

Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk  
w Łodzi

93-232 Łódź  
ul. Lodowa 106

tel.: 042 2723610  
fax.: 042 2723630

e-mail: [abrzostek@cbm.pan.pl](mailto:abrzostek@cbm.pan.pl)  
[www.cbm.pan.pl](http://www.cbm.pan.pl)

17. 12. 2024 r.

Dr hab. Anna Brzostek  
Pracownia Genetyki i Fizjologii Mycobacterium  
Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź

Ocena pracy doktorskiej mgr Mateusza Noszki pt. „Charakterystyka regulonów CemR wybranych chorobotwórczych gatunków *Campylobacteria*”.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod kierunkiem dr hab. Anny Pawlik. Zespół kierowany przez Panią dr hab. A. Pawlik jest autorytetem w dziedzinie prac badawczych dotyczących podstawowych procesów komórkowych tj. replikacja chromosomów czy cykl komórkowy bakterii, jak i mechanizmy umożliwiające bakteriom adaptację w środowisku. Prowadzone przez zespół badania dotyczą zarówno promieniowców, jak i bakterii chorobotwórczych rzędu Campylobacterales, którego przedstawicielami są *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Arcobacter butzleri*.

Pracę doktorską Pana mgr Mateusza Noszki stanowi zbiór dwóch prac eksperymentalnych, spójnych tematycznie, opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych o sumarycznym współczynniku cytowalności IF 19.7, oraz rozdziału uzupełniającego badania opublikowane w pracy Noszka et al. „CemR atypical response regulator impacts energy conversion in *Campylobacteria*”, *mSystems*, 9, 8, 2024. W obu pracach eksperymentalnych Doktorant jest pierwszym autorem, a załączone oświadczenia współautorów nie pozostawiają żadnych wątpliwości co do Jego kluczowej roli w realizacji opisywanych badań.

Przedmiotem zainteresowania Doktoranta są białka regulatorowe HP1021, Cj1608 i Abu0127 zidentyfikowane odpowiednio u *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* i *Arcobacter*



*butzleri*. Wspomniane gatunki to mikroaerofilne, chorobotwórcze bakterie przewodu pokarmowego człowieka będące czynnikiem etiologicznym rozwoju choroby wrzodowej i nowotworów żołądka, a także wywołujące biegunki czy nawet bakteremie. Z uwagi na warunki bytowania, bakterie te zarówno w trakcie infekcji, jak i ich transmisji narażone są na szereg czynników szkodliwych takich jak: pH, temperatura, dostęp do tlenu czy produkcja reaktywnych for tlenu. Z tego też względu konieczne jest przystosowanie się bakterii do zmieniających się warunków środowiskowych poprzez zmianę ich metabolizmu i oddychania z udziałem określonych białek regulatorowych. Z uwagi na fakt, że ludzki żołądek jest unikalnym siedliskiem dla *H. pylori*, które zapewnia jednocześnie stosunkowo stabilną niszę pozbawioną konkurencji ze strony innych mikroorganizmów, drobnoustrój ten ma niezwykle mały repertuar regulatorów transkrypcji. Cały genom *H. pylori* koduje jedynie 17 czynników transkrypcyjnych, które pozwalają utrzymać homeostazę komórki i odpowiadają na sygnały ze środowiska takie jak niskie pH, dostęp do składników odżywczych, tlenu i metali, czy odpowiedź na komórki układu immunologicznego gospodarza. Należy podkreślić, że *H. pylori* należy do organizmów o najmniejszej liczbie systemów dwuskładnikowych, których genomy zostały do tej pory zsekwencjonowane. W genomie tej bakterii zidentyfikowano tylko trzy kinazy histydynowe i pięć regulatorów odpowiedzi zaangażowanych w regulację transkrypcji. Jednak dwuskładnikowe systemy *H. pylori* okazały się odgrywać ważną rolę zarówno we wzroście organizmu *in vitro*, jak i jego zdolności do kolonizacji.

