

Aktywności biologiczne związków produkowanych przez mikroorganizmy występujące w zakwitach oraz hodowlach cyjanobakterii

Agnieszka Felczykowska

Cyjanobakterie stanowią grupę organizmów znanych z produkcji związków biologicznie aktywnych. Pierwsze doniesienia o metabolitach wtórnych izolowanych z tych organizmów, datowane na lata siedemdziesiąte ubiegłego wieku, pochodzą od zespołu Richarda E. Moore'a z Uniwersytetu na Hawajach, którego wyniki badań potwierdziły obecność izolowanych z sinic związków o aktywności antynowotworowej oraz antywirusowej. Kolejne badania, obejmujące zarówno określanie struktury, jak i biologicznej aktywności, pozwoliły na wyróżnienie kilkunastu klas tych związków, takich jak alkaloidy, poliketydy, peptydy, kwasy tłuszczowe, amidy czy laktany [1,2]. Metabolity te charakteryzują się aktywnością przeciwbakteryjną, przeciwwirusową, przeciwnowotworową, a także cytotoksyczną. Warto jednakże podkreślić, iż znaczna większość tych związków wyizolowana została z zaledwie kilku szczepów cyjanobakterii pochodzących z tropikalnych źródeł, podczas gdy znane z bioróżnorodności sinice Morza Bałtyckiego pozostają słabo zbadane pod kątem obecności związków biologicznie aktywnych [1,2].

Morze Bałtyckie charakteryzuje się unikalnymi warunkami ekologicznymi spowodowanymi ograniczoną wymianą wody z Wszechocyanem. Dodatkowo, połączenie z ponad 250 rzekami powoduje, że Morze Bałtyckie cechuje się stosunkowo niskim zasoleniem wynoszącym średnio 6-8‰ w porównaniu do zasolenia w oceanach (ok. 35‰). Tak nietypowe środowisko jest możliwe do zasiedlenia przez ograniczoną liczbę organizmów. Wpływa na to zbyt niskie zasolenie dla większości gatunków żyjących w Oceanie Atlantyckim oraz Morzu Północnym, będące jednocześnie zbyt wysokim dla organizmów słodkowodnych. Jednakże część cyjanobakterii zarówno morskich, jak i słodkowodnych, przystosowała się do życia w tak nietypowych warunkach środowiskowych. Warunkiem życia tych organizmów w Morzu Bałtyckim może być wzmożona produkcja niskocząsteczkowych związków, która stanowi element strategii adaptacyjnej sinic, pozwalającej na przetrwanie w szerokim zakresie warunków zarówno fizycznych, jak i chemicznych. Metabolity te mogą być również zaangażowane w interakcje ze współzyskującymi organizmami, od wirusów, poprzez bakterie do zwierząt morskich [2].

Przeważająca większość niskocząsteczkowych związków bioaktywnych produkowanych przez cyjanobakterie została wyizolowana, a następnie zidentyfikowana z zastosowaniem tradycyjnych technik opierających się na analizie ekstraktów komórkowych

sporządzonych z tych organizmów hodowanych w warunkach laboratoryjnych. Metoda ta była z sukcesem wykorzystywana do izolacji oraz identyfikacji związków o potencjalnym zastosowaniu jako bio-nawozy, herbicydy oraz insektycydy, a także potencjalnych leków immunosupresyjnych, przeciwdrobnoustrojowych czy przeciwnowotworowych [2,3]. Warto jednak podkreślić, że techniki opierające się na analizie ekstraktów komórkowych posiadają istotne ograniczenia. Znacząca część metabolitów wtórnych pochodzących z cyjanobakterii może być produkowana jedynie w ściśle określonych warunkach fizjologicznych, które są trudne lub wręcz niemożliwe do odtworzenia w laboratorium. Ponadto, wydajność ekstrakcji poszczególnych związków uzyskanych z próbek sinic hodowanych w warunkach laboratoryjnych może być niska, a przez to bardzo kosztowna oraz nieefektywna [3].

