

Oponentní posudek na disertaci Mgr. Aleksandry Kapuścik: Secondary metabolites from terrestrial cyanobacteria.

Předložená disertační práce představuje kompaktní a ucelený přehled o badatelské činnosti autorky v oblasti sekundárních metabolitů sinic, jejich izolace a charakterizace biologických aktivit zvláště s ohledem na jejich protizánětlivé účinky.

Jedná se o velmi zajímavou problematiku, která má silnou oporu v dlouhodobém zaměření pracoviště, kde byla práce vytvořena. Studium sinic představujících jedny z neúspěšnějších organismů na zemi, má rozměr nejen biologický, ale také ekologický. Vzhledem k tomu, že většina klinicky používaných léčiv jsou buď přímo přírodní látky anebo jejich deriváty, je snaha o izolaci a charakterizaci doposud neprostudovaných přírodních látek vysoce aktuální téma pro současnou humánní medicínu.

Po formální stránce je práce přehledná, kompaktní a dobře organizovaná. Disertace je vypracována v anglickém jazyce v rozsahu 101 stran a představuje soubor 2 prací publikovaných v impaktovaných časopisech a jedné práce doposud nepublikované. Anglický projev autorky je jasný, srozumitelný a práce je dobře čitelná. K jazykové stránce disertace nemám připomínky, kromě jediné. Doporučil bych nahradit slovo „developing“ za „development of“ v cílech projektu (strana 18 a 90), tak aby slovo bylo použito gramaticky správně a v souladu s dalšími body cílů projektu jako substantivum.

V první části disertace je hutný informativní úvod do problematiky, která představuje rámec pro disertační práci. Úvod je v souladu se zaměřením práce zvláště orientován na známé sekundární metabolity sinic, jejich metabolismus a publikované biologické vlastnosti. Je poměrně vyčerpávající, doplněný o chemické struktury a podložen s dostatečně rozsáhlým a aktuálním poznámkovým aparátem

Pokud bych měl být kritický, doporučil bych věnovat více úsilí diskuzi v závěru práce (VIII Conclusions). Práce by měla vyšší cenu, pokud by byla syntéza vypracována podrobněji, rozsáhleji a diskuze vedena s větším nadhledem a zároveň hlouběji. Disertace poskytuje dostatečný prostor pro zhodnocení významu jak publikovaných dat, které již prošly náročným recenzním procesem, ale také výsledků a zkušeností nepublikovaných. Nedocnitelná je zde právě příležitost zamyslet se nad výsledky a zkušenostmi z takto rozsáhlého projektu v celku.

Předkládaná práce zaujme mimo jiné rozsahem použitých moderních a poměrně náročných technik jako jsou preparativní metody pro izolaci přírodních látek, analytické metody využívající hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením, NMR a infračervenou spektrometrii, dále testování s vysokou propustností (HTS) pomocí technologie AlphaLISA™. Dále byly v práci využity metody konfokální mikroskopie, pokročilé time-lapse mikroskopie a ECIS impedanční technologie pro monitorování stavu tkáňových kultur.

V této souvislosti bych rád položil otázku týkající se navržené experimentální strategie pro identifikaci látek s protizánětlivým účinkem. Přestože je AlphaLISA vysoce specifickou a citlivou metodou, je poměrně nákladná. Nebylo by výhodnější použít jako primární screenovací metodu translokaci NFκB do jádra a v konfirmační fázi zvolit AlphaLISu? Kromě ekonomického hlediska zde může být i další motivace: inhibice translokace NFκB do jádra může být obecnějším důsledkem anti-

inflamatorních aktivit testovaných látek než je downregulace exprese IL-8 a ICAM-1. V konfirmačních experimentech by bylo možné zaměřit se na další proinflamatorní cytokiny jako jsou např. IL-6 a další. Uvažuje autorka v budoucnu rozšíření těchto studií na primární buňky od pacientů např. s onkologickými onemocněními, kde by nebylo nutné navodit expresi pomocí TNF α , ale bylo by možné se změřit přímo na inhibici exprese těchto cytokinů v nádorových tkáních?

