

Gdańsk 28.10.2024

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

Badania zawarte w rozprawie doktorskiej były realizowane w ramach dwóch projektów finansowanych przez NCN. Projektu zatytułowanego **Peptydy produkowane przez bałtyckie cyjanobakterie – od identyfikacji do wyboru związku wiodącego**. OPUS: 2016/21/B/NZ9/02304 oraz projektu **Metabolity bałtyckich cyjanobakterii jako naturalna biblioteka związków wyjściowych w poszukiwaniu nowych leków antywirusowych**. OPUS: 2019/33/B/NZ9/02018

Cyjanobakterie należą do fotoautotroficznych mikroorganizmów prokariotycznych dominujących w ekosystemie globalnym. Mają zdolność do przeprowadzania zarówno typowej fotosyntezy tlenowej jak i fotosyntezy beztlenowej korzystając z siarczków jako donorów elektronów. Różne gatunki cyjanobakterii potrafią też asymilować cukry i inne składniki organiczne w obecności światła (t.zw. fotoheterotrofia). Wiele gatunków potrafi wykorzystywać azot atmosferyczny, co sprawia, że są niezależne od zasobów azotu w środowisku, w którym występują. Mogą pozyskiwać energię w ciemności, wykorzystując endogenne węglowodany. Zdolność do absorpcji światła o różnych długościach fali, czyli fotoadaptacja, sprawia, że mają niezwykle szerokie spektrum wykorzystywanej energii światła a przeprowadzana przez nie fotosynteza zachodzi w sposób bardzo efektywny. Wykazują również unikalną zdolność do absorpcji światła o fali dłuższej niż 700 nm czyli z dalekiej czerwieni.

Ze względu na wszechstronność metabolizmu, zdolności do szybkiego przetaczania jednego typu metabolizmu na drugi (fototrofizm-heterotrofizm), cyjanobakterie zasiedliły wiele różnych środowisk. Jako że są pierwotnymi producentami w sieci pokarmowej, uważane są za organizmy pionierskie. Zdolność do przyswajania CO₂ i N₂, a także szeroki zakres zasiedlanych warunków środowiskowych sprawiają, że są najbardziej rozpowszechnionymi oraz najliczniejszymi organizmami żywymi na Ziemi. Służą również jako organizmy modelowe do badań fotosyntezy, syntez metabolitów wtórnych oraz regulacji ekspresji specyficznych dla tej grupy genów. Biorą również udział w szerokim spektrum symbioz, w szczególności w złożonych bakteryjnych konsorcjach. Mimo ich ogromnego znaczenia ekologicznego nie są grupą

wszelkstronnie zbadaną. Pierwszą kompletną sekwencję genomu cyjanobakterii *Synechocystis* sp. PCC 6803 poznano w 1996 roku. Na sekwencje genomów przedstawicieli rodzaju *Nostoc* – Trzęsido trzeba było poczekać kolejne pięć lat. Aby określić strukturę całego genomu *Nostoc* sp. PCC7120 konieczne było połączenie strategii sekwencjonowania typu „shotgun” z metodą „bridge shotgun”. Uzyskanie czterech bibliotek shotgun z trzema typami wektorów klonowania z całkowitego DNA komórkowego szczepu PCC7120, zajęło parę lat pracy. Dzięki temu ten nitkowaty i tworzący heterocyty szczep wyizolowany pod koniec lat 60 z jeziora Michigan stał się organizmem modelowym cyjanobakterii wiążących azot atmosferyczny. W tym samym roku poznano też sekwencję szczepu *Nostoc punctiforme* ATCC 29133=PCC 73102. Szczep ten, wyizolowany jako symbiont z korzenia sagowca nagonasiennego *Macrozamia* sp. w latach 70-tych, posiada zdolność do symbiozy z grzybami i roślinami.

Aktualnie czyli prawie 30 lat po opublikowaniu pierwszej sekwencji genomu cyjanobakterii w bazie danych GenBank znajduje się 6299 genomów cyjanobakterii z czego tylko 4108 posiada adnotację. Dla porównania 1,9 miliona wszystkich genomów bakteryjnych posiada adnotację. Jedynie 430 spośród genomów cyjanobakterii złożonych jest w zamknięty kolisty chromosom co pokazuje dysproporcję w badaniach genomicznych tej ważnej grupy mikroorganizmów.

Mając na uwadze powyżej przytoczone fakty wybór obiektu badań i tematu rozprawy jest trafny z punktu widzenia potrzeby pogłębienia wiedzy w zakresie potencjału genetycznego cyjanobakterii ale również potrzeby lepszego zrozumienia mechanizmów związanych z biosyntezą związków biologicznie czynnych syntezowanych przez cyjanobakterie i potencjału ich zastosowań.

