



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Mikrobiologii
prof. dr hab. Grażyna Gościńskiak
e-mail:grazyna.goscińskiak@umed.wroc.pl

Wrocław 12.05.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Piotra Szczepanowskiego pt. Charakterystyka sierociego regulatora odpowiedzi HP1021 jako potencjalnego sensora redoks *Helicobacter pylori*

Rozprawa doktorska mgr Piotra Szczepanowskiego przedstawia wyniki badań zmierzające do identyfikacji czynnika kontrolującego aktywność sierociego regulatora odpowiedzi HP1021 oraz scharakteryzowanie mechanizmu regulacji aktywności HP1021 przez ten czynnik zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

Rozprawa została wykonana pod opieką Pani dr hab. Anny Pawlik w zespole posiadającym duże doświadczenie w badaniu drobnoustrojów z rodziny *Campylobacteraceae* i *Helicobacteraceae*.

H. pylori jest bakterią mikroaerofilną kolonizującą jamę ustną i śluzówkę żołądka 60% populacji ludzi na świecie. Jest istotnym czynnikiem rozwoju stanów zapalnych żołądka, choroby wrzodowej żołądka i/lub dwunastnicy i raka żołądka. W jamie ustnej najczęściej występuje w formie kulistej – niehodowlanej, natomiast w żołądku w formie spiralnej lub zakrzywionej -hodowlanej. *H. pylori* wykształcił różne mechanizmy obronne pozwalające mu przetrwać w żołądku w niesprzyjających warunkach środowiska np. w niedokwasocie (ahlorhydrii) lub nadkwasocie żołądka, w tym w narażeniu na stres oksydacyjny. Jednak dotychczas nie wykazano obecności u tej bakterii typowego białka będącego sensorem stresu oksydacyjnego. Z drugiej strony, czynniki regulujące odpowiedź *H. pylori* na stres, szczególnie sierocy regulator odpowiedzi, HP1021, wciąż nie został wystarczająco dobrze scharakteryzowany. HP1021 jest atypowym regulatorem transkrypcji genów. Dotychczas, w badaniach transkryptomicznych z wykorzystaniem mikromacierzy wykazano, że w mutantach delecyjnych genu HP1021 zaburzona jest ekspresja około 80 genów *H. pylori*. Jednak

warunki w których HP1021 podlega aktywacji/hamowaniu nie zostały zidentyfikowane. W tym aspekcie problem regulacji aktywności białka HP1021 podjęty przez Doktoranta jest aktualny i nowatorski.

Rozprawa doktorska mgr Piotra Szczepanowskiego ma formę klasyczną. Opracowanie składające się z 10 rozdziałów: spis treści, streszczenie w j. polskim i w j. angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody zastosowane w badaniach, wyniki, dyskusja wyników badań, wnioski i piśmiennictwo. Jest napisana poprawnym językiem naukowym, rzeczowo przedstawione są zarówno zagadnienia teoretyczne jak i wyniki badań.

Streszczenie zawiera wprowadzenie do tematu, krótki opis wykonywanych badań i uzyskane wyniki.

We „Wstępie” doktorant wyczerpująco wprowadza w tematykę związaną z morfologią i warunkami bytowania *H. pylori*. Omawia wybrane systemy regulatorowe *H. pylori* takie jak systemy dwuskładnikowe i sieroce regulatory odpowiedzi bakterii (w tym HP1021) czy znaczenie genów *nikR* i *fur* w odpowiedzi *H. pylori* na stres kwasowy. W osobnym rozdziale omawia wybrane mechanizmy odpowiedzi *H. pylori* na stres oksydacyjny.

W celu pracy doktorant podkreślił, że badania nad charakterystyką białka HP1021 w zespole dr hab. Anny Pawlik prowadzono wcześniej co zaowocowało wynikami wykazującymi, że białko HP1021 jest nie tylko regulatorem transkrypcji genów, ale też pełni prawdopodobnie funkcje w regulacji częstości inicjacji replikacji chromosomu *H. pylori*. Dalsze prace nad regulacją częstości inicjacji replikacji przez białko HP1021 wymagały jednak wyjaśnienia mechanizmu regulacji białka HP1021. Dlatego celem wyraźnie sprecyzowanym i realizowanym w pracy podjętej przez doktoranta było zidentyfikowanie czynnika kontrolującego aktywność sierocego regulatora odpowiedzi HP1021, a następnie scharakteryzowanie mechanizmu regulacji aktywności HP1021 przez ten czynnik zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