Obecnie powszechnie wiadomo, że w warunkach laboratoryjnych możliwe jest hodowanie 1-5% konsorcjów mikroorganizmów pochodzących z próbek środowiskowych [4]. Stanowi to istotne ograniczenie stosowania technik izolacji nowych związków bioaktywnych z nieznanymi dotąd organizmów opartych na hodowli w laboratorium. W ostatnich dwóch dekadach obserwuje się tendencję do zastępowania lub uzupełniania klasycznych metod badania bioróżnorodności populacji mikroorganizmów technikami niezależnymi od hodowli [4]. Jedną z najpopularniejszych metod pozwalających na kompleksowe badanie aktywności biologicznych organizmów występujących w próbach środowiskowych jest metagenomika. Łączy ona w sobie różne techniki biologii molekularnej, pozwalając na badanie bioróżnorodności populacji organizmów uchodzących za nie dające się hodować w warunkach laboratoryjnych oraz pozwala ocenić ich potencjał w zastosowaniu w biotechnologii czy farmakologii [4,5,6]. Metagenomika opiera się na analizie biblioteki metagenomowej. Przygotowanie biblioteki metagenomowej obejmuje następujące etapy: (i) kompleksowa izolacja eDNA (ang. *environmental Deoxynucleic Acid*) bezpośrednio z próby środowiskowej, (ii) klonowanie fragmentów sekwencji DNA do odpowiedniego wektora, dobranego w zależności od wielkości oraz rodzaju analizowanych fragmentów materiału genetycznego oraz użytego gospodarza bakteryjnego, (iii) wprowadzenie puli uzyskanych plazmidów (zwanymi biblioteką metagenomową) do wybranego gospodarza [4,5,6]. Biblioteki metagenomowe można poddawać analizie wykorzystując metody oparte na poszukiwanej funkcji lub sekwencji. Pierwsza z nich polega na przeszukiwaniu biblioteki metagenomowej w celu odnalezienia wybranej aktywności, takiej jak antybakteryjna czy enzymatyczna. Druga strategia wykorzystuje analizę sekwencji eDNA w celu odnalezienia określonych fragmentów materiału genetycznego [4].

Nadrzędny cel mojej pracy doktorskiej stanowiło pozyskanie informacji na temat aktywności biologicznych mikroorganizmów zawartych w hodowlach oraz zakwitach cyjanobakterii pochodzących z Morza Bałtyckiego. W prowadzonych doświadczeniach

połączyłam klasyczne metody analizy ekstraktów komórkowych uzyskanych z hodowli cyjanobakterii z nowoczesną metodą biologii molekularnej – metagenomiką, pozwalającą na badanie prób środowiskowych bez konieczności hodowli organizmów morskich w warunkach laboratoryjnych. Taki układ doświadczalny pozwolił na kompleksową analizę hodowli oraz zakwitów cyjanobakterii w kontekście ich potencjalnego wykorzystania w biotechnologii oraz medycynie.

Podjęty cel realizowałam, w pierwszej kolejności, w oparciu o analizę aktywności enzymatycznej oraz antybakteryjnej 27 szczepów cyjanobakterii izolowanych z Morza Bałtyckiego, należących do kolekcji szczepów CCNP (ang. *Culture Collection of Northern Poland*) znajdującej się na Wydziale Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego. Aktywność enzymatyczną oraz antybakteryjną badałam przy użyciu klasycznych metod bazujących na analizie ekstraktów wodnych oraz etanolowych sporządzonych z kultur cyjanobakterii hodowanych w warunkach laboratoryjnych [2].

Doświadczenie testujące aktywność enzymatyczną przeprowadziłam z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego testu API ZYM (bioMérieux) pozwalającego na jednoczesne badanie aktywności 19 enzymów, w tym enzymów katalizujących reakcję hydrolizy wiązań w białkach (trypsyna, α -chymotrypsyna, aryamidaza leucyny, aryamidaza waliny, aryamidaza cystyny), enzymów katalizujących reakcję hydrolizy wiązań estrowych (esteraza C4, esteraza C8, lipaza C14), enzymów hydrolizujących wiązania w węglowodanach (α -galaktozydaza, β -galaktozydaza, β -glukuronidaza, α -glukozydaza, β -glukozydaza, *N*-acetylo- β -glukozaminidaza, α -mannozydaza oraz α -fukozydaza), a także enzymów katalizujących reakcję defosforylacji (alkaliczna fosfataza, kwaśna fosfataza, naftylo-AS-BI-fosfohydrolaza) [2]. Badanie to wykazało, iż wodne ekstrakty komórkowe cyjanobakterii izolowanych z Morza Bałtyckiego stanowią bogate źródło enzymów. Spośród 19 testowanych aktywności enzymatycznych, fosfataza alkaliczna, fosfataza kwaśna, esteraza (C4 oraz C8), a także naftylo-AS-BI-fosfohydrolaza występowały najczęściej i zostały wykryte w 21-27 ekstraktach z cyjanobakterii [2]. Natomiast aktywności aryamidazy cystyny, lipazy C14, α -galaktozydazy, β -galaktozydazy oraz β -glukuronidazy zidentyfikowałam w stosunkowo niewielu szczepach (1-3). Znaczące różnice obserwowałam również w liczbie aktywności enzymatycznych w poszczególnych szczepach cyjanobakterii. Ekstrakty wodne pochodzące z *Microcystis aeruginosa* CCNP1102, *Synechocystis salina* CCNP1104, *Nodularia spumigena* CCNP1401 oraz CCNP1402, a także *Anabaena* sp. CCNP1406 okazały się najbogatsze w aktywności enzymatyczne (od 11 do 15 aktywnych enzymów), podczas gdy u *Spirulina subsalsa* CCNP1310, *Lyngbya* cf. *aestuarii* CCNP1314, CCNP1316, *N. spumigena* CCNP1403 oraz *Anabaena* sp. CCNP1416 wykryłam zaledwie od 2 do 4 aktywnych enzymów [2].