Má další otázka míří k provádění cytotoxických analýz. Překvapila mne poměrně krátkodobá 24 hodinová expozice buněk vůči testovaným látkám. V takto krátké době mohou být zřetelně detekovány pouze velmi silné cytotoxické vlastnosti látek ve vysokých koncentracích. Dlouhodobější inkubace (48-72h) v nižších koncentracích mohou poskytnout jemnější informace o vlivu testovaných látek na proliferaci a metabolickou kapacitu buněk.

Výše uvedené námitky nijak nesnižují kvalitu předložené práce, která je na vysoké úrovni. Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem se domnívám, že práce splňuje požadavky kladené na disertaci a doporučuji, aby byla podkladem k udělení titulu Ph.D. podle platných právních předpisů.

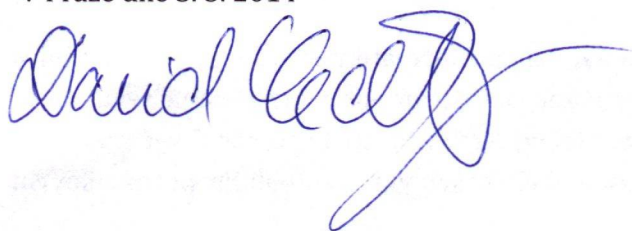
David Sedlák, Ph.D.

CZ-OPENSREEN: Národní infrastruktura pro chemickou biologii

Ústav molekulární genetiky

Akademie věd ČR

V Praze dne 3. 5. 2014



Opponent's review of Aleksandra Kapuścik PhD. thesis „Secondary metabolites from terrestrial cyanobacteria“

The work of Aleksandra Kapuścik is dealing with a very demanding topic which is searching for a novel biologically active molecules in a non-standard natural sources. I would like to stress also the particular inter-disciplinary importance of research of secondary metabolites of terrestrial cyanobacteria, which are used as a food or medicinal products in some traditional cultures. In the next paragraphs my review will be dedicated particularly to the isolation and identification of these metabolites, which corresponds to my professional experience and knowledge.

The presented work contains 101 pages. Introduction review encompasses overview of compounds produced by cyanobacteria. Page 18 contains aims of the work which are” developing of high throughput platform for screening of anti-inflammatory compounds, isolation and characterization of a new cyanobacterial compound and risk assessment of cyanobacterial toxicity.

Isolation and characterization of cyanobacterial secondary metabolites are described in the text as such (pages 19-24) as well as in published papers enclosed. Even mere mastering of isolation, analysis and identification of such complex metabolites alone require substantial deal of work, which is highly appreciated. It is clearly stated that some part of identification work was done in cooperation with the prominent experts in the field, which was from my point of view necessary. Both isolation and identification of structures are excellent and I did not managed to find any mistake or lack of support for the conclusions being done.

Regarding the formal perspective, the work is written transparently reflecting the enthusiasm of the author and it is well-accessible and comprehensible for the reader. Still I have some comments on details, some of them are just notes, for some of them I expect some answers in the course of defence.

1. Introduction of the work contains a list of cyanobacterial secondary metabolites and their activities. It is clearly stated (p. 10) that prominent metabolites are mentioned only. However, in such a case, the reader would expect references to the most important reviews. Such references are missing and even a brief search in the field indicated that some reviews are not covered (e.g., Nagarajan et al., J. Applied Toxicol. 2012).
2. Both the text and some manuscripts contain misprints, there are not so many, but I still believe that it would be possible to avoid them (e.g., JBS 18, p. 72, [M-H]⁺ two times).
3. I managed to find that the name of aeruginosin 865 corresponds to its molecular ion. How many aeruginosins were isolated until now (roughly) and is their nomenclature really random as seems to me?
4. It seems to me that some even crucial statements are very general and I feel some lack of support by literature references. Two examples Page 92: “The novel cyanobacterial. aeruginosin..is the first compound found in a terrestrial *Nostoc* strain”. I have not found a list of aeruginosins from aquatic *Nostoc* species, neither the list of other aeruginosins produced by other cyanobacteria making me possible to realise, if some of them could be also terrestrial. “The new aeruginosin possesses unique structural features not described within this group of peptides before, like the presence of uronic acid and fatty acid moiety”. I have no doubt that the isolation and characterization of aeruginosin 865 is excellent work, but references are missing for, e.g., other cyanobacterial metabolites containing both lipid and sugar moiety (and they exist), diversity of sugars or lipids present in such types of secondary metabolites, etc. Such explanation is not provided also in papers.

