



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

2016 09. 23

Kraków, 19 września 2016 r.

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin

Kierownik

Prof. dr hab. Jan Białczyk

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani **mgr Agnieszki Felczykowskiej** zatytułowanej „Aktywności biologiczne związków produkowanych przez mikroorganizmy występujące w zakwitach oraz hodowlach cyjanobakterii”.

Rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Felczykowskiej została opracowana w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna oraz dr Beaty Guzow-Krzemińskiej. Doktorantka przedstawiła jako osiągnięcie naukowe 5 prac oryginalnych i 1 przeglądową, są one tematycznie zbliżone, opublikowane w czasopismach naukowych o uznanej międzynarodowej renomie między innymi w; *Toxicon*, *European Journal of Phycology* czy *Microbial Cell Factories*.

Zasadniczą podstawę doktoratu stanowią wg mojej opinii wyniki opublikowane w niżej wymienionych pracach numerowanych od 1 do 3. Wszystkie 6 są publikacjami wieloautorskimi. W pracach tych poza jedną Doktorantka jest pierwszym autorem a w 3 spośród wymienionych także autorem korespondencyjnym. Pomimo oczywistej trudności w jednoznacznym określeniu pełnego wkładu Kandydatki do stopnia doktora w przygotowanie koncepcji badawczych i ich opracowanie to załączone oświadczenia współautorów przekonują o Jej znaczącej roli w ich powstaniu. Ułatwieniem w ocenianiu wyników jest także fakt, że wszystkie publikacje podlegały wcześniejszej merytorycznej ocenie przez co najmniej dwóch recenzentów redakcyjnych.

Publikacje zaliczone do osiągnięcia naukowego;

1. **Felczykowska, A.**, Pawlik, A., Mazur-Marzec, H., Toruńska-Sitarz, A., Narajczyk, M., Richert, M., Węgrzyn G., Herman-Antosiewicz, A. (2015). Selective inhibition of cancer cells' proliferation by compounds included in extracts from Baltic Sea cyanobacteria. *Toxicon*, 108, 1-10.
2. Mazur-Marzec, H., Błaszczyk, A., **Felczykowska, A.**, Hohlfeld, N., Kobos, J., Toruńska-Sitarz, A., Devi, P., Montalvão, S., D'Souza, L., Tammela, P., Mikosik, A., Bloch, S., Nejman-Faleńczyk, B., Węgrzyn, G. (2015). Baltic cyanobacteria—a source of biologically active compounds. *European Journal of Phycology*, 50(3), 343-360.
3. **Felczykowska, A.**, Dydecka, A., Bohdanowicz, M., Gąsior, T., Soboń, M., Kobos, J., Bloch, S., Nejman-Faleńczyk, B., Węgrzyn, G. (2014). The use of fosmid metagenomic libraries in preliminary screening for various biological activities. *Microbial cell factories*, 13(1), 1.
4. **Felczykowska, A.**, Bloch, S. K., Nejman-Faleńczyk, B., Barańska, S. (2012). Metagenomic approach in the investigation of new bioactive compounds in the marine environment. *Acta Biochimica Polonica*, 59, 501-505.
5. **Felczykowska, A.**, Krajewska, A., Zielińska, S., Łoś, J. M., Bloch, S. K., Nejman-Faleńczyk, B. (2015). The most widespread problems in the function-based microbial metagenomics. *Acta Biochimica Polonica*, 62(1), 161-166.
6. **Felczykowska, A.**, Krajewska, A., Zielińska, S., Łoś, J. M. (2015). Sampling, metadata and DNA extraction—important steps in metagenomic studies. *Acta Biochimica Polonica*, 62(1), 151-60.

Przedstawione do oceny materiały obejmują także oprócz kserokopii publikacji streszczenia w języku angielskim i polskim, dokumentację uwzględniającą wyniki w formie chromatogramów oraz oświadczenia współautorów załączonych publikacji. Uzyskana za pośrednictwem Dziekana Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego Pana prof. dr hab. Dariusza Szlachetko dokumentacja jest w moim przekonaniu kompletna i umożliwia sformułowanie oceny dorobku naukowego Kandydatki do stopnia doktora.

