



Wrocław, 20 maja 2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Piotra Szczepanowskiego
„Charakterystyka sierocego regulatora odpowiedzi HP1021 jako potencjalnego sensora redoks
Helicobacter pylori”

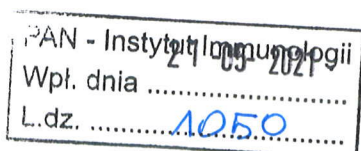
Gram-ujemna bakteria *Helicobacter pylori*, mogąca zasiedlać środowisko ludzkiego układu pokarmowego, jest uznawana za przyczynę zapaleń i wrzodów żołądka. Uważa się również, że zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworów układu pokarmowego. Za odkrycie i opisanie jej roli w chorobach żołądka Barry Marshall oraz Robin Warren otrzymali w 2005 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii. Co ciekawe, *H. pylori* jest obecna w przewodzie pokarmowym około 60% ludzi.

Bakteria *H. pylori* wykazuje mechanizmy adaptacyjne pozwalające jej przetrwać w skrajnie niekorzystnym środowisku. Oprócz stresu wywołanego warunkami bytowania, bakteria narażona jest na odpowiedź układu immunologicznego. Makrofagi oraz neutrofile wydzielają reaktywne formy tlenu oraz azotu celem zniszczenia patogenu.

Większość bakterii posiada szereg mechanizmów regulatorowych, zapewniających funkcjonowanie oraz przeżycie w trudnych i niesprzyjających warunkach. Genom *H. pylori* jest stosunkowo ubogi w białka regulatorowe. Co interesujące, nie odkryto do tej pory białka będącego typowym sensorem redoks.

Badania prowadzone przez mgra Piotr Szczepanowskiego, przedstawione w recenzowanej rozprawie, wnoszą istotne informacje o chorobotwórczej bakterii *H. pylori*. Praca była realizowana w bardzo dobrze przygotowanym do tego zespole, kierowanym przez doświadczonego naukowca dr hab. Annę Pawlik.

Rozprawa została napisana w sposób klasyczny i liczy, razem z załącznikami, 130 stron. Rozdział *Wstęp* liczy 11 stron. Autor przedstawia pokrótce informacje o *H. pylori*, a następnie przechodzi do omówienia warunków bytowania bakterii oraz mechanizmu generowania wolnych rodników przez komórki układu immunologicznego. Dalej znajdujemy opis systemów



regulatorowych występujących u tej bakterii, w tym mało poznanych regulatorów sierocych HP1043 i HP1021. Kolejne części wstępu poświęcone są odpowiedzi bakterii na stres oksydacyjny oraz sensorom redoks. Te dwa podrozdziały są najbardziej rozbudowane i szczegółowo wprowadzają czytelnika w tematykę bezpośrednio związaną z doświadczeniami przeprowadzonymi w ramach rozprawy. Wstęp jest napisany zwięźle i zasadniczo dobrze naświetla zagadnienia związane z recenzowaną pracą.

Cel pracy został jasno przedstawiony. W grupie prowadzonej przez dr hab. Anny Pawlik badane jest, między innymi, białko zaangażowane w replikację chromosomu *H. pylori* - HP1021. Doktorant pojął się zidentyfikowania jego aktywatorów, a następnie określenia mechanizmów regulacji aktywności HP1021 *in vitro* oraz *in vivo*.

Rozdział *Materiały i Metody* jest napisany szczegółowo i pozwala odtworzyć przeprowadzone w trakcie realizacji pracy eksperymenty. Doktorant rozpoczął badania od analizy ilości wolnych grup tiolowych w białku HP1021 w warunkach mikroaerofilnych oraz tlenowych. Analiza *in vitro* białku typu dzikiego wykazała możliwość tworzenia wewnątrzcząsteczkowego mostka disiarczkowego. Mając te dane, Autor rozprawy postanowił przeprowadzić analizę oddziaływania rekombinowanego HP1021 w zależności od warunków redukujących. W tym celu otrzymał rekombinowane warianty HP1021, zawierające podstawienia wszystkich cystein do alanin. Obserwacja migracji w żelu pozwoliła wysunąć wniosek o zależnym od ilości wolnych grup cysteinowych oddziaływaniu z DNA. Te eksperymenty zostały uzupełnione badaniami techniką SPR dla rekombinowanych białek: typu dzikiego oraz muteiną nie posiadającą reszt cysteinowych. Konsekwentnie, chcąc określić, która część białka wpływa na zmianę powinowactwo do DNA w zależności od stopnia utlenienia, Doktorant otrzymał warianty białka pozbawione reszt cysteinowych jedynie w N- lub C-końcowej domenie. Analiza powinowactwa dostarczyła na tyle złożonych wyników, że nie pozwoliła jednoznacznie określić, które cysteiny pełnią funkcję regulatorową. Pomimo tego, otrzymane wyniki uważam za wartościowe i wnoszące nowe elementy do zrozumienia aktywności białka HP1021.