Jest to pierwsze tak rozbudowane doniesienie o aktywnościach enzymatycznych cyjanobakterii pochodzących z Morza Bałtyckiego. Do tej pory analizowano głównie pojedyncze enzymy lub ich inhibitory oraz aktywatory. Co ciekawe, podobne bogactwo aktywności enzymatycznych oraz różnice w ich występowaniu w obrębie jednego rodzaju sinic było obserwowane podczas badania fenotypowej oraz genotypowej zmienności szczepów *Microcystis*. Wskazuje to, że zarówno liczba, jak i rodzaje aktywności enzymatycznych są ściśle zależne i charakterystyczne dla danego szczepu cyjanobakterii [2].

Aktywność antybakteryjną ekstraktów zarówno wodnych, jak i etanolowych, przygotowanych z bałtyckich cyjanobakterii, badałam z zastosowaniem metody mikrorozcieńczeń. Analizowałam wpływ związków zawartych w ekstraktach względem bakterii Gram-dodatnich (*Micrococcus luteus* oraz *Staphylococcus aureus*) i Gram-ujemnych (*Serratia marcescens* oraz *Pseudomonas aeruginosa*). Wybrane szczepy bakterii hodowałam przez 16 godzin z dodatkiem ekstraktów w zakresie stężeń 0,01-1 mg mL⁻¹. Następnie mierzyłam gęstość optyczną hodowli i porównywałam ją do kontroli, którą stanowiła hodowla bakterii bez dodatku ekstraktu. Otrzymane przeze mnie wyniki wskazują, że związki zawarte zarówno w wodnych, jak i etanolowych ekstraktach z *Microcystis aeruginosa* silnie hamują wzrost wszystkich badanych bakterii: *Staphylococcus aureus* DMB-PR-1-20 (MIC₅₀ = 42 µg ml⁻¹), *Micrococcus luteus* DMB-pR1-1 (MIC₅₀ = 42 µg ml⁻¹), *Serratia marcescens* DMBpR-1-2 (MIC₅₀ = 74 µg ml⁻¹) oraz *Pseudomonas aeruginosa* DMB-PR-1-23 (MIC₅₀ = 168 µg ml⁻¹). Te same szczepy bakterii wykazały nieco mniejszą wrażliwość na ekstrakty otrzymane z *Anabaena* sp. CCNP1406 (MIC₅₀ = 250-300 µg ml⁻¹) oraz (z wyjątkiem *P. aeruginosa*) na związki produkowane przez *S. salina* CCNP1104 (MIC₅₀ = 250-300 µg ml⁻¹), a także *M. aeruginosa* CCNP1103 (MIC₅₀ = 165 µg ml⁻¹). Co ciekawe, ekstrakty sporządzone z 13 spośród 27 badanych szczepów cyjanobakterii morskich stymulowały wzrost przynajmniej jednej z badanych bakterii o co najmniej 50% w stosunku do kontroli, przy czym wodne i etanolowe ekstrakty uzyskane z *Cyanobacterium* sp. CCNP1105 oraz *Leptolyngbya* sp. CCNP1302 stymulowały wzrost wszystkich bakterii z wyjątkiem *P. aeruginosa*. Wynika z tego, że związki aktywne produkowane przez cyjanobakterie izolowane z Morza Bałtyckiego silnie modulują wzrost bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych [2].

