

Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
email: Agnieszka.Szalewska-Palasz@ug.edu.pl
tel: (+48) 58 523 6026

Gdańsk, 22.12.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pana magistra Mateusza Noszki
„Characterization of CemR regulons of selected pathogenic *Campylobacter* species”

Ostatnie dziesięciolecia badań mikrobiologicznych wykazały, iż stosowane wcześniej podstawowe model badawcze, takie jak *Escherichia coli* czy *Bacillus subtilis* nie wyjaśniają wszystkich scenariuszy na poziomie molekularnym u innych bakterii. Odejście od początkowo uważanych za uniwersalne modele badawcze spowodowało skierowanie badań w stronę mniej typowych grup bakterii i ich przedstawicieli. Szczególnie interesujące i ważne jest to, jeśli wśród tych bakterii są mikroorganizmy patogenne, których szczegółowe poznanie na poziomie molekularnych mechanizmów i przystosowań do środowiska jest kluczowe dla późniejszego opracowania skutecznej terapii i profilaktyki. Dlatego bardzo cenne są prace mające na celu scharakteryzowanie nieznanych do tej pory regulatorów odpowiedzi na wyzwania i stropy środowiskowe. Takimi mikroorganizmami, które nie tylko stanowią nowe modele badawcze ale także stwarzają realne zagrożenia dla zdrowia ludzi, są *Helicobacter pylori* czy *Campylobacter jejuni*, oraz mniej poznany, a jednocześnie coraz bardziej rozpowszechniony *Arcobacter butzleri*. Bakterie te należą do klasy *Campylobacteria* (dawna *Epsilonproteobacteria*), grupy mikroorganizmów o wciąż wielu niepoznanych mechanizmach na poziomie molekularnym. Dlatego wybór modelu i tematu badawczego niniejszej rozprawy

doktorskiej jest zdecydowanie uzasadniony i wpisuje się w zakres aktualnych badań w biologii molekularnej, zarówno w zakresie badań podstawowych jak i przyszłych możliwości aplikacyjnych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Mateusza Noszki została wykonana w Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk. Promotorem rozprawy jest Pani Profesor Anna Pawlik, której zespół od lat zajmuje się zagadnieniami podstawowych procesów komórkowych w organizmach prokariotycznych jak również mechanizmami adaptacji bakterii do środowiska. Korzystając z szerokiej wiedzy i doświadczenia Pani Promotor, jak również dostępu do zaawansowanych metodologii biologii molekularnej, Doktorant przygotował bardzo dobrą rozprawę o wysokim poziomie naukowym.

Rozprawa doktorska Pana mgr Mateusza Noszki ma postać hybrydową, składając się z dwóch publikacji oraz opisu dodatkowych doświadczeń uzupełniających te przedstawione w opublikowanych pracach. Rozprawę uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim, krótkie sprecyzowanie celu i planu badań oraz konkluzje. Na końcu rozprawy zamieszczono spis osiągnięć naukowych Doktoranta. Taka forma praca jest zgodna z ustawowymi wymogami (art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn.zm.). Zgodnie z ustawą, rozprawa doktorska może stanowić wyodrębnioną część prac zbiorowych pod warunkiem wykazania wkładu kandydata w powstanie tych prac. Wkład ten dotyczyć powinien zarówno części planowania i koncepcji pracy, jak i jej wykonania, interpretacji i przedstawienia wyników i dyskusji. Ocena udziału Doktoranta opiera się na oświadczeniach zarówno samego kandydata, jak i współautorów pracy zbiorowych. W rozprawie zawarte są szczegółowo opisane oświadczenia, ponadto w obydwóch publikacjach składających się na rozprawę znajduje się akapit *Authors contributions*. Pan Noszka jest także pierwszym autorem w obu pracach. Wszystkie te dane bez wątpienia podkreślają kluczową rolę Doktoranta w powstawaniu tych prac. Udział ten obejmował stawianie hipotez, dobór i optymalizację metod, wykonanie większości doświadczeń, analizę i interpretację wyników, opracowanie statystyczne i graficzne, udział w przygotowaniu manuskryptów publikacji. Podkreślić należy rolę Doktoranta w pozyskiwaniu funduszy na badania – był on kierownikiem projektu Preludium NCN oraz w części proteomicznej projektu w ramach konsorcjum (European Proteomics Infrastructure Consortium EPIC-XS) finansowanego z programu Horizon 2020 EU. Jest to bardzo ważny element współczesnej pracy naukowej i wskazuje na odpowiednią drogę rozwoju, jaką obrał Kandydat. Tak więc, przedstawiona do oceny dokumentacja pozwala na stwierdzenie, że rozprawa spełnia kryteria

formalne stawiane pracom doktorskim prezentowanym jako wyodrębnioną część prac wieloautorskich. Zaznaczyć należy, iż prace wchodzące w skład rozprawy zostały opublikowane w znaczących czasopismach o wysokiej renomie oraz bardzo krytycznym procesie recenzenckim. Są to: prestiżowe Nature Communication, prezentujące przełomowe prace w dziedzinach biologicznych i mSystems, czasopismo wydawane przez American Society for Microbiology, które publikuje prace z zakresu badań wysokoprzepustowych w dziedzinie mikrobiologii. Sam fakt opublikowania wyników w tak liczących się czasopismach świadczy o wysokiej randze prac, jak również o ich szerokim zasięgu w środowisku naukowym.

