



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii  
Instytut Mikrobiologii  
Zakład Genetyki Bakterii  
dr hab. Renata Godlewska



Warszawa, 24 października 2023

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Bieleckiej, pt.**

**„Wewnątrzkomórkowe funkcje białka HtrA u bakterii *Helicobacter pylori*”**

**wykonanej w Katedrze Biochemii Ogólnej i Medycznej, Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,**

**pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Skórko-Glonek**

*H. pylori* jest jedną z najpowszechniejszych przyczyn uporczywych infekcji u ludzi. Wywołuje przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka i jest głównym czynnikiem etiologicznym raka żołądka i choroby wrzodowej. Pomimo intensywnych badań, prowadzonych od ponad 40 lat, mechanizmy patogenezы *H. pylori* nie zostały wciąż w pełni poznane. Dzięki różnym czynnikom wirulencji bakterie są zdolne do przetrwania w skrajnie niekorzystnych warunkach panujących w żołądku, do kolonizacji śluzówki żołądka oraz przełamania systemów obronnych gospodarza. Praca doktorska mgr Małgorzaty Bieleckiej dotyczy proteazy HtrA, uznawanej za jeden z czynników wirulencji *H. pylori*. Podkreślić należy, że przedstawione badania, w odróżnieniu od innych prac dotyczących tego białka, nie koncentrują się, na udziale HtrA w patogenezie, a na jego wewnątrzkomórkowych fizjologicznych funkcjach. O znaczeniu HtrA dla funkcjonowania komórki świadczy fakt, że jak dotąd tylko w jednym szczepie *H. pylori* N6, udało się inaktywować gen *htrA*. Głównym modelem badawczym w ocenianej rozprawie są dwa zmutowane szczepy *H. pylori* N6: z całkowitą delecją genu *htrA* i z mutacją punktową S221A pozbawiającą kodowane białko aktywności proteazowej. Szczepy te oraz ich wersje komplementacyjne posłużyły Doktorantce do badań nad funkcją HtrA w komórce *H. pylori*, a także do eksperymentów mających na celu identyfikację potencjalnych komórkowych substratów i/lub partnerów białka.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim w formie spójnego tematycznie opracowania. Liczy ona 185 stron i została opatrzona 38 rysunkami i 23 tabelami. Układ rozprawy jest prawidłowy – typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym, zawiera więc charakterystyczne dla takich opracowań rozdziały, tj. Streszczenie (również w języku angielskim), Wstęp, Materiały, Metody, Cel pracy, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie oraz spis cytowanej literatury. W pracy zamieszczono także wykaz stosowanych skrótów oraz dołączono płytę CD zawierającą „surowe” dane uzyskane w przeprowadzonych doświadczeniach.

ul. Iłji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa  
tel.: 22 55 41 321, faks: 22 55 41 402  
e-mail: r.godlewska@uw.edu.pl  
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Rozprawa jest napisana poprawnym specjalistycznym językiem polskim co niewątpliwie zasługuje na pochwałę. W kilku miejscach znalazłam jednak niezręczne sformułowania i drobne błędy literowe językowe i edytorskie, których kilka przykładów, z obowiązku recenzenta, tu przytoczę:

- str. 18 „Białka opuszczające rybosom są w pierwszej kolejności asystowane przez białko (...)”
- str. 33 „Bakteria ta wykorzystując wiązkę rzęsek, silną produkcję ureazy i innych czynników (np. mucyn) ma zdolność do poruszania się (...)” – *Helicobacter* nie produkuje mucyn, raczej enzymy je degradujące;
- na Rysunku 5 pojawiło się określenie Bakteria Gram-negatywna zamiast gramujemna;
- w kilku miejscach znajdują się nieprawidłowo przełamane zdania (str. 42, 49, 100);
- z niezrozumiałych dla mnie względów Autorka nie odmienia słów: tabela i rysunek, np. „Spis szczepów z uwzględnieniem nazwy, genotypu oraz źródła umieszczono w Tabela 2”;
- określenie „konserwy bakteryjne” wydaje mi się niezręczne;
- rysunki 33 i 38 w wersji czarno-białej wydruku są mało czytelne, podobnie jak i rysunki 18, 26, 31, 32 pomimo wersji kolorowej.

