



UNIwersytet
Warszawski



Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii, Zakład Genetyki Bakterii
prof. dr hab. Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka

e-mail kjkryn@biol.uw.edu.pl

Tel. (+48)22 55 41 216

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

Promotor – dr hab. Anna Pawlik

Rozprawa doktorska mgr. Piotra Szczepanika została wykonana w ramach Studium Doktoranckiego Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk w Laboratorium Biologii Molekularnej i Mikrobiologii w grupie badawczej kierowanej przez dr hab. Annę Pawlik. Obiektem badań doktoranta było białko HP1021 *Helicobacter pylori*, białko patogenu zaliczonego przez WHO do grupy pierwszej czynników rakotwórczych. Lawinowo narastająca liczba ludzkich infekcji szczepami *H. pylori* opornymi na stosowane antybiotyki (głównie klarytromycynę) stymuluje do poszukiwania nowych skutecznych środków terapeutycznych. W tym kontekście wszelkie badania pogłębiające wiedzę o fizjologii mikroorganizmu i o molekularnych mechanizmach które sterują tymi procesami są uzasadnione i pożądane. Nie tylko pogłębiają wiedzę podstawową ale mogą potencjalnie mieć wartość aplikacyjną. Badania były finansowane ze środków grantu SONATA BIS Narodowego Centrum Nauki.

Rozprawa doktorska ma formę klasycznej, zwartej rozprawy. Praca składa się ze standardowo odnajdywanych w tego typu rozprawach rozdziałów takich jak; streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, opis stosowanych metod i użytych materiałów, wyniki i ich dyskusja, wnioski oraz bibliografia.

Wstęp do rozprawy (12 stron) poświęcony jest zagadnieniom mechanizmów indukującym stres oksydacyjny oraz mechanizmom wykształconym przez patogenne mikroorganizmy w celu przezwyciężenia skutków działania reaktywnych form tlenu. Ostatni podrozdział opisuje dwa

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia ..28..05..2021.....
L.dz.1058.....

dokładnie przebadane mechanizmy regulacji procesów transkrypcji genów przez regulatory redoks *E.coli* SoxR i OxyR. Zjawiska te przedstawiono w sposób zbyt powierzchowny i przypuszczam, że w pewnych fragmentach niezrozumiały dla osób nie będących ekspertami w omawianej dziedzinie wiedzy. Niektóre elementy procesów reakcji bakterii na stres oksydacyjny zostały pominięte (np. mechanizmy obronne aktywowane przez ROS na terenie peryplazmy). W tym fragmencie rozprawy zauważyłam pewne nieścisłości czy niewłaściwe sformułowania (przykładowo - domena białka zakotwiczona w peryplazmie, odporność na stres kwasowy/tlenowy, odporność na działanie lizozymu, aktywacja opiera się na dwóch resztach cysteinowych (styl), 8-oxoG jest mutacją, słowo sekwencja, które znaczy kolejność, bez doprecyzowania czy to sekwencja aminokwasowa czy nukleotydowa).

Cel pracy został jasno sformułowany – zidentyfikowanie czynnika regulującego aktywność sierocego regulatora HP1021 i wstępne scharakteryzowanie mechanizmu jego działania w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Zaplanowano logiczny ciąg eksperymentów, których realizacja doprowadziła do osiągnięcia zamierzonego celu. Metodyka badań przedstawiona została w sposób jasny i dostatecznie szczegółowy, aby umożliwić ewentualne powtórzenie wykonywanych eksperymentów. Doktorant podczas realizacji badań posługiwał się wieloma technikami badawczymi (analizy *in silico*, metody klasycznej mikrobiologii oraz mikrobiologii molekularnej, szeroki wachlarz technik inżynierii genetycznej, specyficzne metody analizy oddziaływań białek z DNA, czy metody analizy procesów redoks). Doktorant zaprezentował umiejętność doboru strategii badawczej adekwatnej do rozwiązywanych problemów.