**W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej Pan mgr M. Noszka podjął się identyfikacji i charakterystyki dotąd mało poznanych, białek regulatorowych HP1021, Cj1608 i Abu0127, należących do grupy atypowych, sierocych regulatorów odpowiedzi, wykorzystując szereg technik omicznych takich jak: RNAseq, CHIPseq i LC-MS/MS.**

W pierwszej publikacji Doktoranta, włączonej do pracy doktorskiej (Mateusz Noszka , Agnieszka Strzałka , Jakub Muraszko , Rafał Kolenda, Chen Meng , Christina Ludwig, Kerstin Stingl & Anna Zawilak-Pawlik. Profiling of the *Helicobacter pylori* redox switch HP1021 regulon using a multi-omics approach. 2023, Nature Communications, 14:6715), autorzy skupiają się na obszernych badaniach białka HP1021 jako „przełącznika” redox, Badania te



obejmują analizy transkryptomyczne, proteomiczne, oraz interakcji DNA-białko. Autorzy w tej pracy szczególną uwagę skupiają na bardzo słabo dotąd poznanym zagadnieniu odpowiedzi *H. pylori* na stres oksydacyjny udowadniając udział białka regulatorowego HP1021 w szlaku typowej odpowiedzi na czynniki ROS oraz w metabolizmie węglowodanów i pobieraniu obcego DNA. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem ChIP-seq pozwoliły na identyfikację 100 miejsc wiązania się HP1021 w genomie *H. pylori*, głównie w rejonie sekwencji promotorowych wpływając tym samym na transkrypcję genów. Analizy transkryptomiczne szczepu dzikiego *H. pylori* N6 oraz jego mutantu  $\Delta$ HP1021 w warunkach wzrostu mikroaerofilnego lub w warunkach stresu tlenowego pozwoliły na wykazanie, że aż 30% genów uległo zmienionej ekspresji w warunkach stresu tlenowego w szczepie dzikim a jedynie dla czterech zaobserwowano zmianę ekspresji w mutancie  $\Delta$ HP1021. Ogółem regulon HP1021 ma wpływ na ekspresję 497 genów, z czego aż 407 związanych jest ze stresem oksydacyjnym. Bardzo interesującym spostrzeżeniem jest zidentyfikowanie 48 miejsc wiązania się białka HP1021 w obrębie genów lub operonów transkrybowanych odmiennie w genomie mutantu  $\Delta$ HP1021, co wskazuje na ich bezpośrednią regulację przez badane białko. Tak duża liczba genów ulegających zmienionej ekspresji świadczy o zaangażowaniu tego białka w regulację wielu szlaków i procesów zachodzących w komórkach *H. pylori*, takich jak: stres oksydacyjny, metabolizm energetyczny, translacja, biogeneza ściany komórkowej, metabolizm lipidów i inne. Z tego względu Autorzy publikacji wybrali do szczegółowej analizy geny o zmienionej ekspresji w odpowiedzi na stres oksydacyjny, związane z metabolizmem glukozy i pobieraniem DNA, które są regulowane przez HP1021. W odpowiedzi na stres oksydacyjny zauważono, że dwa geny *kata* i *rocF* są bezpośrednio regulowane przez HP1021, a w mutancie  $\Delta$ HP1021 poziom arginazy RocF wzrasta 20-krotnie, sugerując jego kompensatorową rolę w przypadku braku HP1021. W tym miejscu chciałabym zapytać Doktoranta: **Czy znane są białka partnerskie dla RocF, dla których wykazano oddziaływanie, co sugerowałoby mechanizm RocF- zależnej odpowiedzi na stres oksydacyjny w komórkach *H. pylori*? Zaskakującym spostrzeżeniem jest fakt zmienionego poziomu tak niewielu białek w warunkach stresu oksydacyjnego zarówno w szczepie dzikim, jak i mutancie  $\Delta$ HP1021, w porównaniu do**



zmienionej ekspresji tak wielu genów, co autorzy tłumaczą min. potranslacyjnymi modyfikacjami białek. Czy nie byłoby interesującym odwrócenie badań a mianowicie analiza proteasomu i poszukiwanie czynników regulujących procesy degradacji lub modyfikacji białek w warunkach standardowego wzrostu i w warunkach stresu oksydacyjnego dla badanych szczepów?

Bardzo ciekawą hipotezę postawili Autorzy odnośnie pobierania obcego DNA przez komórki *H. pylori*, jako „wygaszacza” ataku na skutek reaktywnych form tlenu lub jego wykorzystania jako źródła energii czy bloków budulcowych (rybonukleotydy). **Czy ta hipoteza będzie dalej weryfikowana, a jeśli tak to proszę przybliżyć jej założenia?**