### **Ocena poszczególnych rozdziałów rozprawy**

Rozdział **Wstęp** obejmuje 28 stron rozprawy i zawiera 5 równocennych w hierarchii numeracji podrozdziałów, w których opisano kolejno: (1) proteostazę w komórkach bakteryjnych, uwzględniając cyto- i pozacytoplazmatyczne systemy kontroli jakości białek, (2) scharakteryzowano białko HtrA/DegP, (3) mechanizmy translokacji białek przez błonę cytoplazmatyczną, następnie (4) bakterie *Helicobacter pylori* ze szczególnym naciskiem na systemy transportu białek i odpowiedź na stres, a w ostatnim podrozdziale (5) rolę białek HtrA w wirulencji patogennych gatunków bakterii. W mojej ocenie wstęp jest za długi, a jego lektura miejscami dość przytłaczająca. Ogromna liczba wymienionych nazw i skrótów nazw białek utrudniają płynną lekturę. Mimo tego należy przyznać, że ta część pracy jest rzetelnym źródłem wiedzy niezbędnej do zrozumienia istoty problemu badawczego oraz bardzo dobrze uzasadnia wybór tematyki badawczej.

Kolejny rozdział zawiera opis wykorzystanych w badaniach materiałów i metod. Zawarte w nim szczegółowe informacje pozwalają, w mojej ocenie, na powtórzenie najważniejszych eksperymentów.

Rozdział **Wyniki** to obszerny opis części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej. Składa się z 72 stron tekstu wraz z 30 rysunkami i 4 tabelami. Ciąg eksperymentów został zaplanowany logicznie, z jasno postawionym celem. Większość badań była skoncentrowana na poszukiwaniu i identyfikacji substratów i/lub partnerów HtrA, czyli zarówno białek degradowanych przez badane białko jak i tych które dzięki niemu uzyskują swoją docelową konformację czy lokalizację. Analiza oddziaływań między białkami, które są kluczowe do zachodzenia wielu procesów komórkowych niezbędnych do zachowania homeostazy, jest jednym z podstawowych obszarów badań nad biochemią komórki. Pomimo dostępnych różnorodnych metod są to trudne, kosztowne i czasochłonne badania, a na dodatek obciążone ryzykiem uzyskiwania fałszywie pozytywnych rezultatów. W swoich badaniach Doktorantka zastosowała dwa typowe, wstępne testy przesiewowe używane do identyfikacji wcześniej nieznanymi interakcji białko-białko, tj.: immunoprecypitację i tzw. „pull down” wraz z jego wariantami: „pull down” z wykorzystaniem rekombinowanego HtrA, wewnątrzkomórkowego HtrA oraz wewnątrzkomórkowego HtrA i związku sieciującego. Białka potencjalnie oddziałujące z badanym białkiem analizowano i identyfikowano metodą spektrometrii mas. Metody immunoprecypitacji i „pull down” z wykorzystaniem rekombinowanego HtrA nie przyniosły satysfakcjonujących Doktorantkę rezultatów, pierwsza z powodów technicznych, a druga z uwagi na mnogość fałszywie pozytywnych wyników.

W analizie „pull down” z zastosowaniem endogennego HtrA także zidentyfikowano bardzo dużo białek, również cytoplazmatycznych, które z racji swojej lokalizacji raczej nie mogą oddziaływać z HtrA.

Wykorzystanie endogennego HtrA i związku sieciującego (DSP) *in vivo* doprowadziło do zmniejszenia liczby zidentyfikowanych białek, ale wciąż nie pozwoliło na wytypowanie potencjalnych partnerów badanego białka. Doktorantka zauważyła jednak, że wśród zidentyfikowanych białek było wiele białek błonowych. Dlatego wykorzystwała białka z frakcji wzbogaconej w błony w połączeniu z czynnikiem sieciującym i dopiero takie podejście ograniczyło liczbę uzyskanych potencjalnych partnerów choć i tu także pojawiły się białka cytoplazmatyczne. Po analizie wszystkich wyników, uzyskanych metodą „pull down”, do dalszych badań wytypowano 4 białka: trzy proteazy: HP\_0657 (YmxG), HP\_1012 (PqqE), HP\_1350 (gen *prc*) oraz białko HP\_0175 (SurA) – izomerazę cis-trans peptydyloprolinową. Ich wybór, moim zdaniem, nie został dostatecznie umotywowany. Głównym kryterium wyboru, oprócz tego że wymienione białka zostały zidentyfikowane w spektrometrii masowej, choć nie we wszystkich zastosowanych wariantach „pull down” (np. HP\_0175 i HP\_1350 nie pojawiły się wśród białek frakcji FWB), była chyba ich podobna funkcja czyli bycie proteazą, chociaż białko HP\_0175 nie ma tej aktywności. W tabeli 21 są wymienione też inne białka, z dużą liczbą dopasowanych peptydów, które także są potencjalnie interesujące, np. HP\_0224 (MsrAB) czy HP\_0275. Oczywiście nie da się przeanalizować wszystkich białek na raz, ale moim zdaniem wybór powinien być lepiej umotywowany.