Niezwykle rzetelnie i szczegółowo opisane zostały metody badań – na ich podstawie można odtworzyć przeprowadzone przez doktoranta eksperymenty, co zasługuje na uznanie. Metodologia badań jest właściwie dobrana i pozwala na zrealizowanie założonych celów pracy. Warto podkreślić, że Doktorant aby zrealizować cele pracy wykorzystał szereg technik badawczych, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, m.in., uzyskał preparaty czterech wariantów rekombinowanego HP1021, zastosował dwie techniki badawcze do zanalizowania oddziaływań HP1021 z DNA i jonami Zn^{2+} *in vitro* (EMSA, SPR), przygotował zmutowane szczepy *H. pylori* oraz przeprowadził analizy RT-qPCR w celu zbadania roli HP1021 w komórkach *H. pylori* podanych stresowi oksydacyjnemu.

Wyniki badań zostały zaprezentowane poprawnie w postaci 20 tabel, 43 rycin i 43 rysunków. Przywołanie wszystkich wyników w recenzji nie jest możliwe, gdyż są one bardzo obszerne i wielowymiarowe.

Wymienię tylko najistotniejsze osiągnięcia:

- W oparciu o uzyskany model białka HP1021 zaproponowano, że N-końcowa część może posiadać właściwości domeny regulatorowej, natomiast C-końcowa część domeny wiążącej. Analiza sekwencji aminokwasowej HP1021 wykazała, że białko to zawiera sześć reszt cysteinowych zgrupowanych w dwóch domenach: w domenie N-końcowej, która może mieć charakter regulatorowy, oraz w domenie C-końcowej wiążącej DNA.
- Wykazano, że poddanie rekombinowanego białka HP1021 działaniu tlenu atmosferycznego powoduje utlenienie reszt cysteinowych w białku, co skutkuje zmniejszeniem jego powinowactwa do DNA w stosunku do białka, w którym reszty cystein są zredukowane. Wynik ten wskazał na możliwy mechanizm regulacji aktywności białka na zasadzie modyfikacji redoks reszt cysteinowych.
- Wykazano ponadto zdolność białka HP1021 do wiązania jonów cynku, ale z różnym powinowactwem w zależności od stanu redoks –białko, zredukowane wiąże Zn^{2+} z wyższym powinowactwem niż białko utlenione. Wykazano, że w oddziaływanie z jonami Zn^{2+} zaangażowane są reszty cystein, a związanie jonów Zn^{2+} oraz warunki redoks regulują aktywność HP1021. Wynik ten również wskazał na mechanizm regulacji aktywności HP1021 typowy dla sensorów redoks czyli regulację aktywności zależną od stanu redoks reszt cystein i wiązania jonów metali dwuwartościowych (tu Zn^{2+}).
- Wykazano, że reszty cystein HP1021 podlegają utlenieniu w komórkach *H. pylori* poddanych stresowi oksydacyjnemu w warunkach inkubacji w normalnej atmosferze, co świadczy o ich aktywności redoks.
- Wykazano, że HP1021 kontroluje transkrypcję wybranych genów *H. pylori* (*fadA* (HP0690), *fecA3* (HP1400), *gluP* (HP1174)) w odpowiedzi na stres oksydacyjny.

Wyniki zaprezentowane w pracy są przekonujące, wyczerpująco opisane i świadczą o rzetelnym i dokładnym przeprowadzeniu zaplanowanych badań, które umożliwiły osiągnięcie przedstawionego w pracy celu i wyciągnięcie wniosków. Wnioski są sformułowane zwięźle i

całkowicie wynikają z wyników przeprowadzonej pracy badawczej oraz ich dogłębnej analizy.

W Dyskusji Doktorant przedstawił wyniki swojej pracy na tle dotychczasowej wiedzy zarówno o czynnikach redoks jak i biologii i patogenezы *H. pylori*. Pewnym mankamentem pracy jest literatura naukowa wykorzystana w pracy, zarówno w rozdziale Wstęp jak i Dyskusja. Bibliografia, obejmuje 160 pozycji ale tylko 30 z ostatnich pięciu lat co stanowi 18,75%. Całość pracy dopełniają: podsumowanie wyników, spisy (tabel, rysunków) oraz załączniki.