Kolejnym etapem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej była analiza bałtyckich cyjanobakterii pod kątem ich potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej. Badania przeprowadziłam w układzie *in vitro* z wykorzystaniem modelowych linii komórek nowotworu piersi MCF-7. W pierwszej kolejności testowałam wpływ 22 ekstraktów wodnych oraz etanolowych uzyskanych z 11 szczepów bałtyckich cyjanobakterii na żywotność komórek linii komórkowej MCF-7 po 24-godzinnej oraz 48-godzinnej ekspozycji w zakresie

stężen 25-400 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Doświadczenie to wykazało, że trzy ekstrakty etanolowe, pochodzące z *Microcystis aeruginosa* CCNP1102, *Pseudanabaena* sp. CCNP1311 oraz *Pseudanabaena* cf. *galeata* CCNP1313 silnie hamują żywotność komórek nowotworowych raka piersi, z wartościami IC_{50} odpowiednio 100, 50 oraz 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Ekstrakty te zostały wybrane do dalszych badań mających na celu określenie molekularnego mechanizmu ich działania cytotoksycznego na komórki nowotworowe [1].

Aby określić, czy obniżenie żywotności komórek nowotworowych jest związane z procesem apoptozy, przeprowadzono analizę poziomu markera apoptozy – polimerazy PARP-1 (ang. *poly-ADP ribose polymerase*) z wykorzystaniem techniki Western blotting. Doświadczenie to pokazało, że wszystkie trzy ekstrakty indukowały zależne od kaspazy cięcie białka PARP-1, jednak jego zakres w stosunku do stosowanego stężenia był różny dla poszczególnych ekstraktów. Ekstrakt etanolowy CCNP1102 wywoływał wzrost poziomu przeciętej formy tego markera zależny od stężenia, który osiągnął poziom 4-krotnego wzrostu w stosunku do kontroli przy stężeniu 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ przy czym pozostał na tym poziomie przy zwiększonych dawkach ekstraktu. Ekstrakt sporządzony z CCNP1311 indukował cięcie białka PARP-1 w sposób zależny od użytej dawki, które wzrosło przy najwyższym stosowanym stężeniu 3,6-krotnie w stosunku do kontroli. W przypadku ekstraktu ze szczepu CCNP1313 obserwowałam najwyższy poziom przeciętej formy PARP-1, który był 6-8 krotnie wyższy niż w komórkach kontrolnych przy wszystkich testowanych stężeniach ekstraktu [1].

W celu uzyskania wglądu na zmiany w morfologii komórek MCF-7 po traktowaniu ekstraktami z cyjanobakterii, przeanalizowałam ultrastrukturę komórek przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej. W próbkach poddanych działaniu stężeniem równym 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ z ekstraktów z CCNP1102 albo CCNP1311 obserwowałam typowe dla komórek nekrotycznych pęcznienie cytoplazmy, kondensację chromatyny, pęcznienie organelli oraz brak ciągłości w obrębie błony cytoplazmatycznej. Z drugiej strony, komórki poddane działaniu ekstraktu z CCNP1313 nie wykazywały morfologii charakterystycznej dla nekrozy. Obserwowałam natomiast kurczenie się komórek oraz kondensację cytoplazmy, co może wskazywać na wczesne etapy apoptozy [1].

W celu ostatecznego stwierdzenia czy związki aktywne zawarte w ekstraktach otrzymanych z bałtyckich cyjanobakterii indukują śmierć komórek nowotworowych, przeprowadziłam analizę frakcji apoptotycznej oraz nekrotycznej komórek linii MCF-7 po ekspozycji na wybrane ekstrakty etanolowe w zakresie stężeń 25-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Wpływ ekstraktów CCNP1311 oraz CCNP1102 na indukcję apoptozy był umiarkowany i osiągnął poziom 15% przy komórkach poddanych działaniu ekstraktu w stężeniach 75-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Co ciekawe, oba ekstrakty wywoływały

wzrost frakcji nekrotycznej komórek nowotworowych do 80% przy najwyższym stosowanym stężeniu. Apoptozę obserwowałam głównie w komórkach traktowanych ekstraktem otrzymanym z *Pseudanabaena cf. galeata* CCNP1313, który osiągał poziom równy 60% komórek przy stężeniu równym $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ [1].