Obiekty badań pana mgr Michała Grabskiego to przedstawiciele dwóch rodzajów cyjanobakterii rodzaju *Nostoc*, które znaleźć można zarówno w środowiskach lądowych, jak i wodnych. Dzięki polisacharydowej matrix zewnętrznej mogą przetrwać i rozwijać się w różnych warunkach środowiska, od pustyń, terenów trawiastych, regionów polarnych po obszary tropikalne. Ponadto posiadanie heterocytów czyli wyspecjalizowanych komórek efektywnie wiążących azot stanowi dodatkowy atut tej pionierskiej grupy cyjanobakterii. Gatunki planktoniczne *Nostoc* tworzą kolonie komórek przypominające naszyjnik. Unikalną cechą tego rodzaju jest zdolność do biosyntezy wtórnych metabolitów charakteryzujących się dużą różnorodnością struktur i aktywności biologicznych.

Rodzaj *Pseudanabaena* należy do rzędu *Synechococcales*. Przedstawiciele tej grupy są opisywani jako nitkowate, organizmy z zazwyczaj prostymi, zwężonymi i krótkimi filamentami bez kalyptry, nie wytwarzające wyspecjalizowanych komórek do wiązania azotu. Uważa się, że *Pseudanabaena* nie jest w stanie wiązać azotu atmosferycznego, mimo że geny nitrogenazy występują w sekwencji genomowej. Obecnie liczba gatunków zaliczanych do rodzaju

Pseudanabaena zbliża się do pięćdziesięciu. Cyjanobakterie te występują w bentonicznych i planktonicznych społecznościach ekosystemów morskich i słodkowodnych. Notowane są również w siedliskach lądowych na całym świecie. W komórkach przedstawicieli *Pseudanabaena* zidentyfikowano toksyny, należące do mikrocytyn, anatoksyn czy też cylindrospermopsyn. Spośród 16 poznanych genomów w obrębie tego rodzaju jedynie 5 jest złożonych w kompletny chromosom w tym jeden w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

Autor ocenianej rozprawy podjął się ciekawego wyzwania mającego na celu określenie kompletnej struktury genomów wybranych szczepów cyjanobakterii wyizolowanych z Morza Bałtyckiego oraz zidentyfikowanie informacji genetycznej związanej z biosyntezą biologicznie czynnych metabolitów. Doktorant w swoich badaniach wykorzystał alternatywne podejście do wykorzystania analizy genomu w celu przewidywania biosyntezy związków o aktywnościach przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych.

Rozprawa mgr Michała Grabskiego ma charakter eksperymentalny i jest zbiorem 3 powiązanych tematycznie prac naukowych. Praca obejmuje 108 stron tekstu włączając zawarte w niej publikacje. W rozprawie doktorskiej ujęto kolejno: streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, następnie kolejno treść trzech publikacji i następujące po nich kopie oświadczeń współautorów, za ostatni rozdział stanowi wykaz dorobku naukowego doktoranta.

Tu mam wrażenie pewnego braku, do zobrazowania pełniejszej sylwetki naukowej kandydata do stopnia naukowego doktora, zabrakło hasłowego podsumowania dokonań pana mgr Michała Grabskiego. Nie jest to oczywiście wymóg stawiany rozprawom doktorskim, ale myślę, że w kontekście prac doktorskich o charakterze zbioru opublikowanych publikacji naukowych, sylwetka doktoranta stanowi ważny element prezentujący zaangażowanie naukowe i efekty pracy młodego naukowca.

Do treści streszczenia mam pytanie, co autor ma na myśli pisząc „Odporność sinic prowadzi do zjawisk bardzo szybkiego ich namnażania się odporność na co?”

W dalszej części autor pisze o metabolitach wtórnych i mechanizmach ich syntezy - warto byłoby zdefiniować jakie role pełnią metabolity wtórne w komórkach cyjanobakterii.

Prace naukowe ujęte w rozprawie doktorskiej autorstwa mgr Michała Grabskiego zostały opublikowane w rozpoznawalnych czasopismach naukowych: *Marine Drugs* (2020) w tej pracy doktorant jest drugim autorem, *International Journal of Environmental Research and Public Health* (2022) w tej pracy doktorant jest drugim autorem oraz *Microorganisms* (2024) w tej pracy doktorant jest pierwszym autorem.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktoranta zostały opisane w kontekście ich ciągłości z wcześniejszymi wynikami zespołu badawczego, którego liderką była pani prof. dr hab. Hanna Mazur-Marzec. Podjęte w ramach pracy doktorskiej zadania wymagały, szerokiej wiedzy bioinformatycznej i biegłości w analizowaniu złożonych struktur białek zaangażowanych w syntezy nierybosomalne co wymagało również znajomości dotychczas rozwiązanych struktur klastrów genów syntezy nierybosomalnej.