Celem pracy doktorskiej Pana Noszki było scharakteryzowanie regulonów kontrolowanych przez białka regulatorowe o nieznanych (lub niedostatecznie poznanych) do tej pory funkcjach. Były to białka pochodzące z trzech patogennych przedstawicieli klasy *Campylobacteria*: *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* i *Arcobacter butzleri*. Bakterie te różni zarówno typowe środowisko życia, jak i napotykanne w tym środowisku stresy. I tak, *H. pylori* bytuje tylko w żołądku człowieka, zaś *C. jejuni* może być patogenem zarówno człowieka jak i zwierząt, a *A. butzleri* zasiedla bardziej zróżnicowane nisze, będąc jednocześnie coraz częściej izolowanym patogenem dróg pokarmowych. Cel ten jak i plan pracy opierał się na wcześniejszych wynikach zespołu prof. Pawlik dotyczących białka HP1021, którego rolę opisano jako regulatora odpowiadającego na stan redox komórki. Podobne do HP1021 białka u *C. jejuni* (Cj1608) i *A. butzleri* (Abu0127) nie zostały dotychczas scharakteryzowane, zaś poznanie genów będących pod ich kontrolą jest bardzo ważne dla zrozumienia przystosowania się tych bakterii do zmian środowiska w zakresie dostępności tlenu podczas kolonizacji dostępnych środowisk.

Pierwsza z prac (**Nat. Comm 2023**) przedstawia wyniki badań nad regulonem białka HP1021 u *H. pylori*. W pracy wykorzystano skonstruowany uprzednio przez zespół prof. Pawlik (z udziałem Pana mgr Noszki) szczep pozbawiony tego białka. Zastosowanie metody ChiP-seq pozwoliło na określenie miejsc wiązania HP1021 do chromosomu w warunkach wzrostu aerobowych i mikroaerobowych, i co ciekawe, nie zaobserwowano znaczących różnic, co świadczy o stałych miejscach wiązania niezależnie od stresu tlenowego. Liczba miejsc wiązania HP1021 świadczy o szerokim zakresie oddziaływań na ekspresję genów *H. pylori*. Ważną rolę tego białka w regulacji transkrypcji potwierdziły badania RNA-seq, wykazując znaczącą liczbę genów w regulonie HP1021 – 407 genów regulowanych podczas stresu oksydacyjnego oraz 87 o nieznanych warunkach indukcji. Co ciekawe, te zmiany nie przekładają się na obserwacje translatomu tej bakterii. Wśród genów regulowanych przez HP1021 znajdują się zaangażowane w odpowiedź na stres oksydacyjny, ale co ciekawe, także

cały szereg genów związanych z procesami energetycznymi i metabolicznymi jak pobieranie glukozy czy intensyfikowanie poszczególnych procesów centralnego metabolizmu węgla. Bardzo interesująca jest obserwacja dotycząca roli HP1021 w kontrolowaniu pobierania DNA spoza komórki podczas stresu oksydacyjnego. Pobrane DNA prawdopodobnie służy jako ochrona przed uszkodzeniami własnego materiału genetycznego, dlatego skorelowanie tego procesu ze stresem oksydacyjnym zwiększa przeżywalność komórki i stabilizuje jej materiał genetyczny. Badania przedstawione w tej publikacji mają bardzo duże znaczenie w zrozumieniu funkcjonowania ludzkiego patogenu, *H. pylori* i jego przystosowań do środowiska. Bardzo ciekawą kontynuację badań nad nietypowymi regulatorami transkrypcji przedstawia druga publikacja – **mSystems, 2024**. Badania te pozwalają na przedstawienie bardziej uogólnionych wniosków o białkach podobnych do HP1021, a scharakteryzowanych u kolejnych przedstawicieli *Campylobacter*, czyli *A. butzleri* i *C. jejuni*. Białka te zostały zbiorczo określone jako CemR (Campylobacter energy and metabolism regulators). W pracy tej pokazano, że CemR kontrolują ekspresję wielu genów, w tym tych związanych z metabolizmem (cykl kwasów trikarboksylowych), metabolizmem azotu i oksydacyjnej fosforylacji. Można zatem wnioskować, iż białka te uczestniczą w regulacji szeroko pojętych procesów związanych z energią (w tym poziomem ATP), zależnych od dostępu tlenu. Bardzo istotnym osiągnięciem tych publikacji jest wykazanie kluczowej roli białek określonych jako CemR w procesach metabolicznych i fizjologicznych bakterii, zarówno uniwersalnych dla wszystkich badanych gatunków, jak i specyficznych, dotyczących energii i równowagi redox w komórce.

