przez cyjanobakterie. Jest to przykład rzetelnie przeprowadzonych badań z dużym potencjałem aplikacyjnym w biotechnologii i farmakologii.

W kolejnej pracy Autor przeprowadził dokładną analizę regionu genomu *N. edaphicum* CCNP1411, który prawdopodobnie zawiera geny odpowiedzialne za produkcję anabenopeptyn. Głównym celem badań było zbadanie produkcji anabenopeptyn przez ten szczep, z zastosowaniem metod genetycznych oraz chemicznych.
Autor zidentyfikował główną strukturę klastra genów, która obejmuje cztery kluczowe geny: *aptA*, *aptB*, *aptC* i *aptD* kodujące białka z domenami adenylacji, kluczowymi dla aktywacji aminokwasów w procesie syntezy peptydów.

W pracy zastosowano różnorodne metody analizy, takie jak chromatografia cieczowa, spektrometria masowa (LC-MS/MS) oraz spektroskopia NMR, co pozwoliło na szczegółowe charakterystyki chemiczne związków. Dodatkowo, w kontekście aktywności biologicznej, badania wykazały, że anabenopeptyny hamują działanie kluczowych enzymów metabolicznych, co podkreśla ich potencjał w zastosowaniach terapeutycznych.

Wyniki analizy genomowej oraz dane uzyskane z analiz LC-MS/MS były spójne i potwierdziły specyficzność aminokwasów aktywowanych przez poszczególne domeny adenylacji. Konfiguracja D oraz metylacja w pozycji drugiej i piątej anabenopeptyn była zgodna z oczekiwaniami na podstawie analiz genomicznych.

Praca ta wskazuje na bardzo dobrą znajomość narzędzi genomicznych oraz technik analitycznych, a także prezentuje wyniki o dużym znaczeniu dla dalszego rozwoju badań nad biosyntezą peptydów nierybosomalnych w sinicach. Szczegółowa analiza genów odpowiedzialnych za syntezę anabenopeptyn w szczepie *N. edaphicum* CCNP1411 stanowi cenny wkład w zrozumienie mechanizmów biosyntezy tych związków oraz ich potencjalne zastosowania biotechnologiczne.

W trzeciej publikacji, dotyczącej genomu *Pseudanabaena galeata* CCNP1313 badano potencjał antyproliferacyjny i przeciwwirusowy tego szczepu, który wykazuje obiecujące właściwości jako źródło związków bioaktywnych. Szczególną uwagę poświęcono jego złożonej strukturze oraz potencjalnym zastosowaniom w dziedzinie farmakologii.

Odkrycia dotyczące regionu kodującego syntazę PKS/NRPS podkreślają potencjał tych systemów enzymatycznych w produkcji związków o aktywności biologicznej, co może być istotne w kontekście poszukiwań nowych środków antyproliferacyjnych i przeciwwirusowych. Ponadto badania nad klastrami genów syntazy poliketydowej (PKS) ujawniają ich powiązania z innymi enzymami, co może wskazywać na szerszy potencjał biosyntetyczny *P. galeata*. Całość wyników sugeruje, że badany szczep ma znaczny potencjał do produkcji związków bioaktywnych, co otwiera nowe kierunki w eksploracji naturalnych źródeł leków i substancji o działaniu przeciwnowotworowym oraz przeciwwirusowym.
Badania *P. galeata* CCNP1313 są znaczące w kontekście odkrywania nowych substancji o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwwirusowym, co wpisuje się w rosnące zainteresowanie naturalnymi źródłami leków. Publikacja podkreśla znaczenie zastosowania nowoczesnych metod molekularnych i bioinformatycznych w odkrywaniu potencjalnych metabolitów oraz ich potencjalnego zastosowania w biotechnologii i farmakologii.

Podsumowując, praca ta otwiera nowe możliwości badawcze związane z cyjanobakteriami i ich metabolitami, co może przyczynić się do rozwoju innowacyjnych strategii w poszukiwaniu leków przeciwko nowotworom i wirusom.

Wniosek końcowy

Po recenzji rozprawy doktorskiej, mogę stwierdzić, że Pan mgr Michał Grabski przedstawił bardzo ciekawy i jednocześnie trudny temat. Ambitny cel został osiągnięty z zastosowaniem nowoczesnych metod badawczych, a Autor wykorzystał swoją wiedzę, aby dokładnie przeanalizować dane. Praca Pana mgr. Michała Grabskiego stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i wnosi cenny wkład w rozwój nauk biologicznych.

Podsumowując ocenę stwierdzam, że praca doktorska mgr. Michała Grabskiego 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. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. 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 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr. Michała Grabskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lidia Skuza

/Lidia Skuza/