W realizacji założonego celu badawczego pan magister Michał Grabski korzystał z wielu narzędzi bioinformatycznych. Genomy adnotowane były przy użyciu NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. W celu uzyskania regionów kodujących syntetazy metabolitów wtórnych, otwarte ramki odczytu zostały zweryfikowane programem Prodigal i przesłane do platform analitycznych antiSMASH, SeMPI, ClusterMine360 i NaPDoS. Sekwencje porównywano z sekwencjami z baz danych NCBI, PDB i AlphaFold. Sekwencje nukleotydowe porównywano przy użyciu programu Clustal Omega, zaś sekwencje białkowe przy pomocy narzędzia BLAST. Program Operonmapper użyto do przewidywania operonów w genomie. Poszukiwanie motywów peptydowych w sekwencjach kodujących przeprowadzono przy użyciu programu SeqKit. Wybrane regiony poddano przewidywaniu ewolucyjnie konserwowanych domen białkowych i wyszukiwaniu motywów w bazie danych Conserved Domain Database. Struktury drugorzędowe wybranych białek wyjaśniono za pomocą Jnet i I-Tasser. Białka transbłonowe przewidywano za pomocą TMHMM. Struktury typu „stem-loop” w sekwencjach DNA znaleziono za pomocą programu DNA Punctuation. Genom wizualizowano za pomocą narzędzia CGView Comparison Tool (CCT).

Pierwszą publikacją z cyklu stanowi praca pt. „*Nostoc edaphicum* CCNP1411 from the Baltic Sea - A new producer of nostocyclopeptides”. Opublikowana w sierpniu 2020 na łamach *Marine Drugs* doi:10.3390/md18090442. Na dzień wykonywania recenzji zacytowana została 7 razy wg bazy Scopus.

Analiza genomu *N. edaphicum* CCNP1411 wykazała jego wieloreplikonowy charakter. Genom składa się z chromosomu kolistego (7 733 505 bp) i pięciu plazmidów (od 44,5 kb do 264,8 kb). W kolejnym kroku pan mgr Michał Grabski skoncentrował się na identyfikacji determinant genetycznych wtórnych metabolitów wytwarzanych przez badany szczep *Nostoc*. Związki te charakteryzują się dużą różnorodnością struktur i aktywnością biologiczną. Na podstawie struktury chemicznej, są klasyfikowane głównie do peptydów, poliketydów, lipidów, polisacharydów i alkaloidów. Efektywnie wytwarzane cyjanopeptydy o działaniu przeciwnowotworowym, przeciwdrobnoustrojowym, przeciwwirusowym i hamującym enzymy przyciągają uwagę badaczy. Poszukiwanie klastrów genów syntazy peptydów nierybosomalnych, ujawniło cztery regiony w obrębie chromosomu, kodujące białka o charakterystycznej architekturze domen syntaz peptydów nierybosomalnych. Sekwencje kodujące znalezione w badanym genomie wykazały podobieństwa do znanych klastrów genów

biosyntezy peptydów, przypuszczalnie odpowiedzialnych za syntezę nostocyklopeptydów, cyjanopeptolin i anabaenopeptyn. Niektóre metabolity, takie jak nostocyklopeptydy lub kryptoficyny, są wytwarzane wyłącznie przez cyjanobakterie z rodzaju *Nostoc*. Nostocyklopeptydy stanowią niewielką klasę peptydów nierybosomalnych. Do tej pory odkryto tylko trzy analogi tych związków a ich formy liniowe wykryto jedynie w kilku szczepach *Nostoc* wyizolowanych w różnych lokalizacjach. Obecność nostocyklopeptydów została potwierdzona w ekstrakcie komórkowym badanego szczepu *N. edaphicum*, co miało wpływ na wyjaśnienie struktury klastra genów nostocyklopeptydów. Autor zidentyfikował dwa geny, *ncpA* i *ncpB*, które kodują białka z powtarzalnymi modułami katalizującymi syntezę peptydów. Specyficzność substratową domen przewidziano przy użyciu kodu przypisującego specyficzność, zaproponowanego na podstawie wcześniejszych danych literaturowych. Na tej podstawie Doktorant zidentyfikował substraty aminokwasowe, których sekwencja okazała się zgodna ze strukturami wykrytymi przez analizy LC-MS/MS. Oprócz znanych peptydów, Ncp-A1 i Ncp-A2, wykryto sześć innych związków przypuszczalnie scharakteryzowanych jako nowe analogi nostocyklopeptydu. Niezależnie od warunków ekstrakcji stwierdzono, że zawartość w komórkach liniowych nostocyklopeptydów jest wyższa niż peptydów cyklicznych, co sugeruje wolne tempo procesu makrocyklizacji.