Kolejnym zagadnieniem, któremu Autorzy przyjrzeni się bliżej w tej publikacji dotyczył pobierania glukozy i homeostazy energetycznej. W tym miejscu, pragnę podkreślić, że Doktorant wraz ze współautorami, **po raz pierwszy wykazali, że GluP jest jedynym transporterem glukozy dla komórek *H. pylori***, co udowodniono poprzez konstrukcję mutantu pozbawionego funkcjonalnego białka i analizy fenotypowe szczepów. Jednocześnie udowodniono, że HP1021 kontroluje pobieranie glukozy poprzez regulację transkrypcji GluP. **Moim zdaniem Autorzy bardzo trafnie konkludują przeprowadzone badania, zwracając uwagę, że zwiększona synteza RNA u tego gatunku może być związana z pochłanianiem DNA, aby chronić komórki *H. pylori* przed szkodliwym działaniem ROS. Jednocześnie zintensyfikowana synteza RNA wymaga elementów budulcowych i energii, pochodzącej ze zwiększonego poziomu glukozy i przekierowania metabolizmu w kierunku szlaku pentozo-fosforanowego przez HP1021.**

W drugiej publikacji Doktoranta (M. Noszka, A. Strzałka, J. Muraszko, D. Hofreuter, M. Abele, Ch. Ludwig, K. Stingl, A. Zawilak-Pawlik, CemR atypical response regulator impacts energy conversion in *Campylobacter*, *mSystems*, 9. 8, 2024, Autorzy skupili się na dwóch słabo scharakteryzowanych białkach regulatorowych Cj1608 i Abu0127, odpowiednio z *C. jejuni* NCTC 11168 i *A. butzleri* RM4018. Aby poznać funkcję tych białek, skonstruowano mutanty pozbawione funkcjonalnych regulatorów i poddano je, podobnie jak w pierwszej publikacji, analizom transkryptomycznym i proteomicznym w optymalnych warunkach wzrostu i stresu



oksydacyjnego. Zgromadzone wyniki wskazują, że badane białka Cj1608 i Abu0127, nazwane regulatorami energii i metabolizmu (CemRs), wspomagają oszczędzanie energii w komórkach bakteryjnych, w odpowiedzi na dostępność tlenu, poprzez kontrolowanie szeregu szlaków metabolicznych i oddechowych. Z przeprowadzonych analiz transkryptomu i proteomu szczepu kontrolnego *C. jejuni* NCTC 11168 i mutantu delecyjnego  $\Delta$ Cj1608, hodowanych w warunkach mikroaerofilnych oraz w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego parakwatem, zaobserwowano podobnie jak dla *H. pylori*, zmianę w ekspresji bardzo dużej liczby genów. Zauważono, że Cj1608 wpływa na transkrypcję aż 585 genów oraz zmienia poziom ekspresji 156 białek w *C. jejuni* NCTC 11168, z czego najwięcej związanych jest z cyklem kwasów trójkarboksylowych (TCA) i metabolizmem azotu.

Podobnie jak w przypadku *C. jejuni*, aby wyjaśnić rolę białka Abu0127, pochodzącego ze szczepu *A. butzleri*, w kontrolowaniu ekspresji genów i odpowiedzi na stres oksydacyjny przeprowadzono analizy transkryptów (RNA-seq), a także białek (LC-MS/MS) szczepu dzikiego *A. butzleri* RM4018 i mutantu delecyjnego  $\Delta$ Abu0127 w warunkach środowiska naturalnego i stresu oksydacyjnego. Przeprowadzone analizy transkryptomocne i proteomiczne wykazały, że Abu0127 wpływa na transkrypcję aż 904 genów i poziom ekspresji 124 białek w szczepie *A. butzleri* RM4018, przy czym największe zmiany zauważono dla grupy genów związanych z fosforylacją oksydacyjną. Otrzymane wyniki badań jednoznacznie pokazują, że Abu0127 reguluje szlaki energetyczne poprzez bezpośrednią kontrolę ekspresji genów w odpowiedzi na warunki tlenowe, co zostało przedstawione na przykładzie *nuoB*. Badania te pozostają w zgodzie z analizami przeprowadzonymi dla białka Cj1608.

Bardzo ciekawym spostrzeżeniem Autorów jest fakt, że w szczepach pozbawionych funkcjonalnych CemR, została utracona kontrola transkrypcji nad genami, których ekspresja była zależna od poziomu tlenu (np. *gltA* u *C. jejuni*, operon *nuoA-N* u *A. butzleri*, czy oksydoreduktaza pirogronian: ferredoksyna u *H. pylori*). Trzecia część pracy doktorskiej napisana została w formie manuskryptu i jest kontynuacją badań opublikowanych przez Autorów w mSystems. W tej części doktoratu mgr M. Noszka opisuje miejsca wiązania się