Zmieniające się w czasie ponad 4 mld lat warunki dla ewolucji żywych organizmów pozwoliły im na zajęcie na Naszej Planecie niezwykle zróżnicowanych siedlisk od przyjaznych do ekstremalnie trudnych. Imponująca liczba gatunków (tylko sinic około 3300) określająca bioróżnorodność obejmuje według systematycznej przynależności jaką zaproponował Carl Woese domeny; najliczniejszą *Bacteria* przy nieporównywalnie słabiej reprezentowanych *Archea* i *Eukarya*. Niezwykle szybki postęp w zakresie opracowywania nowych metod analitycznych i narzędzi stosowanych w biologii molekularnej i genetyce pozwoliły w ostatnich latach na rozbudowę domeny *Bacteria* o kolejne nowe rzędy (Pace). Przydatna do identyfikacji nowych gatunków okazała się metoda sekwencji nukleotydowej 16S rRNA a 1990 rok był datą rezygnacji z obowiązującego we wcześniej wcześniejszej systematyce podziału na *Procariota* (bakterie i sinice) i *Eukariota* – obejmujące pozostałe gatunki świata ożywionego.

Moim zdaniem istotnym dla oceny trafności wyboru i oryginalności problemu badawczego pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Felczykowskiej jest przypomnienie dwóch faktów. Pomimo niezwykłego postępu w rozwoju metod analitycznych nadal obowiązują zapisane w 1923 roku w Bergey's Manual warunki, dla scharakteryzowania i opisanie nowego gatunku (wymagana jest m.in. konieczność jego wyhodowania na odpowiednim podłożu). Innym dobrze poznanym ograniczeniem jest fakt, że tylko nieliczną grupę mikroorganizmów można utrzymać w hodowli laboratoryjnej podczas gdy ich liczba określana w 1 g osadów czy w 1 ml w środowisku wodnym potwierdzona metodami mikroskopowymi i molekularnymi obejmuje czasami dziesiątki milionów egzemplarzy.

Obraz ten zmienia się radykalnie wówczas gdy zamiast pojedynczych genomów poddaje się sekwencjonowaniu kompletny DNA izolowany z próby pobranej ze środowiska – reprezentujący wszystkie mikroorganizmy. Analiza podobnych genomów obejmująca izolowany ze środowiska DNA, klonowanie jego fragmentów w odpowiednim wektorze, transformację do gospodarza bakteryjnego oraz przegląd bakteryjnych transformantów umożliwia coraz bardziej popularna w mikrobiologii metoda metagenomiki. Wśród

prekursorów klonowania pikoplanktonu morskiego przy użyciu wektora fagowego znaczące miejsce zajmują Pace N.R i wsp. Ważnym osiągnięciem w tym zakresie było także opracowanie przez Stein i wsp. (1996 r.) pierwszej biblioteki plazmidowej bezpośrednio z morskich prokariotów.

Opisane w pracy Pani mgr Felczykowskiej wyniki badań nad antybakteryjną oraz antynowotworową aktywnością biologiczną ekstraktów pozyskanych z określonych morskich gatunków sinic hodowlanych oraz późniejsze zastosowanie metagenomiki dla sprawdzenia właściwości sinicowego DNA pozyskiwanego z prób środowiskowych pobieranych z Morza Bałtyckiego są w moim przekonaniu najciekawszą częścią pracy.

Badania te umożliwiały poszukiwanie genów dla syntezy nowych związków (metabolitów) lub produkcję, wcześniej poznanych o pożytecznych zdefiniowanych właściwościach. Wymagany do tego rodzaju doświadczeń DNA/RNA o możliwie najwyższym stopniu oczyszczenia, odpowiedniej wielkości konieczny dla rzetelnej analizy filogenetycznej a także funkcjonalnej wraz z kolejnymi etapami procedury metagenomicznej, trudnościami w doborze starterów dla PCR, czy problemy m.in. związane z doбором wektora i gospodarza w procesie klonowania oraz konieczność zastosowania skomplikowanej bazy bioinformatycznej było w moim przekonaniu „jak wejście” na pole minowe. Budzi więc moje uznanie fakt, że pomimo tylu potencjalnych zagrożeń udaje się jednak uzyskiwać powtarzalne wyniki.

Nachodzi mnie równocześnie nieodparcie myśl, jeśli błędna to proszę o sprostowanie, czy nie jest tak że pobierane w określonym czasie próby środowiskowe są czymś w swoim składzie jednorazowym, i niekoniecznie powtarzalnym przy następnych, późniejszych zdarzeniach np., zakwitach? W takich warunkach utrata interesującego klonu o szczególnie wartościowych właściwościach może okazać się trudna lub niemożliwa do odzyskania?

Pani mgr Agnieszka Felczykowska jako główny cel ocenianej rozprawy doktorskiej ustaliła określenie potencjalnych właściwości syntetyzowanych metabolitów, określanych w dysertacji ogólnie jako aktywności biologiczne mikroorganizmów hodowanych w laboratorium oraz sinic pochodzących z prób środowiskowych pobranych z zakwitów z Zatoki Gdańskiej z lat 2009 i 2011. W laboratoryjnej hodowli wykorzystano 27 szczepów sinic wyizolowanych z Morza Bałtyckiego reprezentujących rzędy *Chroococales*, *Oscillatoriales* oraz *Nostocales*, pozyskanych z kolekcji Wydziału Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego.