Białko HP1021 zostało opisane jako sieroce białko regulatorowe ponad dwadzieścia lat temu. Jest nietypowym regulatorem, chociaż w domenie C-końcowej zawiera motyw HTH warunkujący wiązanie z DNA nie jest ono aktywowane na drodze fosforylacji. Określono regulon HP1021 i wykazano, że w jego skład wchodzi około 80 białek. Badania grupy naukowej kierowanej przez dr hab. Annę Zawilak-Pawlik koncentrowały się na analizie oddziaływania HP1021 na proces inicjacji replikacji. Wykazano, że HP1021 oddziałuje ze specyficznymi boksami w regionie oriC2 i wpływa na proces tworzenia orisomu. Badania przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej doprowadziły do wyjaśnienia mechanizmu działania HP1021, wykazały, że białko jest sensorem stresu oksydacyjnego, który skutkuje zmianą formy redoks reszt cysteinowych. Niewątpliwie jest to znaczący krok w zrozumieniu odpowiedzi tego patogenu na stres oksydacyjny.

HP1021 jest białkiem cytoplazmatycznym zawierającym sześć reszt cysteinowych. Stworzony model struktury wykazał, że HP1021 jest białkiem dwudomenowym, w każdej domenie obecne są trzy reszty cysteinowe a obie domeny powiązane są fragmentem o strukturze alfa-helisy. Znamy już sekwencję nukleotydową kilkuset szczepów *Helicobacter pylori*, czy sprawdzono sekwencje aminokwasowe HP1021 w innych szczepach (badania wykonano z wykorzystaniem dwu szczepów N6 i 2695)?

Punktem wyjścia był eksperyment w którym sprawdzono czy reszty cysteinowe HP1021 będące w warunkach mikroaerofilnych w formie zredukowanej ulegają utlenieniu pod wpływem wzrostu stężenia tlenu, w warunkach imitujących stres oksydacyjny. W badaniach wykorzystano odczynnik AMS wiążący się do wolnych grup-SH i pozwalający na rozdzielenie dwu form (utlenionej i zredukowanej) białek zawierających grupy tiolowe. Rezultaty przedstawiono na rys. 7. Faktycznie już po 5 minutach w warunkach 20 % stężenia tlenu prawie cała pula HP1021 ulega utlenieniu i jest to proces odwracalny zachodzący z różną wydajnością w dwu badanych szczepach. Na rys. 7 nie podano procentowości stosowanego żelu poliakrylamidowego, być może przy wyższej procentowości żelu rozdział obu form byłby bardziej widoczny, w HP1021 AMS potencjalnie może wiązać się do sześciu wolnych grup-SH. Na czym polega proces utleniania: utlenianie grup-SH do kwasu sulfenowego czy tworzenie wewnątrzcząsteczkowych mostków disiarczkowych. Dalsze utlenianie do kwasu sulfonowego jest już procesem nieodwracalnym. Czy obserwowano w tych badaniach powstawanie dimerów, tworzenie mostków pomiędzy dwoma cząsteczkami HP1021?

Dalsze analizy regulatora redoks jakim okazało się potencjalnie być białko HP1021 podzielono na dwa cykle badań: analizy *in vitro* i *in vivo*. Do analiz *in vitro* przygotowano kilka wariantów HP1021. Aby przeanalizować rolę cystein w badanym procesie porównywano aktywność białka natywnego z aktywnością białka w którym wszystkie cysteiny zostały zamienione na alaniny. Dodatkowo przygotowano zmutowane formy białka o resztach cysteinowych zmienionych na reszty alaninowe tylko w jednej z domen białka. Białka zostały oczyszczone w ekspresyjnym układzie *E. coli*. Punktem wyjścia była analiza stanu redoks rekombinowanego białka w warunkach redukujących lub nieredukujących. Wyniki przedstawia rys.11. W mojej opinii wniosek, że słaby prążek pojawiający się w linii 1 to forma utleniona białka nie jest całkowicie uprawniony, eksperyment chyba powinien być uzupełniony dodatkowymi badaniami.