Tu moje pytanie czy peptydy cyklinczne mogą rozpadać w trakcie ekstrakcji, czy też proces przebiega w mało korzystnych warunkach, czy jest jakaś inna przyczyna takiego stanu rzeczy, czy to jest zjawisko powszechniej obserwowane?

Kolejną publikację cyklu stanowi praca pt. „Anabaenopeptins from *Nostoc edaphicum* CCNP1411”, opublikowana we wrześniu 2022 w czasopiśmie International Journal of Environmental Research and Public Health, <https://doi.org/10.3390/ijerph191912346>. Na dzień wykonywania recenzji, praca została zacytowana 2 razy, według bazy Scopus.

Analizy sekwencji genomu *Nostoc edaphicum* CCNP1411 ujawniły obecność regionu podobnego do klastra genu syntetazy anabaenopeptyny. Anabaenopeptyny należą do powszechnie występujących metabolitów cyjanobakterii, które powstają w wyniku działania syntaz peptydów nierybosomalnych. Tą grupę peptydów zidentyfikowano po raz pierwszy w *Anabaena flos aquae* i nazwano na cześć organizmu źródłowego. Biosyntezę tych związków udokumentowano także u *Nostoc*, jak też u wielu innych rodzajów cyjanobakterii. Wzmiankowana praca poświęcona została określeniu organizacji klastra genu i porównaniach z wynikami analizy strukturalnej anabaenopeptyn obecnych w biomacie wykonanych przy użyciu LC-MS/MS i NMR. Struktura anabaenopeptyn obejmuje pięcioczłonowy pierścień peptydowy połączony wiązaniem ureidowym z jednym łańcuchem bocznym aminokwasu. Różnorodność strukturalna anabaenopeptyn jest determinowana przez organizację klastra genów i odpowiadającego mu modułowego kompleksu wieloenzymatycznego syntazy nierybosomalnej.

W badaniach potwierdzono biosyntezę tej grupy peptydów w śladowych ilościach a ich charakterystyka wymagała pozyskania dużo większej ilości biomasy *N. edaphicum*. Dzięki przeprowadzonym badaniom zidentyfikowano trzy nowe warianty strukturalne a ich struktury okazały się charakterystyczne dla anabaenopeptyn wytwarzanych przez cyjanobakterie z rodzaju *Nostoc*. Jak się okazało na przykładzie omawianych badań same nieukierunkowane analizy chemiczne mogą nie pozwolić na detekcję związków wytwarzanych przez cyjanobakterie w śladowych ilościach. Natomiast, jednoczesne zastosowanie metod genetycznych i chemicznych pozwoliło na ujawnienie pełnego profilu metabolicznego badanego mikroorganizmu.

Tu mam pytanie: w pracy tej znalazło się stwierdzenie „Jak już postulowali inni autorzy, wraz ze wzrostem liczby nowych wariantów anabaenopeptyny, ich nomenklatura musi zostać usystematyzowana”. Czy doktorant ma w tej kwestii swoje przemyślenia czy propozycje?

Trzecią publikację stanowi praca pt. „Genome mining of *Pseudanabaena galeata* CCNP1313 indicates a new scope in the search for antiproliferative and antiviral agents”. Opublikowana w sierpniu 2024 w czasopiśmie *Microorganisms*, doi.org/10.3390/microorganisms12081628.

Wcześniejsze badania mające na celu poszukiwanie nowych leków pochodzących z *Pseudanabaena galeata* CCNP1313 wykazały silną aktywność ekstraktów przeciwko komórkom nowotworowym i wirusom. Jednak nie określono żadnych substancji czynnych. Zadaniem mgr Michała Grabskiego w ramach tej pracy było wykorzystanie alternatywnego podejścia w celu zbadania potencjału tego szczepu jeśli chodzi o biosyntezę metabolitów wtórnych. Autor rozprawy określił sekwencję genomu *Pseudanabaena galeata* CCNP1313. Jak się okazało składa się ona z sześciu replikonów, kolistego chromosomu (4 928 719 bp) i pięciu megaplazmidów, o całkowitej wielkości genomu 5 842 326 bp. Mimo, iż wcześniejsze badania wiązały aktywność biologiczną *P. galeata* CCNP1313 z peptydami, nie znaleziono rejonów w genomie kodujących w pełni funkcjonalne systemy NRPS, które mogły być odpowiedzialne za biosyntezę peptydów o sugerowanych strukturach.

