Dr hab. Iwona Mruk
Katedra Mikrobiologii
Uniwersytet Gdański
Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
iwona.mruk@biol.ug.edu.pl

Gdańsk, dnia 04 lutego 2019 roku

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdy Furmaniak
„Jadalne cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* - genetyka, fizjologia i bezpieczeństwo stosowania jako produkt pochodzenia naturalnego".

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Magdy Furmaniak została wykonana pod opieką pana dr hab. Krzysztofa Walerona, i zrealizowana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Praca doktorska była wykonywana w ramach kilku projektów bileteralnych pomiędzy Polską i Belgią, oraz finansowana także z dotacji projakościowej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (KNOW) dla Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Praca pani mgr Magdy Furmaniak dotyczy analizy genomowej cyjanobakterii (czyli sinic) z rodzaju *Arthrospira*, powszechnie znanych pod nazwą Spirulina z powodu ich przydatności do spożycia oraz wielorakich aktywności prozdrowotnych.

W erze powszechnej antybiotykooporności bakterii, nauka poczyniła pewną zmianę kierunku w poszukiwaniu nowych aktywności bakteriobójczych. Następuje obecnie, systematyczna eksploracja różnych siedlisk, a zwłaszcza tych, w których panują ekstremalne warunki do życia, jak tropiki i rejony arktyczne. Rezerwuary wodne tych rejonów wykazują niezwykłą bioróżnorodność mikroorganizmów, w tym nowych gatunków bakterii i bakteriofagów, a także cyjanobakterii. Zainteresowanie tymi organizmami doprowadziło do odkrycia ich nieznanych dotąd właściwości oraz jest źródłem wiedzy o ich biologii. W nowoczesnych badaniach analiza sekwencji genomowych i identyfikacja nieznanych dotąd genów jest często pierwszym etapem na drodze do poszukiwań nowych aktywności enzymatycznych oraz wykrywania substancji biologicznie czynnych. Ponadto w

dobie powszechnie przyjętej praktyki utrzymywania strategii pro-ekologicznych w żywieniu i suplementowania diety, warto weryfikować wiarygodność stosowania pewnych substancji bioaktywnych, czy też całych mikroorganizmów, tak jak w tym przypadku, stosując naukową metodologię. Dlatego przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest interesująca i wpisuje się w nurt bardzo aktualnych badań.

Przedstawiana rozprawa doktorska liczy 190 stron, w tym 42 strony aneksu zawierającego ryciny i tabele oraz 164 pozycje literaturowe. Praca została napisana w poprawnym układzie tekstu typowym dla eksperymentalnych prac doktorskich w rozdziałami w następującej kolejności: tytuł pracy, spis treści, cele pracy, streszczenie w jęz. polskim i angielskim, wstęp, materiały, metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie z wnioskami końcowymi oraz spis literatury.

Doktorantka nakreśla **Cele pracy** w postaci kilku zadań badawczych, które można podzielić na dwa typy: 1) tych związanych z analizą *in silico*, tj. analizą genomów i transkryptomu *Arthrospira* z uwzględnieniem stopnia konserwacji jednostek genetycznych dla systemów obrony przed inwazyjnym DNA; 2) tych związanych z klasycznymi technikami mikrobiologicznymi stosowanymi w ocenie czystości i identyfikacji bakterii w preparatach spożywczych *Arthrospira*, zwanych pod nazwą handlową Spirulina.

W liczącym 29 stron **Wstępie** pani mgr Magda Furmaniak na podstawie przeglądu danych literaturowych przedstawia wybrane zagadnienia związane z ogólną charakterystyką cyjanobakterii, a następnie skupia się na rodzaju *Arthrospira*. Opisuje ich morfologię, fizjologię, miejsca ich naturalnego występowania, a także metody hodowania oraz ich wykorzystanie w biotechnologii i przemyśle spożywczym. Porusza również problematykę związaną z klasyfikacją taksonomiczną cyjanobakterii i podaje obecną przynależność systematyczną *Arthrospira*. Zaskakującym faktem jest to, że mimo, iż cyjanobakterie są najbardziej rozpowszechnioną grupą fototrofów na Ziemi to obecnie dostępnych jest niewiele całkowicie zsekwencjonowanych ich genomów. W dalszej części autorka scharakteryzowała bakteryjne systemy ochrony przed inwazyjnym DNA, tj. systemy restrykcyjno-modyfikacyjne oraz CRISPR. Tę część pracy oceniam bardzo dobrze. Rozdział ten jest napisany zwięzłym językiem, klarownie z dobrze zorganizowanymi podrozdziałami. Przedstawione zagadnienia poparte są licznie cytowaną literaturą.