Moje wątpliwości – czy nie skuteczniejsze byłoby zastosowanie żelu o wyższej procentowości, odczynnika AMS oraz analizy stanu redoks po działaniu czynnika utleniającego? Wykorzystując cztery warianty białka analizowano wpływ warunków (białko utlenione i zredukowane) oraz rolę reszt cysteinowych w procesie wiązania HP1021 do DNA (oriC2 region DNA). W badaniach przeprowadzonych dwoma metodami EMSA i SPR udokumentowano zdecydowanie wyższe powinowactwo do DNA białka zredukowanego (forma w jakiej jest obecne w cytoplazmie w warunkach mikroaerofilnych) niż utlenionego. Wykazano, że reszty cysteinowe nie są niezbędne do wiązania choć prawdopodobnie wpływają na konformację białka co ma odzwierciedlenie w wydajności wiązania. W tym cyklu eksperymentów analizowano także wiązanie jonów cynku przez białko HP1021 i jego warianty (test konkurencyjny o jony cynku między białkiem a odczynnikiem Zincon). Stosowano jak poprzednio HP1021 w formie zredukowanej lub utlenionej (nie poddawane działaniu czynnika redukującego). Zaobserwowano hamowanie przez jony cynku wiązania do DNA zarówno formy utlenionej jak i zredukowanej oraz nieznaczny wpływ reszt cysteinowych na ten proces. Nie zawsze wyniki uzyskane dwoma metodami były absolutnie zgodne, co doktorant tłumaczy różnymi warunkami w których wykonywano eksperymenty. Ten fragment badań uważam za bardzo wartościowy. Otrzymane dane udokumentowały wpływ stanu redoks białka na wiązanie do DNA i rolę jonów Zn w tym procesie. Nie udało się jednoznacznie wytypować konkretnych reszt cysteinowych istotnych dla funkcjonowania HP1021 jako przełącznika redoks. Interesujące będzie wykonanie podobnych eksperymentów z fragmentami DNA promotorów niektórych genów regulonu HP1021 oraz wytypowanie cystein które w warunkach stresu oksydacyjnego ulegają utlenieniu.

Drugi fragment rozprawy mgr. P. Szczepanowskiego dotyczy analizy funkcjonowania HP1021 *in vivo* w komórkach hodowanych w warunkach stresu oksydacyjnego w porównaniu do standardowych warunków mikroaerofilnych. W celu przeprowadzenia tych eksperymentów skonstruowano kilka szczepów *H. pylori* – szczep delecyjny nie posiadający genu *hp1021*, szczep zawierający gen *hp1021* kodujący białko z pięcioma cysteinami zamienionymi na alaniny oraz szczep komplementacyjny gdzie do szczepu z delecją *hp1021* wprowadzono dzika kopię genu. Szczepy konstruowano standardowymi metodami biologii molekularnej a prawidłowość konstrukcji potwierdzano metodą PCR, sekwencjonowaniem czy analizą Western-Blot. Analizy wzrostu hodowli wymienionych szczepów w warunkach standardowych oraz w warunkach stresu oksydacyjnego wykazały „dziwne” zachowanie szczepu komplementanta: szczep charakteryzował się szybszym