Sformułowano trzy etapy realizacji zadań badawczych;

- a) Wykorzystując ekstrakty wodne lub etanolowe sinic hodowlanych określono aktywność enzymatyczną (19 enzymów) oraz antybakteryjną w stosunku do *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* (Gram dodatnie) oraz *Serratia marcescens* i *Pseudomonas aeruginosa* (Gram ujemne).
- b) Pozyskane ekstrakty wodne lub etanolowe (22 rodzaje) z 11 szczepów sinic z Morza Bałtyckiego zastosowano w układzie *in vitro* dla sprawdzenia ich potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej w stosunku do linii komórkowej nowotworu piersi MCF-7. W następnej serii eksperymentów wykorzystano trzy najaktywniejsze w procesie inhibicji żywotności komórek MCF-7 ekstrakty etanolowe. Ekstrakty te z *M. aeruginosa* CCNP1102, *Pseudanabaena* sp. CCNP 1311 oraz *Pseudanabaena cf. galeata* CCNP 1313 o wartościach IC_{50} dla komórek linii MCF-7 wynoszące 100, 50 oraz 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ odpowiednio, wykorzystano w dalszych studiach dwojako; dla wyjaśniania mechanizmu ich cytotoksyczności a następnie do sprawdzenia ich wpływu na przeżywalność komórek HeLa - raka szyjki macicy.
- c) Sprawdzano aktywność przeciwnowotworową mieszaniny ekstraktów z 5 wybranych szczepów sinic, wyizolowanych z Morza Bałtyckiego (Kolekcja UG).

Ważnym osiągnięciem prezentowanej pracy jest zastosowanie funkcjonalnej analizy metagenomicznej do skonstruowania trzech bibliotek metagenomowych na podstawie DNA izolowanego z zakwitu *Nodularia spumigena* z 2009 roku (I), *Nodularia spumigena* i *Aphanisomenon flos-aque* z 2011 roku (II) oraz wspomnianych już 5 szczepów cyjanobakterii pochodzących także z Morza Bałtyckiego; *Microcystis aeruginosa* CCNP 1101, *Microcystis aeruginosa* CCNP 1102, *Microcystis aeruginosa* CCNP 1103 *Anabena* sp., CCNP 1406 *Synechocystis salina* CCNP 1104 (III). Umożliwiły one wyszukiwanie aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej. Przeanalizowano te właściwości poprzez sprawdzenie około 600 klonów *Escherichia coli* z wbudowanymi fragmentami (plazmidami) środowiskowego DNA z dwóch pierwszych bibliotek. Dalsze studia obejmowały także potencjalne właściwości antybakteryjne w stosunku do wspomnianych już gatunków; *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* oraz *Serratia marcescens* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Podkreślenia wymaga fakt wykorzystania w trakcie badań najnowocześniejszych metod z zakresu biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, uzyskania wielkiej liczby

wartościowych wyników, oraz znakomitego rozeznania Doktorantki w związanej z tematyką badawczą literaturze (prace nr 4, 5, i 6). Pani mgr Agnieszka Felczykowska mogła i skorzystała w badaniach nad wybranymi morskimi gatunkami sinic izolowanych z Morza Bałtyckiego z infrastruktury i uznanego, świetnego dorobku naukowego Opiekunów z Gdańskiego Ośrodka Naukowego. Opanowała przy tym imponujący warsztat badawczy.

W kategorii nowości wymaganej w przypadku dysertacji doktorskich oprócz już wymienionych do najcenniejszych wybranych osiągnięć należy zaliczyć następujące wyniki;