W dalszym etapie pracy Doktorantka sprawdzała, czy wytypowane białka rzeczywiście oddziałują z HtrA. W tych analizach panuje pewien nieporządek. Oddziaływania badano poszukując kompleksów z białkiem HtrA w eluatach otrzymanych w analizie „pull down”, przy pomocy specyficznych przeciwciał anty-HP\_0657, anty-HP\_1012, anty-HP\_1350. Dlaczego do tej analizy nie zostało włączone białko HP\_0175? Następnie Doktorantka oczyściła białka HP\_0657, HP\_1012, HP\_1350 oraz HP\_0175 ze znacznikiem 6xHis. Do amplifikacji trzech pierwszych genów użyto DNA genomowego zupełnie innego szczepu niż szczep badany w pracy, czyli 26695 zamiast N6. Natomiast do amplifikacji HP\_0175 wykorzystano DNA szczepu N6. Przypada mi do głowy, że autorka sprawdziła podobieństwo sekwencji aminokwasowych białek w obu szczepach i jest ono wysokie, jednakże użycie DNA szczepu 26695 nie ma uzasadnienia merytorycznego. Przyczyną jest zapewne fakt, że Doktorantka uzyskała gotowe plazmidy pMJ1, pMJ2 i pMJ3 służące do nadekspresji genów *hp\_0657*, *hp\_1012*, *hpP\_1350* z kolekcji Katedry Bionauk, Wydziału Mikrobiologii Uniwersytetu w Salzburgu i to należało wg mnie wprost napisać. W badaniach pojawiło się nagle, bez wyjaśnienia, białko HP\_1350(S300A), które także zostało oczyszczone. Dopiero przy analizie oddziaływań z wykorzystaniem sączenia molekularnego, dodano informację, że jest to wersja HP\_1350 pozbawiona aktywności proteazowej. Dlaczego tylko to białko jest w takiej wersji, a pozostałe dwie proteazy nie? Co więcej Doktorantka użyła jedynie mutantu HP\_1350(S300A) w analizach oddziaływań z wykorzystaniem sączenia molekularnego. Dlaczego nie użyto także „dzikiej” wersji tego białka? Natomiast w badaniu aktywności proteolitycznej HtrA względem wytypowanych białek oprócz białek HP\_0657, HP\_1012, HP-0175 wykorzystano już tylko „dziką” wersję białka HP\_1350. Ponadto na rysunku obrazującym tę analizę nie ma wcale białka HP\_1012.

W badaniu wpływu braku HtrA lub braku jego aktywności proteolitycznej na poziom wytypowanych potencjalnych partnerów w komórce i we frakcji wzbogaconej w błony (FWB) zabrakło natomiast białka HP\_0175. Dlaczego zostało ono pominięte? Wskazywana lokalizacja tego białka jest taka sama jak HP\_1012: sekrecyjne, obecne w pęcherzykach zewnątrz błonowych. Czy nie lepiej byłoby wszystkie doświadczenia przeprowadzić w ten sam sposób i na tym samym zestawie białek?

Innym, zastosowanym przez Autorkę, podejściem do poszukiwania substratów HtrA w komórkach *H. pylori* było trawienie, w różnych warunkach, oczyszczoną proteazą HtrA, białek lizatu komórkowego mutantu  $\Delta htrA$ . Białka z prążków, które „znikały”, czyli uległy strawieniu, były identyfikowane metodą spektrometrii mas. Ta analiza, w mojej opinii, także nie dała jednoznacznych odpowiedzi dotyczących substratów dla proteazy HtrA.