tempem wzrostu w porównaniu do szczepu dzikiego oraz podobną do szczepu delecyjnego wrażliwością na działanie wody utlenionej. Wstępne analizy wykazały obecność w jego genomie wielu zmian, między innymi w genie kodującym katalazę. Szczep z delecją *hp1021* w odróżnieniu od szczepu kodującego HP1021 z cysteinami zamienionymi na alaniny nie wykazywał aktywności katalazy co skłoniło doktoranta do postawienia hipotezy o braku wpływu redoks zależnej regulacji HP1021 na ekspresję i poziom katalazy, choć jednocześnie białko HP1021 jest aktywatorem transkrypcji tego genu, co wykazano też w publikowanych badaniach. Poproszę o skomentowanie kilku moich uwag odnośnie tego fragmentu badań. 1. Przy konstrukcji szczepów używano „wymienne” DNA szczepu N6 i 2695, rozumiem, że sekwencja nukleotydowa badanego genu i genów sąsiadujących oraz genetyczna organizacja tego regionu DNA jest identyczna. 2. Ile izolowano i sprawdzono klonów szczepu komplementacyjnego. Czy zawsze dochodziło do „uszkodzenia” genu katalazy? *H. pylori* charakteryzuje się wysokim poziomem zmienności genetycznej, dodatkowe mutacje mogą być wprowadzane na każdym etapie manipulacji genetycznych., tak że nietypowe zachowanie szczepów konstruowanych w celu skomplementowania mutacji zawsze powinno budzić obawy co do zaistnienia nieprzewidzianych zmian. Można nadmienić, że podobne zjawisko zaobserwowano także u innych przedstawicieli klasy *Epsilonproteobacterianp.* bakterii rodzaju *Campylobacter*.

Dalsze analizy dotyczyły wpływu HP1021 na poziom transkrypcji wybranych genów, który analizowano metodą RT-qPCR. Upřednio opublikowane badania (analiza metoda mikromacierzy i z zastosowaniem żeli dwukierunkowych) wskazywały na oddziaływanie HP1021 na poziom ekspresji ponad 70 genów. W prezentowanej pracy pogłębiono ta analizy i sprawdzono nie tylko poziom ekspresji wybranych czterech genów w szczepie dzikim i szczepie z delecją genu *hp1021* ale dodatkowo analizowano wpływ stresu oksydacyjnego na badany proces. Wybrano trzy geny dla których HP1021 jest represorem i jeden który był upřednio aktywowany. Jakie były kryteria wyboru tych genów? Nie ma wśród nich genu kodującego katalazę. W wypadku trzech genów potwierdzono zależność ich transkrypcji od HP1021 a dodatkowo udokumentowano zależność tego procesu od warunków redoks. Uzupełnieniem tych eksperymentów byłoby porównanie nukleotydowych sekwencji promotorowych wybranych genów, których transkrypcja jest regulowana przez HP1021 między sobą i do znanych sekwencji nukleotydowych regionu oriC2 wiążących HP1021.

Dyskusja wyników przeprowadzona została w sposób ciekawy i profesjonalny w oparciu o literaturowe dane dotyczące mechanizmów działania przełączników redoks funkcjonujących w komórkach innych gatunków bakterii. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na zaproponowanie modelu działania HP1021 jako sensora redoks. Udokumentowano, że zmiana stanu utlenienia HP1021 zachodząca w warunkach stresu tlenowego skutkuje modulowaniem jego powinowactwa do DNA co skutkuje zmianą poziomu ekspresji wybranych genów. Doktorant podkreśla w dyskusji że wiele elementów tego procesu takich jak określenie mechanizmu reaktywacji HP1021, wytypowanie które z reszt cysteinowych HP1021 są kluczowe w przebiegu procesów sygnalizacyjnych, poznanie szczegółów regulacji ekspresji genów przez HP1021 i roli jonów cynku w tym procesie, wymaga dalszego wyjaśnienia.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona rozprawa stanowi ważny element poznania mechanizmów obrony przed stresem tlenowym istotnego ludzkiego patogenu. HP1021 jest pierwszym opisanym przełącznikiem redoks funkcjonującym w komórkach *Helicobacter pylori*. Uznaję przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską za wartościową i spełniającą wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie mgr. Piotra Szczepanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Manuskrypt publikacji zawierający wyniki badań zawarte w omawianej rozprawie został zaakceptowany do druku w renomowanym czasopiśmie Nucleic Acid Research (pięcioletni IF = 11.797). Wniosuję o nagrodzenie rozprawy stosowną nagrodą.

Warszawa 17.05.2021



ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>