In spite of my minor comments, I consider the work by Aleksandra Kapuścik as very good and recommend it for the defence.

In České Budějovice, 14th April 2014



Alexandr Jegorov
Teva Czech Industries
Branišovská 31
České Budějovice



Oponentský posudek dizertační práce Aleksandry Kapusčík - "Secondary Metabolites of Terrestrial Cyanobacteria"

Předkládaná práce **Aleksandry Kapusčík** se zabývá výzkumem biologicky aktivních látek produkovaných sinicemi, se zaměřením na vývoj a aplikaci metod vhodných pro identifikaci a izolaci nových sinicových metabolitů ovlivňujících biomedicínsky významné biochemické, molekulární a buněčné procesy. Práce se specificky věnovala bioaktivním látkám izolovaným ze sbírkových kultur bentických sinic, s využitím preparativních metod, frakcionačních postupů a *in vitro* savčích modelů a pro identifikaci, izolaci a charakterizaci sloučenin pomocí postupů efektem-řízené analýzy.

Dizertační práce je zpracována na 101 stranách, členěna do 10 kapitol. První kapitolou je úvod do problematiky sekundárních metabolitů sinic, následovaná shrnutím cílů práce a kapitolou s přehledem metod použitých při řešení práce. Vlastním jádrem práce jsou pak získané výsledky prezentované a diskutované ve třech kapitolách tvořených dvěma publikovanými články resp. manuskriptem pro připravovanou publikaci, následované shrnutím a závěrem.

Předmětem studia v rámci dizertační práce byly především farmakologicky vysoce zajímavé protizánětlivé a imunomodulační účinky sinicových extraktů, kdy bylo využito nového přístupu, který kombinuje sledování vlivu sinicových metabolitů na TNF-alfa indukovanou produkci vybraných zánětlivých regulátorů v lidských endoteliálních buňkách HLMVECs pomocí metody AlphaLISA, a paralelní hodnocení viability a bariérové funkce endoteliálních buněk měřením buněčné impedance v reálném čase. V rámci řešení práce se podařilo nejen demonstrovat vysokou robustnost a efektivitu metody AlphaLISA a ukázat její použitelnost ve vysokokapacitním screeningu modulátorů zánětu, ale především pomocí takto optimalizovaného postupu získat zcela originální informace o schopnosti sinicových metabolitů nostopeptolidů A1/A3 potlačovat v netoxických koncentracích produkci IL-8 a ICAM-1 indukovanou působením TNF-alpha. Tyto výsledky byly úspěšně publikovány v mezinárodním recenzovaném časopise.

Pomocí zmíněného *in vitro* přístupu se následně podařilo identifikovat, izolovat a popsat chemickou strukturu nového sinicového metabolitu s protizánětlivými účinky, aeruginosinu 865, který byl izolován ze sinice *Nostoc* sp. V tomto případě se navíc podařilo prokázat, že protizánětlivé účinky aeruginosinu-865 jsou způsobenyablokováním translokace proteinového komplexu NF-kappaB do jádra. Výsledky byly opět publikovány v mezinárodním recenzovaném časopise.

V poslední části práce se autorka zabývala screeningem cytotoxických účinků u cca 120 methanolvých extraktů bentických sinic pomocí různých *in vitro* modelů, zahrnujících lidské a hlodavčí permanentní linie i primární buňky. Výsledky ukázaly, že zhruba 20% extraktů vykazuje silně cytotoxické účinky u lidských buněk. U čtyř z osmi extraktů vybraných k podrobnějšímu studiu pomocí frakcionace a efektem-řízené analýzy byly cytotoxické účinky spojeny konkrétní frakcí eluovanou z HPLC, což svědčí o existenci dosud nepopsaných sinicových cytotoxinů. Tyto výsledky jsou prezentovány ve formě manuskriptu připravovaného k publikaci.