białek Cj1608 i Abu0127 na chromosomie odpowiednio *C. jejuni* i *A. butzleri* poprzez analizy ChIP – seq. Zastosowanie dwóch różnych algorytmów bioinformatycznych (MACS3 i edgeR) pozwoliło Doktorantowi zidentyfikować 60 wspólnych miejsc wiązania się na genomie dla CjCemR, które w większości zlokalizowane były w pobliżu miejsc rozpoczęcia się transkrypcji dla genów związanych z produkcją i oszczędzaniem energii (permeaza L-laktanu, *lctP*; dehydrogenaza izocytryninowa, *idc*; oraz genów tRNA. Otrzymane wyniki CHIP-seq wskazują że CjCemR odgrywa kluczową rolę w regulacji metabolizmu i produkcji energii. Podobne badania przeprowadził Doktorant dla białka AbuCemR wskazując miejsca wiązania się badanego białka w genomie *A. butzleri*. Wykorzystane przez mgr M. Noszka narzędzia informatyczne MACS i edgeR pozwoliły na identyfikację 410 i 8 miejsc wiązania odpowiednio, z czego 6 było potwierdzone w obu przypadkach, w tym dla *icd* i syntetazy ATP.

**W tym miejscu chciałabym zapytać jaka jest przyczyna tak dużej różnicy w identyfikacji miejsc wiązania się badanych białek przy wykorzystaniu narzędzi MACS i edgeR? Czy wyłącznie wynika to z jakości przeciwciał wykorzystywanych do badań?**

Tematyka badań podjętych przez Doktoranta jest złożona i pomimo uzyskania ogromu danych omicznych w obecnej chwili nie jest możliwe zaproponowanie mechanizmu kontrolującego aktywność nietypowych regulatorów odpowiedzi, CemR. Poznanie takiego mechanizmu będzie z pewnością dla Doktoranta nowym wyzwaniem na kolejne lata pracy. Na podstawie przeprowadzonych dotąd badań można stwierdzić, że CemR jest globalnym regulatorem odpowiedzi komórki na zaburzenia równowagi metabolicznej redoks spowodowane warunkami środowiskowymi, takimi jak: dostęp tlenu, czy obecność reaktywnych form tlenu.

Publikacje stanowiące podstawę recenzowanej pracy doktorskiej zostały poprzedzone streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz krótkim wprowadzeniem w języku angielskim opisującym cel pracy i najważniejsze osiągnięcia prezentowanych prac eksperymentalnych wraz z odpowiednio zacytowaną literaturą naukową. Rozdział 4. Rozprawy

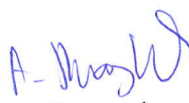


doktorskiej stanowią wnioski, które trafnie w punktach podsumowują najważniejsze osiągnięcia Doktoranta z dotychczas przeprowadzonych badań.

Na zakończenie chciałabym podkreślić bardzo duże doświadczenie naukowe, wiedzę i wielką dojrzałość Pana mgr M. Noszki, czego dowodem są publikacje naukowe o łącznym IF 59,16 i liczbie punktów MNiSW 880, opublikowane w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym tj. Nature Communication, Nucleic Acid Research, Molecular Microbiology. Pan mgr M. Noszka brał także czynny udział w prezentowaniu własnych wyników badań na wielu konferencjach krajowych i zagranicznych. Ma także na swoim koncie wyróżnienia i nagrody, oraz zdobyte doświadczenie zawodowe na krótkich i dłuższych stażach naukowych w Niemczech, Anglii i Hiszpani. Co jest warte podkreślenia, Doktorant pomimo młodego wieku ma już doświadczenie w zdobywaniu funduszy na badania własne i jest kierownikiem grantu Preludium 21 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Pan mgr M. Noszka ma także na swoim koncie kierowanie grantem unijnym ufundowanym przez European Proteomics Infrastructure Consortium EPIC-XS (0000446). Uważam, że Pan mgr M. Noszka jest wybitnym, młodym naukowcem, któremu należy życzyć dalszych sukcesów i wielu odkryć naukowych.

**Podsumowanie:**

Po szczegółowym zapoznaniu się z pracą doktorską Pana mgr Mateusza Noszki uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki i spełnia warunki określone w art. 187 ust.1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz. U.2023 poz.742 z późn. zm. Wnoszę do Rady Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr. Mateusza Noszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wybitne osiągnięcia naukowe Pana mgr M. Noszki i uzyskanie niezwykle ważnych wyników oraz jakość naukową ocenianej pracy proszę Szanowną Radę o nagrodzenie pracy doktorskiej Pana mgr Mateusza Noszki przewidzianą w regulaminie nagrodą.

  
Anna Brzostek