Dodatkowym wykorzystaniem przeprowadzonych na potrzeby publikacji badań typu Chip-seq są analizy miejsc wiązania badanych białek na chromosomach bakteryjnych, przedstawione w części opisowej rozprawy, a jeszcze nie opublikowane. Uzupełniają one wcześniejsze wyniki, pokazując rozpowszechnienie miejsc wiązania tych białek oraz ich umiejscowienie względem przewidywanych miejsc startu transkrypcji.

Podkreślić należy, że wyniki przedstawione w rozprawie powstały dzięki zastosowaniu szerokiego zakresu metod genetyki, biologii molekularnej, biochemii oraz technik „omicznych” takich jak proteomika, transkryptomika, ChiP-seq oraz korespondujących z nimi analiz bioinformatycznych. Zaangażowanie Doktoranta w wykonanie większości doświadczeń w pracach potwierdza jego wiedzę i umiejętności w zastosowaniu najnowocześniejszej metodologii. Zaś zastosowanie tak bogatego zestawu metod podkreśla dodatkowo wysoką wartość naukową prezentowanych wyników. Godne podkreślenia są także osiągnięcia naukowe Doktoranta, wśród których poza dwoma pracami wchodzącymi w skład rozprawy, znajduje się

jeszcze pięć publikacji w równie renomowanych czasopismach (jak np. *Nucleic Acids Research* czy *Molecular Microbiology*).

Rozprawa doktorska Pana Noszki jest na bardzo wysokim poziomie i z uwagi na opublikowanie jej wyników w prestiżowych czasopismach naukowych trudno jest mieć uwagi krytyczne. Raczej, wyniki pracy indukują pytania o dalsze plany i perspektywy badań, lub też budzą ciekawość odnośnie do samych modeli badawczych. W związku z tym chciałabym kilka z tych pytań zadać i poprosić Doktoranta o odpowiedź na nie podczas obrony:

- Czy białka typu CemR scharakteryzowane u trzech gatunków bakterii z klasy *Campylobacteria* mają swoje odpowiedniki w innych, bardziej odległych ewolucyjnie grupach bakterii?
- Czy obecność nietypowych, określanych jako sieroce, regulatorów ekspresji genów (nie tylko opisanych w tej rozprawie) u *Campylobacteria* stanowi o ich przewadze ewolucyjnej w określonych środowiskach?
- Jak można wyjaśnić wysokie podobieństwo opisanych białek CemR u trzech przedstawicieli *Campylobacteria* zamieszkujących całkiem różne środowiska?
- Czy obserwowano działanie HP1021 lub jego odpowiedników podczas stresu innego niż oksydacyjny?
- Charakterystyka białek CemR wskazuje na ich rolę między innymi podczas stresu oksydacyjnego. Podobnie, powiązanie ich działania z procesami metabolicznymi i energetycznymi, wskazuje, że białka te należą do szeroko pojętej odpowiedzi stresowej tych bakterii. Jaki jest zatem – hipotetyczny – związek działania tych białek regulatorowych i ich regulonów z globalnym systemem odpowiedzi stresowej u bakterii, czyli odpowiedzi ścisłej? Jest to tym bardziej ciekawe, iż w przypadku *H. pylori* obserwowane było zwiększenie syntezy stabilnych RNA.
- Jakie mechanizmy molekularne pozwalają *H. pylori* na wejście w fazę stacjonarną wzrostu pod nieobecność podjednostki σ^S ?
- Czy znane są mechanizmy zastępujące działanie regulatorów CemR (jeśli ich nieobecność nie jest dla komórki letalna)?
- Czy sekwencja konsensus wiązania do DNA różnych białek z grupy CemR wykazuje podobieństwa?

Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr Mateusza Noszki jest znaczącym osiągnięciem naukowym i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Dzięki wyjaśnieniu roli nietypowego regulatora ekspresji genów u bakterii z klasy *Campylobacteria*, stanowi ona istotny wkład w wiedzę o tych mikroorganizmach na poziomie ich mechanizmów molekularnych w odpowiedzi na stres. **Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce**, tekst jednolity: Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn.zm. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu o **dopuszczenie Pana mgr Mateusza Noszki dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość naukową prezentowanej rozprawy zwracam się z wnioskiem o **nagrodzenie rozprawy stosownym wyróżnieniem**.

A. Szalewsko - Potan