Předložená dizertační práce přináší celou řadu nových originálních poznatků, které se týkají nejen vývoje a optimalizace nových přístupů použitelných pro identifikaci a charakterizaci bioaktivních molekul sinic, ale také úspěšné charakterizace nových typů účinků metabolitů sinic a identifikace nových metabolitů sinic. O kvalitě získaných výsledků svědčí



jejich publikace v mezinárodních recenzovaných odborných časopisech, kde prošly náročným oponentským řízením. K práci mám proto jen dílčí připomínky a dotazy do diskuze:

1) V úvodním přehledu sinicových sekundárních metabolitů by si dle mého názoru zasloužila své místo také skupina nostopeptolidů, neboť je těmto látkám věnována celá čtvrtá kapitola. V jakém vztahu (chemicky, biosynteticky, evolučně) jsou popisované nostopeptolidy A1 a A3 produkované sinicí *Nostoc* sp. ve vztahu k nostopeptolidům izolovaným ze *Solanum* sp., *Neurospora* sp. nebo *Acinetobacter*?

2) V textu je opakovaně a v různých variacích zmiňováno použití kolonek "C8 Oasis HLB". C8 je označení běžně používané reverzně fázové sorbenty na bázi oktyl-modifikovaného silikagelu, zatímco Oasis HLB je kopolymerní sorbent poly(divinylbenzen-N-vinylpyrrolidon). Mohla by autorka upřesnit, o jaký typ kolonek se jednalo (dva různé typy kolonek, kombinovaný směsný sorbent, kolonky nového typu)?

3) Byly získány velmi zajímavé a originální výsledky týkající se schopnosti nostopeptolidů a aeruginosinu 865 potlačovat indukci regulátorů zánětu v endoteliálních buňkách, způsobené zřejmě blokací translokace proteinového komplexu NFkappaB. Je možné na základě známých biochemických účinků a vlastností těchto sinicových metabolitů spekulovat o možném mechanismu pozorovaných imunomodulačních účinků, případně přímo o mechanismu inhibice translokace NFkappaB? Jaká možná mechanistická vysvětlení přicházejí do úvahy a jaký přístup by autorka navrhovala pro identifikaci signálních drah zodpovědných za pozorované efekty?

4) Na str. 67 je s odkazem na Cox et al. 2003 (PNAS 100, 13380-13383) uvedeno, že BMAA se akumuluje v mořských bezobratlých, ačkoli zmíněná studie popisuje akumulaci této sloučeniny v cykasovitých rostlinách a kaloních. Existují nějaké jiné studie popisující výskyt a akumulaci BMAA v mořských nebo sladkovodních bezobratlých, případně dalších organismech?

5) V kapitole VI se domnívám, že "liver injury" není nejvhodnější termín pro popis cytotoxických účinků pozorovaných *in vitro* na primárních lidských hepatocytech, doporučil bych jeho nahrazení např. spojením "in vitro hepatotoxicita". V úvodu v kapitole VI se autorka zmiňuje o limitacích současných používaných *in vitro* modelů pro hodnocení hepatotoxicity. Jaké další možnosti zvýšení *in vivo* / fyziologické relevance jaterních *in vitro* modelů autorka spatřuje, kromě použití izolovaných primárních hepatocytů, jejichž dostupnost je do značné míry omezená?

6) Výsledky získané v rámci kapitoly VI jsou diskutovány s ohledem na možná humánní rizika působení sinicových metabolitů. Jsou získané výsledky poukazující na existenci dosud neidentifikovaných cytotoxických metabolitů sinic zajímavé i z biomedicínského hlediska a proč? Pokud ano, je škoda, že tento aspekt není v kapitole VI, shrnutí a závěrech práce více akcentován.

Závěr

Z disertační práce je zřejmé, že autorka nejen úspěšně prakticky zvládla celou řadu metod používaných ve výzkumu bioaktivních látek (extrakce, frakcionace a purifikace látek, *in vitro*



metody pro hodnocení protizánětlivých účinků a cytotoxicity), ale prokázala také tvůrčí schopnosti při vývoji nových metod a přístupů pro studium přírodních bioaktivních látek a při plánování vědeckých experimentů. Zároveň prokázala schopnost zpracovat, diskutovat a interpretovat získané originální výsledky a úspěšně je prezentovat v odborných časopisech a na vědeckých konferencích.

Připomínky a dotazy oponenta nijak nesnižují kvalitu disertační práce, která splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru. **Proto ji doporučuji k obhajobě.**

V Brně dne 30. dubna 2014

Pavel Babica

RNDr. Pavel Babica, Ph.D.

RECETOX – Research Centre for Toxic
Compounds in the Environment

Faculty of Science, Masaryk University