Doktorantka zbadała także wpływ braku HtrA na profil białkowy komórek *H. pylori*, analizując zmianę poziomu białek w szczepie z delecją genu *htrA* w porównaniu do poziomu białek w szczepie z komplementacją tej mutacji. Badanie wykazało, że brak białka HtrA wpływa na poziom wielu białek w komórce, zarówno zmniejszając jak i zwiększając go. Zostały one zgromadzone w Tabeli 23. Analizując tę tabelę można dojść do wniosku, że brak HtrA wpływa na większość procesów komórkowych.

W przedstawionej do recenzji pracy zastosowano różne podejścia eksperymentalne w celu określenia funkcji HtrA w komórce *H. pylori*, identyfikacji białek z nim oddziałujących czy określenia skutków braku funkcjonalnego HtrA w komórce. Nie doprowadziły one do jednoznacznego wskazania substratów i partnerów badanego białka w komórce *H. pylori*. Należy jednak przyznać, że uzyskane wyniki wskazują na współdziałanie HtrA i wytypowanych przez Doktorantkę białek, choć charakter i mechanizm tych interakcji pozostaje wciąż niejasny i wymaga dalszych badań. Niewątpliwie nie są to jedyne białka, które oddziałują z proteazą HtrA.

Trzeba pamiętać, że z konieczności, zastosowany przez Doktorantkę układ badawczy nie jest układem całkowicie czystym. Mam tu na myśli, obecność mutacji punktowych, w domenie C-końcowej SecA, które towarzyszą delecji genu *htrA*. Ta zależność jest bardzo interesująca i uważam, że konieczne jest dokładniejsze wyjaśnienie roli mutacji w *secA*, co mogłoby być zapewne tematem kolejnej pracy doktorskiej. Nie wiadomo jaki jest wpływ mutacji w *secA* na proteom *H. pylori*. W publikacji Anny Zawilak-Pawlik (Establishment of serine protease *htrA* mutants in *Helicobacter pylori* is associated with *secA* mutations) autorzy piszą, że mutacji deleccyjnej *htrA* towarzyszyło pojawienie się kilku mutacji punktowych w *secA*. Ich efekty fenotypowe były różne. W niektórych szczepach (*H. pylori*  $\Delta htrAsecAR837K$  i *htrAS221AsecAP858Y*) poziom ekspresji białka jak i tempo wzrostu komórek było podobne zarówno w mutancie jaki i w szczepie dzikim i komplementantach, zaś mutacje reszt cysteiny w pozycjach *secAC852Y*, *secAC841Y* spowalniały wzrost *H. pylori*. Pytanie dlaczego inaktywacja *htrA* powoduje selekcję specyficznych mutacji w domenie C-końcowej SecA jest bardzo ciekawe i pozostaje jak na razie bez odpowiedzi.

Należy się spodziewać że wpływ mutacji w *secA* jest znaczący bo jest to przecież jedno z głównych białek uczestniczących w transporcie protein przez błonę komórkową. Zapewne jego delecja byłaby dla komórki letalna z powodu zablokowania transportu białek przez błonę i nagromadzenia ich prekursorów w cytoplazmie. Ale może dałoby się wprowadzić w gen *secA* mutacje punktowe, takie jakie odnaleziono w szczepie N6 po wprowadzeniu mutacji deleccyjnej *htrA* i w ten sposób zbadać bezpośredni wpływ zmian w białku SecA na komórkę *H. pylori*, bez zmian w HtrA. Interesująca byłoby także próba wprowadzenia w takim szczepie mutacji deleccyjnej w genie *htrA*. Może wtedy udałoby się wprowadzić delecję *htrA* także w innych niż N6 szczepach *H. pylori*. Szczepy z mutacjami punktowymi w *secA*, byłyby najlepszą kontrolą w przeprowadzonych przez Doktorantkę badaniach, Interpretacja wyników dotyczących wpływu HtrA na funkcjonowanie i biogenezę błony zewnętrznej bakterii byłaby zapewne łatwiejsza. Ciekawa jestem co na ten temat myśli Doktorantka.