Aby określić, czy działanie cytotoksyczne związków bioaktywnych zawartych w ekstraktach z bałtyckich cyjanobakterii jest charakterystyczne dla linii komórek raka piersi MCF-7, czy też uniwersalne dla komórek nowotworowych, zbadalam wpływ ekstraktów etanolowych pochodzących z *Microcystis aeruginosa* CCNP1102, *Pseudanabaena sp.* CCNP1311 oraz *Pseudanabaena cf. galeata* CCNP1313 na żywotność komórek nowotworu szyjki macicy HeLa. Przeprowadziłam również analogiczne doświadczenie z wykorzystaniem modelowych ludzkich zdrowych komórek fibroblastów skórnych HDFa (ang. *Human Dermal Fibroblast adult*). Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że ekstrakty z bałtyckich cyjanobakterii hamują żywotność zarówno komórek linii nowotworu piersi MCF-7, jak i nowotworu szyjki macicy HeLa w sposób zależny od stężenia oraz czasu ekspozycji, przy nieistotnym statystycznie wpływie na zdrowe komórki linii HDFa. Warto podkreślić, iż wykonana analiza ekstraktów z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS wykazała obecność nieznanymi dotąd niskocząsteczkowych związków aktywnych odpowiedzialnych prawdopodobnie za indukcję śmierci w komórkach nowotworowych. Niezwykle istotny w kontekście potencjalnego wykorzystania tych związków w terapii przeciwnowotworowej jest wywoływany przez nie proces nekrozy. Do tej pory znakomita większość leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej była skierowana na indukcję procesu apoptozy, jednakże wraz z upływem czasu komórki nowotworowe nabywają oporność na terapię. Niezbędne wydaje się zatem poszukiwanie związków bioaktywnych indukujących nie-apoptotyczne rodzaje śmierci komórek. Dodatkowo, ostatnie doniesienia literaturowe wskazują, iż proces nekrozy w komórkach guza wywołuje odpowiedź immunologiczną organizmu, która może stanowić czynnik wspomagający terapię [1].

Ostatnim etapem realizacji niniejszej pracy doktorskiej była analiza aktywności antybakteryjnej oraz przeciwnowotworowej wybranych organizmów wchodzących w skład zakwitów oraz hodowli cyjanobakterii izolowanych z Morza Bałtyckiego z zastosowaniem metagenomiki [3]. Badania metagenomiczne stanowiły istotne uzupełnienie wcześniejszych doświadczeń opierających się na analizie ekstraktów komórkowych cyjanobakterii hodowanych w warunkach laboratoryjnych. W swoich badaniach wykorzystałam funkcjonalną analizę metagenomiczną. Główną zaletą tej metody jest pewność, że czynnik posiadający poszukiwaną aktywność ulega poprawnej biosyntezie, a przez to może być produkowany przez obcy organizm. Ten aspekt jest szczególnie istotny w kontekście doniesień literaturowych wskazujących, że ekspresja obcych genów w najczęściej

wykorzystywanym gospodarzu bakteryjnym w badaniach metagenomicznych – *Escherichia coli* – jest ograniczona do ok. 40% [5].

Na podstawie analizy uzyskanych wyników podczas badania aktywności biologicznych bałtyckich cyjanobakterii z zastosowaniem ekstraktów komórkowych zostały skonstruowane trzy biblioteki metagenomowe zawierające DNA izolowane kolejno z: (i) zakwitu *Nodularia spumigena* pobranego z Zatoki Gdańskiej w czerwcu 2009 r., (ii) zakwitu *Nodularia spumigena* i *Aphanizomenon flos-aquae* pobranego z Zatoki Gdańskiej w maju 2011 r. oraz (iii) hodowli pięciu szczepów cyjanobakterii izolowanych z Morza Bałtyckiego i zdeponowanych w kolekcji szczepów CCNP: *Microcystis aeruginosa* CCNP1101, *Microcystis aeruginosa* CCNP1102, *Microcystis aeruginosa* CCNP 1103, *Anabaena* sp. CCNP1406, *Synechocystis salina* CCNP1104 [5].

W celu dokonania analizy bibliotek metagenomowych niosących DNA izolowany z hodowli oraz zakwitów cyjanobakterii zaprojektowałam oraz przeprowadziłam doświadczenia pozwalające na przeszukiwanie biblioteki genowej pod kątem aktywności przeciwnowotworowej oraz przeciwbakteryjnej. Są to pierwsze badania wykorzystujące metagenomikę do analizy aktywności przeciwnowotworowej, a także pierwsze badania metagenomiczne skupiające się na aktywności przeciwbakteryjnej z zastosowaniem metody mikrorozcieńczeń. W doświadczeniu wykorzystałam około dwustu losowo wybranych klonów niosących fragment materiału genetycznego wielkości ok. 40000 par zasad z każdej skonstruowanej biblioteki [5].