Tak zwane „ciche” geny klastrów syntezy lub niewystarczająca wydajność produktu wyekstrahowanego z komórek cyjanobakterii, to spory problem napotykanym w badaniach potencjału ich metabolitów. Zastosowane podejście doprowadziło do rozróżnienia czterech klas nowo opisanych syntetaz, które potencjalnie są zaangażowane w biosyntezę metabolitów. Jednakże dwa regiony w chromosomie, kodujące domeny adenylacji, znajdujące się w dwóch oddzielnych loci, prawdopodobnie nie odpowiadają za syntezę peptydów, ponieważ domniemane reakcje kondensacji przeprowadzane przez syntetazy wykorzystują w syntezie produktu inne cząsteczki oprócz aminokwasów. Drugi zidentyfikowany klaster genów okazał się kodować mieszany, hybrydowy system PKS/NRPS, prawdopodobnie produkujący hybrydy poliketydowo-aminokwasowe. Zidentyfikowano także prawdopodobny gen syntetazy

lantipeptydowej, zlokalizowany w obrębie plazmidu pPg_03, łącznie z genem peptydu prekursorowego i genami powiązаныmi z mechanizmem wydzielniczym, który umożliwia potencjalną produkcję rybosomalnie syntetyzowanych i potranslacyjnie modyfikowanych peptydów. Potencjalnie wskazuje to na nową klasę modyfikowanych peptydów, znanych jako cyjanotyny. Wszystkie szlaki syntezy metabolitów wtórnych, opisane na podstawie analizy genomu *P. galeata* CCNP1313, obejmowały białka, które wcześniej nie były adnotowane. Analizy te zakończyły się konkluzją sugerującą by w dalszych badaniach podjąć próbę zastosowania warunków zapewniających wyższą stabilność badanych związków lub ich ochronę przed czynnikami destabilizującymi oraz wykorzystanie aparatury MS, o zdolności detekcji w wyższym zakresie mas cząsteczkowych.

Na zakończenie proszę Doktoranta o komentarze odnośnie omówionych prac.

1. Jaka jest nasza aktualna wiedza na temat stabilności metabolitów wtórnych wytwarzanych przez cyjanobakterie w kontekście problemu napotkanego w 3-ciej pracy?

2. Odnośnie przeprowadzonych badań w kontekście struktury, obecności lub braku obecności określonych metabolitów wtórnych. Badane szczepy hodowano w warunkach laboratoryjnych, w zdefiniowanych pożywkach mineralnych, które nie odzwierciedlają w pełni składu wody bałtyckiej i obecnych w niej różnych dodatkowych komponentów. Czy pan magister może skomentować na ile może to zaważyć na uzyskanych wynikach i czy są jakiegokolwiek dane literaturowe w tym aspekcie?

3. Jak doktorant zapatruje się na kwestię możliwości pozyskiwania związków biologicznie aktywnych z cyanobakterii szczególnie tych, których bardzo mała zawartość w biomacie stwarza problem już przy ich identyfikacji.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że wyniki ujęte w rozprawie doktorskiej mgr Michała Grabskiego są spójne i wartościowe z punktu widzenia podjętej problematyki badawczej. Doktorant pokazał, że potrafi samodzielnie sformułować i rozwiązać problem naukowy, a także właściwie wykorzystać i połączyć różne metody badawcze. Przeprowadzone i opisane doświadczenia niewątpliwie wnoszą nowe informacje do ogólnej wiedzy na temat genomiki, identyfikacji determinant genetycznych i mechanizmów biosyntezy metabolitów wtórnych cyjanobakterii.

Na dostrzeżenie zasługuje też całkowity dorobek naukowy doktoranta to 10 publikacji wliczając 3 wchodzące w skład rozprawy doktorskiej. Prace te opublikowano w czasopiśmie open access między innymi: *Nature Communications*, *International Journal of Molecular Sciences* czy *Scientific Reports* i są one cytowane.

Przedstawioną mi do oceny pracę doktorską mgr Michała Grabskiego „**Analizy genomiczne jako podstawy szacowania potencjału metabolicznego mikroorganizmów morskich**” oceniam wysoko, rozprawa spełnia wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach naukowych 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 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.), a dorobek naukowy kandydata w pełni uzasadnia nadanie stopnia doktora nauk biologicznych. Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pana mgr Michała Grabskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