- a) Ekstrakty izolowane z bałtyckich sinic zawierają liczne aktywne enzymy. Niektóre spośród 19 sprawdzanych takie jak fosfataza alkaliczna lub kwaśna, esteraza czy naftylo-AS-BI-fosfohydrolaza występowały w 21 na 27 badanych szczepów. Inne raczej rzadko a co ciekawe wykazano znaczące zależności od szczepu różnice zarówno w liczbie zidentyfikowanych enzymów jak i ich aktywności.
- b) Dodatek ekstraktów etanolowych oraz wodnych *Microcystis aeruginosa* hamował wzrost wszystkich badanych bakterii; *Staphylococcus aureus* DMB-PR-1-20 ($MIC_{50}=42 \mu\text{g ml}^{-1}$), *Micrococcus luteus* DMB-pR1-1 ($MIC_{50}=42 \mu\text{g ml}^{-1}$), *Serratia marcescens* DMBpR-1-2 ($MIC_{50}=74 \mu\text{g ml}^{-1}$) oraz *Pseudomonas aeruginosa* DMB-PR-1-23 ($MIC_{50}=168 \mu\text{g ml}^{-1}$). Niektóre z ekstraktów na przykład z *Cyanobacterium* sp. CCMP105 przeciwnie stymulowały ich wzrost.
- c) Z medycznego punktu widzenia szczególną wagę należy przypisać określeniu aktywności przeciwnowotworowej trzech ekstraktów etanolowych uzyskanych z; *Microcystis aeruginosa* CCNP 1102, *Pseudanabeana cf. galeata* CCNP 1313 oraz *Pseudanabeana* CCNP 1311. Wykazywały one silną inhibicję żywotności komórek nowotworowych raka piersi oraz podobną ich aktywność w stosunku do linii komórek nowotworu szyjki macicy HeLa. Istotne z tego punktu widzenia wydają się także obserwacje wykazujące dodatnią korelację tych procesach z czasem ekspozycji i stężenia oddziaływujących ekstraktów (przy względnie nieistotnym wpływie na odpowiednie zdrowe komórki kontroli). Uzyskane wyniki wykorzystano także do sformułowania hipotezy wyjaśniającej ewentualny mechanizm działania ekstraktów oraz ich specyficzne oddziaływania na proces apoptozy lub komórkowych efektów nekrotycznych.
- d) Opisano także przyspieszanie procesu wzrostu *Escherichia coli* poprzez geny niesione na plazmidzie, szczególnie w przypadku klonów 123-3 oraz 129-3.

Z obowiązku recenzenta muszę zgłosić kilka pytań oraz krytycznych uwag:

- (I) Obydwie przedstawione wersje językowe angielska i polska nie są równoważne treściowo, dlaczego? W wersji polskiej linia 11 od góry, cytat „została wyizolowana z zaledwie kilku szczepów cyjanobakterii pochodzących z tropikalnych źródeł”, w wersji angielskiej jest „in the tropical climate”.

Trzy linie niżej, cytat „Morze Bałtyckie charakteryzuje się unikalnymi warunkami ekologicznymi spowodowanymi ograniczoną wymianą wody z Wszechocyanem. Morze Bałtyckie jest zaliczane do Oceanu Atlantyckiego należy więc do Wszechocyanu.

- (II) Strona 15 linia 7 i 8; wśród wymienionych klas związków pominięto bliskie mojemu sercu toksyny sinicowe, podczas gdy w oryginalnych załączonych publikacjach występują. Wśród wymienianych są „laktany” winno być „laktony”. Strona 20 linie 28, 29 w wersji polskiej jest „*Nodularia spumigena*”, a w wersji angielskiej i publikacji numer 3 „*Nodularia sp.*”. Strona 20 linia 33; strona 21 linia 4 i 8 cytacja dotycząca wyników wskazująca na pracę numer 5 jest błędna, ponieważ opublikowano je w pracy numer 3. Strona 21 linia 19 jest „29 min” – w publikacji jest „28 min”.

Strona 19 linia 8 od dołu, cytat „jest charakterystyczna dla linii komórek raka piersi MCF-7 czy też uniwersalne dla komórek nowotworowych, zbadalam.....na żywotność komórek nowotworu szyjki macicy HeLa”. To nie wyjaśnia jeszcze ich uniwersalności?

W załączonej publikacji 1 zauważono literówki, strona 7 jest „*Pseudoanabaena* (2x)”, winno być *Pseudanabaena*. W załączonych chromatogramach Fig.3S cyjanopeptolina o m/z 1090 nie występuje.

Podane przykładowo wskazane niedociągnięcia lub nieporadności językowe nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Felczykowskiej. Oceniając przedstawione osiągnięcie pragnę podkreślić bardzo wysoką rangę czasopism, w których został wydany drukiem cykl publikacji. **Spełnia ono wymogi określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki wraz z późniejszymi zmianami.**

Podsumowanie. Wniosek końcowy.

Oceniając całościowo zaprezentowane w pracy doktorskiej niezwykle wartościowe, rozbudowane wyniki, wymagające pracowitości, opanowania trudnych metod badawczych, znakomitego rozeznania w literaturze związanej z podjętą tematyką badawczą oraz dojrzałość w formułowaniu na ich podstawie wniosków i hipotez uważam, że Kandydatka w pełni zasługuje na przyznanie Jej stopnia naukowego doktora.

Uwzględniając potencjalne możliwości przyszłych zastosowań efektów tego kierunku poszukiwań badawczych oraz wartość recenzowanego osiągnięcia naukowego, **wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Felczykowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Równocześnie proszę o przyznanie wyróżnienia za rozprawę doktorską.