W obszernym rozdziale **Materiały i Metody** Autorka w sposób syntetyczny opisuje prawidłowo dobrane zastosowane metody, które można podzielić na: bioinformatyczne, mikrobiologiczne oraz techniki biologii molekularnej, co jako przyjęta w świecie nauki zasada, pozwala na ich powtórzenie przez niezależnych badaczy. Niektóre metody opisano

zbyt szczegółowo, a można było powołać się na instrukcje dostępne u producentów tych zestawów komercyjnych.

W kluczowym rozdziale **Wyniki** Autorka najpierw przedstawia zgromadzony wyjściowy materiał biologiczny w postaci 18 szczepów *Arthrospira* przeznaczonych do badań. Nie jest dla mnie jasne, na jakiej zasadzie Doktorantka wyselekcjonowała spośród nich 5 szczepów, których genomowy DNA poddano sekwencjonowaniu. Pisze o pewnych genotypach, które reprezentują, ale nie zostało to dostatecznie wyjaśnione. Brakuje tu odniesienia do danych literaturowych lub zawarcia informacji o genotypach w Tabeli 1 lub 9. Ponadto, jeden z wyselekcjonowanych szczepów (*Arthrospira* sp. O9.13F) nie jest wymieniony, ani w Tabeli 9, ani w Tabeli 1 rozdziału Materiały. Domyślam się tylko, że owe genotypy mogą reprezentować różne klastry ITS (ang. Internal Transcribed Spacer). Zamieszczona Tabela 9 pokazuje tzw. współczynniki czystości DNA (260/280nm) osiągnięte dla wyizolowanego DNA, ale Doktorantka w żaden sposób się do nich nie odnosi. Czy o wyborze szczepu do sekwencjonowania DNA decydował również ten współczynnik? Jeśli tak, to tylko dwa preparaty DNA spełniały kryteria czystości (~1,8), czemu zatem sekwencjonowaniu poddano DNA o niskich współczynnikach czystości jak np. 0,18 w przypadku szczepu *Arthrospira fusiformis* CCALA023? Jaki może mieć to wpływ na reakcje sekwencjonowania od strony technicznej?

Sekwencjonowanie genomowego DNA dla 5 szczepów przeprowadzono w systemie Illumina HiSeq, a następnie odczyty DNA składano z użyciem programów podanych w rozdziale Metody. W tym czasochłonnym etapie Doktorantka aktywnie uczestniczyła, co prawdopodobnie poprzedzone było specjalistycznymi szkoleniami w tym zakresie. Następnie Autorka dokonuje analizy 5 zsekwencjonowanych genomów oraz 8 innych genomów *Arthrospira* dostępnych z baz danych pod kątem obecności genów kodujących systemy restrykcyjno-modyfikacyjne i systemy CRISPR. Przedstawia zbiorcze tabele wskazujące na liczną obecność obu tych systemów w każdym z analizowanych genomów (Tabela 11, 12, 13). Doktorantka również prezentuje organizację genetyczną operonów CRISPR/Cas z określeniem typów wydzielonych wg pracy Makarova et al. 2011. Na Wykresie 1 prezentuje liczbę loci systemów CRISPR dla sekwencjonowanych genomów *Arthrospira* na tle innych cyjanobakterii. Wykonuje też drzewa filogenetyczne na podstawie analizowanych sekwencji, co doprowadza do ciekawego wniosku o występowaniu wyraźnego rozdziału *Arthrospira* na dwa klady, które odpowiadają klastrom I i III wobec klastra II. Dalej Autorka wykonuje podobne analizy dla genów zaangażowanych w syntezę metabolitów wtórnych oraz dla fragmentów DNA niosących geny profagów.