Mam jeszcze kilka szczegółowych pytań dotyczących *Wyników*:

- 1) Czy immunoprecypitacji nie można było przeprowadzić z wykorzystaniem przeciwciał anty HisTag, zamiast poliklonalnych przeciwciał anty HtrA?
- 2) Czy do analizy „pull down” zostały oczyszczone oba warianty białka: z i bez aktywności proteazowej? Na zdjęciach przedstawiających efekt oczyszczania jest jedno z nich (HtrA<sub>HP</sub>-Twin-Strep-Tag – to z aktywnością proteazy), ale jak rozumiem są to przykładowe żele. Czy „pull down” wykonano z tylko użyciem białka rekombinowanego HtrA<sub>HP</sub>-S221A?
- 3) W eksperymencie weryfikującym oddziaływania z wybranymi białkami, w którym wykonano immunoblotting frakcji elucyjnych z eksperymentu „pull down” Autorka napisała, że jako kontroli użyto przeciwciał anty HtrA. Na rysunkach 19 i 20 nie widzę tych kontroli.
- 4) Na rysunku 25 przedstawiono wynik immunodetekcji i podpisano, że na zdjęciu F jest HtrA<sub>HP</sub>+HP\_1350. Którego wariantu białka użyto w tym doświadczeniu HP\_1350 czy HP\_1350(S300A)?

W **Dyskusji** Doktorantka przeprowadziła dokładną analizę wyników uzyskanych w poszczególnych doświadczeniach i krytycznie je omówiła uwzględniając rezultaty innych badaczy. Szczególnie interesujące jest dla mnie zaangażowanie HtrA w biogenezę błony zewnętrznej, a zwłaszcza wpływ HtrA na poziom białek błonowych biorących udział w patogenezie, np. Omp9, Omp19, Omp20 czy FrpB. Fascynujące są także, wciąż nie do końca zrozumiałe, powiązania z CagA, jednym z głównych czynników wirulencji *H. pylori*. Rozdział ten świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i gruntownej znajomości podjętej tematyki badawczej. Wnioski umieszczone w rozdziale *Podsumowanie* uważam za merytorycznie poprawne.

Zacytowane w pracy piśmiennictwo zebrane w rozdziale **Literatura** obejmuje 289 odpowiednio dobranych i aktualnych pozycji.

Do realizacji zadań badawczych Pani Małgorzata Bielecka zastosowała szereg adekwatnych i zróżnicowanych metod:

- (1) mikrobiologicznych (podstawowe metody hodowli mikroorganizmów, frakcjonowanie komórek bakteryjnych);
- (2) genetycznych (izolacja DNA, amplifikacja DNA metodą PCR, trawienie, ligacja DNA czyli metody konieczne do konstrukcji plazmidów do nadekspresji HtrA,);
- (3) biochemicznych (począwszy od na pozór prostego oczyszczania białek metodą chromatografii powinowactwa, przez sączenie molekularne, analizę białek w żelach, densytometrię, sieciowanie białek, „pull down”, immunoprecypitację, immunoblotting) oraz
- (4) statystycznych, koniecznych do analizy uzyskanych danych.

Stosowanie tak rozmaitych metod świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i umiejętności jego wykorzystania przez Doktorantkę.

Na koniec chciałam podkreślić, że przedstawione w recenzji uwagi, nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy i nie wpływają na moją wysoką ocenę całości rozprawy przedłożonej mi do recenzji. Cel naukowy został osiągnięty – Doktorantka wskazała 4 białka wchodzące w interakcję z proteazą HtrA i zbadała wpływ delekcji genu *htrA* na proteom *H. pylori*.

W mojej opinii, przedstawiona praca stanowi wartościowe opracowanie, a jej wyniki wnoszą nowe treści do ogólnej wiedzy na temat proteazy HtrA *H. pylori* i jej funkcji w komórce. Prawdopodobne zaangażowanie tego białka w wiele procesów komórkowych, a także udowodniony już wcześniej udział HtrA w patogenezie *H. pylori* sprawia, że jest ono atrakcyjnym obiektem badawczym, zaś fakt, że HtrA jest także potencjalnym celem dla nowych leków anty-*Helicobacter*, dodaje tym badaniom znaczenia aplikacyjnego.

W mojej ocenie recenzowana rozprawa doktorska **mgr Małgorzaty Bieleckiej** spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz.1669 z późn. zm.). Wnioskuje więc do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie **mgr Małgorzaty Bieleckiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Renata Godlewska