Kolejna część badań, zaprezentowanych w rozprawie, dotyczyła analizy wiązania jonów Zn^{2+} przez białko HP1021. Możliwe, że jak to ma miejsce w innych białkach regulatorowych, jony cynku są wiązane przez białko i mają wpływ na powinowactwo do DNA. Dysponując mutantami cysteinowymi, Doktorant przeprowadził analizę wiązania się Zn^{2+} do białka HP1021 oraz wpływu tego wiązania na oddziaływanie z DNA, wskazując rolę cystein w koordynacji jonów Zn^{2+} . Ponadto wykazał zależności pomiędzy stanem redoks, wiązaniem Zn^{2+} a powinowactwem do DNA. Moim zdaniem, jest kolejny wartościowy element recenzowanej pracy.

Wyniki doświadczeń *in vitro*, wskazujące na sensoryczną rolę HP1021, stały się przesłanką

dla wykonania szczepów o zaburzonej funkcji HP1021. W pierwszej kolejności Doktorant otrzymał następujące szczepy bakterii: szczep pozbawiony genu kodującego HP1021; szczep, w którym pięć cysteiny zostało zmienione na alaniny oraz szczep komplementacyjny. Szczepy te zostały następnie użyte do eksperymentów w warunkach szoku oksydacyjnego. Niejednoznaczne wyniki naprowadziły Autora rozprawy do wniosku, że podczas generowania szczepów doszło do powstania mutacji, co uniemożliwiło interpretację wyników. W związku z tym kolejne badania skupiły się na analizie poziomu ekspresji wybranych genów regulowanych przez białko HP1021. Doktorant wskazał trzy geny, których ekspresja jest zależna od białka HP1021 w warunkach stresu oksydacyjnego. Podsumowując przedstawione wyniki, chciałbym podkreślić, że pomimo napotkanych trudności związanych ze skomplikowaną naturą układów biologicznych, Autorowi rozprawy udało się wykazać, że białko HP1021 działa na zasadzie sensora redoks a domena N-końcowa może pełnić rolę regulatorową. Doktorant wykonał szereg eksperymentów, które przyczyniły się do zrozumienia aktywności sierocego regulatora HP1021 i mogą być podstawą do bardziej szczegółowych badań opisujących mechanizm jego działania.

Rozdział *Dyskusja* zawiera szereg krytycznych komentarzy do otrzymanych wyników. Doktorant we właściwy sposób odnosi się do danych literaturowych, interpretując otrzymane przez siebie rezultaty. Część przeprowadzonych badań dała niejednoznaczne wyniki. Należy pochwalić Autora rozprawy, że nie nadinterpretuje lub nie pomija "niewygodnych" danych. Chciałbym również podkreślić, że odkrycia przedstawione w rozprawie mogą przyczynić się do rozwoju nowych terapii przeciwko *H. pylori*.

Mam następujące uwagi oraz pytania:

- Rysunek 2 powinien zostawać szerzej opisany. Zastosowanie skrótów nazw białek i strzałek bez opisu czyni go mało czytelnym. Podobnie w przypadku Rysunku 3.
- W rozdziale *Wstęp* pojawia się informacja: „...u bakterii *H. pylori* wykazano obecność 3 kinaz histydynowych oraz 5 regulatorów odpowiedzi” (strona 12). Cytowanie pochodzi z 2007 r. Czy są nowsze dane na ten temat ?
- W rozdziale *Materiały i Metody* nie znalazłem opisu biotynylacji fragmentów DNA (przed pomiarem SPR). Podobnie nie ma opisu testu katalogowego zamieszczonego na rysunku 42.
- Autor rozprawy do przewidywania struktury trzeciorzędowej białka zastosował program/serwer? o nazwie Phyre2. Nie znalazłem odnośnika literaturowego, ani opisu toku postępowania.
- Porównując model białka HP1021 do struktury cząsteczki HP1043, Autor używa sformułowania "Podobną budowę wykazano w przypadku drugiego sierocego regulatora

odpowiedzi *H. pylori*, HP1043". Co oznacza określenie "podobną"? Nie znalazłem żadnej wartości numerycznej, która by na to wskazywała.

- Na rysunkach przedstawiających sensogramy otrzymane metodą SPR Autor umieszcza krzywe z różnych eksperymentów. Ilość danych powoduje trudności z interpretacją wyników. Dużo klarowniejsze byłoby umieszczenie obok siebie paneli z niezależnymi wykresami dla danych warunków eksperymentu (przy zachowaniu identycznej skali Y).
- Użycie pełnych nazw białek w podpisach tabel 18-22 oraz na Rysunku 43 ułatwiłoby zrozumienie efektów biologicznych związanych z regulonem HP1021.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej „Charakterystyka sierocego regulatora odpowiedzi HP1021 jako potencjalnego sensora redoks *Helicobacter pylori*” jest wysoce pozytywna, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie mgra Piotr Szczepanowski przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Daniel Krowarsch