Otrzymane wyniki uzyskane podczas przeszukiwania bibliotek pod kątem potencjalnej aktywności antybakteryjnej pozwoliły stwierdzić, że 1% [%v/v] stężenie ekstraktu uzyskanego z klonu 123 z biblioteki nr 2 (klon 123-2) wywołuje zahamowanie wzrostu bakterii *Serratia marcescens* oraz *Escherichia coli* BL21 odpowiednio o 45% i 40% [5].

Mimo, że w medycynie wykorzystywane są związki o aktywności przeciwbakteryjnej, podczas procesów biotechnologicznych pożądane są czynniki stymulujące wzrost i proliferację komórek bakteryjnych, w których odbywa się ekspresja rekombinowanych genów oraz biosynteza wybranych produktów białkowych [3]. Wcześniej przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że niektóre szczepy cyjanobakterii izolowanych z Morza Bałtyckiego stymulują wzrost bakterii Gram-ujemnych [2]. Zaprojektowałam zatem doświadczenie pozwalające stwierdzić, czy geny niesione na plazmidzie w poszczególnych klonach wpływają pozytywnie na wzrost gospodarza bakteryjnego – *Escherichia coli*. Jako kontrolę wykorzystałam klon 105-2, zawierający fragment genomu *E. coli*. Co ciekawe, zaobserwowałam, że w obecności klonów 123-3 oraz 129-3 czas generacji *E. coli* w fazie wzrostu logarytmicznego wynosił 29 min., podczas gdy dla kontroli aż 36 min. Doświadczenie to potwierdza, że ekspresja niektórych genów izolowanych z cyjanobakterii

stymuluje wzrost komórek *E. coli*, co może zostać potencjalnie zastosowane do konstrukcji nowych szczepów tej bakterii w celu wykorzystania jej w procesach biotechnologicznych [3].

Kolejnym etapem analizy metagenomicznej było przeszukiwanie bibliotek genowych pod kątem aktywności przeciwnowotworowej. W tym celu badałam wpływ 370 klonów z poszczególnych bibliotek na przeżywalność komórek nowotworu piersi MCF-7. Wyniki przeprowadzonego eksperymentu wykazały, że klon 123-3 w znaczący sposób hamuje przeżywalność komórek nowotworu piersi, przy niewielkim wpływie na zdrowe komórki ludzkich fibroblastów HDFa [3].

Wybrane klony z badanych bibliotek wykazujące obecność pożądaných aktywności biologicznych zostały wysłane do sekwencjonowania z zastosowaniem technik NGS (ang. *Next Generation Sequencing*). Wyniki sekwencjonowania zostały poddane analizie z wykorzystaniem programu *Blast*, a geny potencjalnie odpowiedzialne za występowanie badanych aktywności biologicznych zostały wyszczególnione i opisane [3].

W ramach niniejszej pracy doktorskiej, skoncentrowanej na analizie aktywności biologicznych mikroorganizmów zawartych w hodowlach oraz zakwitach cyjanobakterii izolowanych z Morza Bałtyckiego, wykazano obecność związków produkowanych przez te organizmy o aktywności przeciwnowotworowej, enzymatycznej oraz modulującej wzrost bakterii zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych [1,2,3]. Wskazano potencjalne związki niskocząsteczkowe, jak również geny potencjalnie odpowiedzialne za występowanie danej aktywności biologicznej [1,2,3]. Praca ta pozwoliła na poszerzenie wiedzy o bioróżnorodności cyjanobakterii zasiedlających Morze Bałtyckie, a także udowodniła skuteczność łączenia tradycyjnych technik badania aktywności biologicznych opartych na analizie ekstraktów komórkowych z nowoczesnym narzędziem biologii molekularnej, jakim jest metagenomika.

Literatura

[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”. *Toxicol* 108(2015):1-10

[2] Mazur-Marzec H, Błaszczuk 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 (2014) 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):105

[4] **Felczykowska A**, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Barańska S (2012) Metagenomic approach in the investigation of new bioactive compounds in the marine environment. *Acta Biochimica Polonica* 59(4): 501-505

[5] **Felczykowska A**, Krajewska A, Zielińska S, Łoś J, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B (2015) The most widespread problems in the function-based microbial metagenomics. *Acta Biochimica Polonica* 62(1):161-170

[6] **Felczykowska A**, Krajewska A, Zielińska S, Łoś J (2015) Sampling, metadata and DNA extraction - important steps in metagenomic studies. *Acta Biochimica Polonica* 62(1):151-160