Próbuje znaleźć korelacje pomiędzy przynależnością *Arthrospira* do odpowiednich klastrów, a obecnością szukanych determinant genetycznych. Do tej części Wyników mam następujące pytania: ciekawi mnie, jak Autorka określiła specyficzność systemów R-M Typu II, tzn. jakie sekwencje rozpoznają? Opisana metoda (6.5.2.2) tylko częściowo odpowiada na to pytanie i sugeruje kryterium 50% identyczności na poziome aminokwasowym. Generalnie endonukleazy restrykcyjne odznaczają się bardzo niskim poziomem podobieństwa w sekwencji aminokwasowej (nawet poniżej 20%) dla enzymów o tej samej specyficzności. Odwrotnie jest z genami różnych metylotransferaz DNA (o innych specyficznościach), które są bardzo podobne w sekwencji aminokwasowej. Brakuje mi także w tekście komentarza Autorki, dlaczego wiele szczepów posiada gen endonukleazy restrykcyjnej, np. SacI, przy jednoczesnym braku genu pokrewnej metylotransferazy DNA (Tabela 12). Wiemy, że taki układ jest letalny. Czy Autorka sprawdzała funkcjonalność tego genu poprzez badanie aktywności enzymu w lizacie *Arthrospira*?

Wyniki związane z analizą poziomu ekspresji genów systemów R-M i CRISPR w warunkach promieniowania gamma są dla mnie najmniej jasne z całego rozdziału. Odnośnie tych wyników mam wiele pytań. Jaki związek ma fakt jonizującego promieniowania niszczącego strukturę DNA na poziom ekspresji genów kodujących białka obrony przed inwazyjnym DNA? Czy były jakieś przesłanki, aby spodziewać się zmiany w ekspresji tych genów? O czym może świadczyć obniżony lub podwyższony ich poziom? Proszę też o komentarz, jeśli chodzi o zastosowane dawki promieniowania, jaka dawka jest letalna dla *Arthrospira*? Bakteria *Deinococcus radiodurans* jest w stanie przeżyć dawkę 5000 Gy, ale nie *Escherichia coli*, a ta dawka użyta była w eksperymencie jako dawka warunkująca stres u *Arthrospira*. Mało jest też informacji dodatkowych o analizach transkryptomicznych, ale niezbędnych do interpretacji wyników, jak np. o walidacji wyników poprzez ilościowy PCR na matrycy cDNA (tzw. q-RT-PCR) etc. Tabela 1 (aneks 3) sumująca wyniki nie pokazuje jednoznacznie korelacji w ekspresji genów wraz z dawką promieniowania.

W kolejnym rozdziale Autorka weryfikuje funkcjonalność uprzednio zidentyfikowanych genów metylotransferaz DNA należących do Typu II *in silico*, metodami eksperymentalnymi z użyciem komercyjnych enzymów restrykcyjnych. Na podstawie analizy Fotografii 18-24 Autorka uważa, że wszystkie testowane enzymy są aktywne, gdyż „brak produktów cięcia enzymami restrykcyjnymi DNA genomowego" (cyt. str. 105) użytego do reakcji. W mojej opinii jakość fotografii nie pozwala na taką interpretację. Przy aktywnej metylotransferazie, genom powinien być całkowicie zmetylowany i oporny na trawienie

pokrewnym enzymem restrykcyjnym. Zatem prążek odpowiadający genomowemu DNA powinien być identyczny w przypadku nietrawionego, jak i trawionego enzymem restrykcyjnym. Tymczasem, obraz na żelach jest całkowicie inny np. Fot. 21 lub 22; ścieżki 17 i 18; lub 19 i 20. Po działaniu enzymów, DNA wygląda na całkowicie zdegradowany. Jak zatem Autorka to tłumaczy? Ponadto, w niektórych przypadkach kontrolna specyficzna fragmentacja substratowego DNA faga lambda nie jest widoczna. Fotografie dokumentujące te wyniki byłyby znacznie bardziej czytelne, gdyby zastosowano ich typ negatywowy. Ponadto, ciekawi mnie dlaczego nie próbowano weryfikacji funkcjonalności endonukleaz restrykcyjnych dla systemów R-M Typu II?