Chociaż praca jest stosunkowo kompletna, nie znalazłam jednak informacji dotyczących kilku kwestii i proszę Doktoranta o ich uzupełnienie:

- str 12 czy ilość regulatorowych systemów dwuskładnikowych jest rzeczywiście tak niska u *H. pylori* (obecność 3 kinaz histydynowych oraz 5 regulatorów odpowiedzi (cytowanie z 2007 roku).
- str 17-18 za rearanzację peptydoglikanu u *H. pylori* odpowiada także ważna rodzina genów *csd1-7* proszę omówić.
- str 18-19 bakterie odporne ---- powinno być odporne.
- str 18 „w przypadku bakterii *H. pylori* nie identyfikowano dotychczas typowego sensora redoks występującego u innych gatunków bakterii ...niepoprawne stwierdzenie; co z białkami z rodziny Tlp. W celu szybkiej i skutecznej kolonizacji śluzówki żołądka *H. pylori* używa białek z rodziny Tlp (ang transducer-like proteins), które zaangażowane są w wykrywanie różnych bodźców środowiskowych i zależny od tego ruch taktyczny – chemoatraktancję (ruch w kierunku źródła bodźców) lub chemorepelencję (ruch przeciwny niż źródło bodźców) Do rodziny białek Tlp należą TlpA – wykrywa argininę oraz jony wodorowęglanowe, TlpB – wykrywa mocznik, proteiny oraz autoinduktry-2 , TlpC- wykrywa mleczan, a także TlpD – wykrywa wolne rodniki tlenowe oraz kwas podchlorawy. To właśnie dla TlpD sugeruje się zaangażowanie w wyczuwanie stresu oksydacyjnego przez *H. pylori*. W strukturze tego białka wykazano obecność domeny łączącej się z jonami cynku, która posiada motyw 3His/1Cys. Perkins. A et al. „*H. pylori* senses bleach (HOCL) as a chemoattractant using a cytosolic chemoreceptor. PLoS Biol 2019; 17 (8)
- str 30-31 Materiał i metody : czas hodowli *H. pylori* 24h w hodowli stałej i 6 h w hodowli płynnej – jest bardzo krótki, proszę o komentarz ponieważ z reguły po 72h uzyskujemy wynik hodowli na podłożu stałym.

- str 32 pkt 3.7.3 – określenie ¼ płytki jest nieprecyzyjne; bakterie zostały wysiane w postaci murawy czy redukcyjnie.

- str 37 zamrożenie w – 70⁰C, brak minusa.

- str 37: ilość około 0,5x10⁹- brakuje jednostki „CFU/ml”

Wyniki: pod wykresami powinna znaleźć się informacja o ilości powtórzeń doświadczeń, jednokrotne czy wielokrotne – gdzie odchylenia standardowe?

- str 80 rys 42 określenie gęstości bakterii nie było prowadzone co 2,5-3h od 12h hodowli – lepiej byłoby wymienić punkty czasowe

- str 89: określenie gęstości bakterii nie było prowadzone co 2,5-3 godz. od 12 godz. hodowli Lepiej byłoby do publikacji wymienić punkty czasowe

Str 98 *H. pylori* wykształciławykształcił

-str 106: „ HP 1174 wzmaga pobór glukozy podczas stresu oksydacyjnego” warto postawić alternatywną hipotezę np. wzmaga wyrzut glukozy (jako transporter) i zależnie od tego tworzenie macierzy biofilmu podczas stresu oksydacyjnego (mechanizm ochronny).

Podsumowując recenzję merytoryczną rozprawy doktorskiej Pana mgr Piotra Szczepanowskiego mogę stwierdzić, że cel pracy doktorskiej został osiągnięty, a moje uwagi nie umniejszają jej wartości. Praca zawiera nowatorskie ważne wyniki naukowe potwierdzające, że białko HP1021 pełni rolę sensora stresu oksydacyjnego u bakterii co w przyszłości może pomóc w opracowaniu nowych terapii skierowanych przeciwko *H. pylori*. Podkreślić też należy ogrom pracy włożonej w wykonanie badań, staranność ich wykonania i opisanie. Wyniki pracy powinny zostać opublikowane, ponieważ tylko wtedy mogą być wykorzystane do dalszych badań naukowych .

Uważam, że przygotowana do recenzji rozprawa doktorska pt „Charakterystyka sierocego regulatora odpowiedzi HP1021 jako potencjalnego sensora redoks *Helicobacter pylori*” mgr Piotra Szczepanowskiego spełnia wymogi osiągnięcia naukowego, o którym mowa w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr 65, poz 595. z późn. zm). Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu o dopuszczenie Pana mgr Piotra Szczepanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Jednocześnie zważywszy na nowatorskie elementy poznawcze zawarte w recenzowanej dysertacji, zastosowanie złożonych technik badawczych, a także potencjalne znaczenie praktyczne uzyskanych wyników zgłaszam wnioszek o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
kierownik
Gościńskiak
prof. dr hab. Grażyna Gościńskiak