W drugiej części Wyników Autorka poddała analizie preparaty komercyjne zawierające *Arthrospira*. Na podstawie analiz wariantów ITS z użyciem reakcji PCR, stwierdziła, że tylko jeden zawiera jednorodną masę cyjanobakterii, inne stanowią mieszaninę wielu szczepów. W mojej opinii, Fotografie 26, 27, 28 są mało czytelne, aby potwierdzić konkluzje Autorki. Na ogół nie widać różnic między kontrolą pozytywną i negatywną na analizowanym wydruku (Fot. 26, czy 27). Dodatkowo na Fot. 29 zaznaczono ścieżki od 1 do 13, a opisano tylko 7. W dalszej kolejności Autorka poddała preparaty testom mikrobiologicznym i wykazała obecność szczepów bakteryjnych, w tym *Staphylococcus*. Wykazała zanieczyszczenia preparatów Spiruliny nawet do wartości powyżej 2×10^7 bakterii na 1 gram masy preparatu. Doktorantka także określiła bakterie symbiotyczne, tzw. szczepy towarzyszące wzrostowi *Arthrospira,* jak *Halomonas*, *Bacillus, Rhodobaca*, *Roseinatronobacter,* czy inne nieznane gatunki. Są to bakterie niezwykle ciekawe, bo do optymalnego wzrostu potrzebują wysokiego pH, jak bakterie purpurowe rodzaju *Rhodobaca*, czy wysokiego zasolenia, jak *Halomonas*. Doktorantka wykonała dla nich analizy filogenetyczne. Ta część wyników wydaje się bardzo cenna z uwagi na nowe informacje o biologii cyjanobakterii tego rodzaju.

Podsumowując rozdział **Wyniki**, mam wrażenie, że Autorka opisała wszystkie eksperymenty i projekty, które prowadziła, bez dokonania niezbędnych redukcji.

Rozdział **Dyskusja** jest napisany już dużo lepiej. Autorka swoje wyniki i obserwacje krytycznie zestawia z danymi literaturowymi i właściwie przedyskutowuje, co świadczy o dobrej orientacji w badanej dziedzinie. Swoją wiedzę wykorzystała też przygotowując pracę przeglądową w bardzo dobrym czasopiśmie *Frontiers in Microbiology*, w której jest pierwszym autorem.

Autorka wykonała wiele badań w kierunku identyfikacji jednostek genetycznych wyspecjalizowanych w degradowaniu obcego DNA, pojawia się zatem pytanie, co wiadomo

o cyjanofagach jako nośnikach obcego DNA? Autorka poświęca jeden, mały akapit na temat fagów *Arthrospira*, ale czy wiadomo coś jeszcze o fagach sinic?

Rozdział **Podsumowanie i Wnioski Końcowe** streszcza osiągnięte cele naukowe w dziewięciu punktach. Jednak nie wszystkie konkluzje są adekwatne, w mojej ocenie. Przykładem tego jest stwierdzenie, że „zidentyfikowane metylotransferazy typu II są aktywne, co potwierdza wzmożoną aktywność systemów obrony przed egzogennym DNA...". Aktywność metylotransferazy DNA nie determinuje efektywności całego systemu R-M w ochronie gospodarza, a funkcjonalność endonukleaz restrykcyjnych nie była badana. Kolejny wniosek „część z właściwości biomasy *Arthrospira* może zostać utracona w procesie produkcyjnym" również nie został właściwie weryfikowany, gdyż w eksperymentach nie używano kontroli pozytywnej w postaci ekstraktu nie pochodzącego z komercyjnego preparatu. Sama Autorka wspomina o konieczności zastosowania takiej kontroli (str. 116). Podobnie ostatni punkt nie był weryfikowany eksperymentalnie w użyciem właściwych kontroli.

Jeśli chodzi o sposób przedstawienia rozprawy doktorskiej od strony formy językowej, oceniam, iż praca została napisana niestety tylko na ogół poprawnym językiem. Nie mogę niestety pochwalić stylu pisania. Nieścisłości językowe występują bardzo często, nawet w tytule rozprawy. Doszukałam się bardzo wielu uchybień edytorskich, przypadków użycia żargonu laboratoryjnego, a nawet kilka razy powtarzanego błędu ortograficznego. Autorka wielokrotnie, niefortunnie używa pojęć z jęz. angielskiego, dla których istnieją stosowne odpowiedniki w jęz. polskim, np. „zakontaminowanie hodowli" (str. 22) zamiast poprawnego „zanieczyszczenie hodowli"; „sekwencje spacer" (str. 32, 33) zamiast „sekwencje rozdzielające"; „działanie inhibitujące" (str. 38) zamiast działanie hamujące; „assembling" (str. 61) zamiast składanie sekwencji DNA. W kilkunastu miejscach (np. str. 14, 29, 79, 104) natknęłam się na powszechny niestety błąd w odmianie słowa „DNA", który występuje w jęz. polskim w rodzaju męskim, dlatego poprawnie piszemy „DNA genomowy", a nie „DNA genomowe", etc. W bardzo wielu miejscach autorka ma problem z użyciem adekwatnych określeń, jak np. z opisywaniem różnego poziomu ekspresji genów. Używa określeń: np. „delikatna nadekspresja" oraz „wyższa nadekspresja" (str. 103), nadeksprymowana oraz supresowana (str. 121), a przecież wyrażenia „supresja", czy „nadekspresja genu" mają zupełnie inny sens terminologiczny niż ten w opisywanym kontekście. Autorka używa niefortunnych wyrażeń: „efektowna metoda transformacji" (str. 117), „wiek hodowli" (str. 79), „amplifikacja.....białek związanych z systemami..." (str. 104).

Autorka również nie stosuje nomenklatury w zapisie nazw systemów R-M (Roberts et. al., NAR, 2003).

Pomimo moich wielu uwag krytycznych dotyczących różnych aspektów recenzowanej pracy chcę podkreślić, że jest ona wartościowa i wnosi pewien wkład w rozwój nauki. W mojej opinii najważniejszymi jej osiągnięciami są:

a) poznanie sekwencji 5 nowych genomów rodzaju *Arthrospira* izolowanych z różnych kontynentów
b) wstępna rewizja taksonomiczna badanych przedstawicieli rodzaju *Arthrospira* i wykazanie istnienia dwóch głównych kladów, które mogą reprezentować dwa gatunki *Arthrospira*
c) określenie rodzajów bakterii, w tym bakterii ekstremofilnych towarzyszących wzrostowi *Arthrospira*
d) określenie, że komercyjne preparaty Spirulina stanowią mieszaninę różnych rodzajów oraz, że zawierają zanieczyszczenie bakteriami przekraczające normy dla produktów leczniczych

Na podstawie przeprowadzonej analizy merytorycznej i formalnej oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Magdy Furmaniak pozytywnie. Stwierdzam, że stanowi ona oryginalne opracowanie oraz, że dostarczyła znaczących wyników poszerzających naszą wiedzę z zakresu genomiki i biologii cyjanobakterii rodzaju *Arthrospira*. Pragnę pochwalić Autorkę, że potrafiła połączyć umiejętności pracy w laboratorium mikrobiologicznym z warsztatem analiz bioinformatycznych. Biegle opanowała stosowanie wielu specjalistycznych programów statystycznych do analiz genomowych i transkryptomicznych. Potrafiła w sposób syntetyczny opracować swoje wyniki naukowe i przedyskutować je wobec aktualnych, najnowszych danych literaturowych z zakresu związanego z pracą doktorską.

Podsumowanie

Podsumowując, oświadczam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, zawarte w stosownej ustawie „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach w zakresie sztuki". Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie pani mgr Magdy Furmaniak do dalszych etapów postępowania przewidzianego w przewodzie doktorskim.

Dr hab. Iwona Mruk