



Grzegorz Dubin

ul. Gronostajowa 7a, 30-387 Kraków

(+48) 664-143-130
grzegorz.dubin@uj.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Ambroziak pt. Translokon SEC jako mediator odpowiedzi komórki na zaburzenie pozacytoplazmatycznej homeostazy u bakterii *Helicobacter pylori*.

Rozprawa doktorska została przygotowana na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką prof. dr hab. Joanny Skórko-Głonek (promotor) oraz dr inż. Donaty Figaj (promotor pomocniczy).

System SEC odpowiada za eksport białek bakteryjnych z cytoplazmy przez błonę wewnętrzną. Cytoplazmatyczne białko SecA (przy udziale SecB) rekrutuje substraty transbłonowego kompleksu SecYEG i przez hydrolizę ATP zapewnia energię niezbędną do transportu.

Proteaza HtrA stanowi istotny element pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości białek u bakterii Gram-ujemnych, a jej funkcja jest niezbędna dla przeżycia ludzkiego patogenu *H. pylori*. Letalny efekt braku funkcjonalnej proteazy HtrA ulega supresji w mutantach C-końca SecA. Z powyższych obserwacji autorka stawia hipotezę o regulacji translokonu SEC w odpowiedzi na stres pozacytoplazmatyczny. Testowanie tej hipotezy oraz wpływu mutacji C-końca SecA na funkcję białka stanowi motywy przewodnie pracy.

Pierwsza część wyników opisuje porównanie właściwości fizykochemicznych oczyszczonych wariantów SecA. Autorka pokazuje prawie identyczne profile CD wszystkich wariantów oraz zwiększoną stabilność termiczną formy skróconej (SecAC843X). Analiza poprzez ultrawierowanie analityczne wskazuje na dominującą monomeryczną formę białka. Autorka konkluduje, iż wszystkie warianty wykazują podobne wiązanie do liposomów – czy jednak aby na pewno? Autorka stosuje wysycające stężenia liposomów, być może przy stężeniach niższych udałoby się zaobserwować różnice. Proszę o komentarz w tym zakresie. Następnie autorka analizuje aktywność ATP-azową wariantów, przedstawiając wcześniej ograniczoną optymalizację warunków przeprowadzania testu. W tym zakresie mam kolejną wątpliwość. Obecność peptydu nie wpływa znacząco na aktywność (przynajmniej wizualnie – brak analizy statystycznej wyników), a autorka nie testuje wariantu mieszaniny reakcyjnej bez peptydu, a z HtrA. Być może, obecność peptydu nie ma w ogóle wpływu na reakcję. Poza tym autorka nie testuje wpływu białka obojętnego. Być może wpływ HtrA nie jest specyficzny, a jest po prostu często obserwowanym efektem zablokowania niespecyficznych miejsc przez białko nośnikowe. Nie ulega dla mnie wątpliwości, że ostatecznie przyjęta formuła testu jest użyteczna do dalszych prac,

jednak wyodrębnienie rozdziału dot. optymalizacji sugerowałoby systematyczne podejście do zagadnienia (z odpowiednimi kontrolami i rygorystyczną analizą statystyczną). Autorka powinna wystrzegać się predefiniowanych konkluzji (powtórzonych dodatkowo w dyskusji) które mają słabe (lub żadne) odzwierciedlenie w przedstawionych danych (np. utrzymywanie w mieszaninie peptydu dla którego nie ma dowodu na wpływ na aktywność, czy dodatek HtrA który ewidentnie zwiększa aktywność, jednak nie ma dowodu czy jest to wynikiem specyficznego oddziaływania z SecA). Są to kalki z prac nad aktywnością SecA w *E. coli*, tam jednak stymulacja jest rzędu 10-80x (dyskusja, strona 165) i zakładam, że wskazują na to dane eksperymentalne zawierające odpowiednie kontrole. Konkluzją tej części pracy jest wskazanie, że przy braku znaczących różnic strukturalnych dwie muteiny (C841Y oraz C852Y) wykazują podwyższoną aktywność (V_{max}) przy zachowanym powinowactwie do ATP (K_m). Efekty te są zauważalne jednak nie przekraczają nawet dwukrotnej zmiany.

Druga część wyników analizuje wpływ mutacji SecA na fenotyp *H. pylori*. Z uwagi na budowę operonu (nachodzenie na siebie genów *secA* i *lolF*) konstrukcja szczepów zawierających mutację stanowiła wyzwanie. W pierwszym podejściu testowane rozwiązanie przyniosło polarny efekt na ekspresję *lolF*. Dużym plusem jest, iż autorka bada efekt polarny i po jego zauważeniu konkluduje, iż skonstruowane szczepy nie nadają się do testowania wpływu mutacji punktowych w *secA* na fizjologię *H. pylori*. Niestety, pośpiech i nierzetelność często prowadzą do ukrywania (celowego niepokazywania lub braku analizy) tego typu efektów, tym samym prowadząc do nieadekwatnych konkluzji. Drugie podejście, w którym przywracano funkcję HtrA w spontanicznie powstałych mutantach *secA* okazało się bardziej obiecujące. Wpływ mutacji na produkcję białka SecA był ..., no właśnie – w tekście określony jako nieistotny statystycznie (strona 135) a na rysunku 28C wydaje się być istotny (w legendzie opis istotności statystycznych, na rysunku brak odpowiednich symboli). Następnie autorka przygotowała szczepy z komplementacją – tutaj ponownie daje o sobie znać problem z manipulacją operonu *sec/lol*. Czy nie dałoby się zastępować całego tego operonu w miejscu jego naturalnego występowania w genomie? Pozwoliłoby to na znacznie „czystsze” planowanie eksperymentów. Komplementacja w postaci dodawania drugiej kopii genu jest pewnym rozwiązaniem, niekoniecznie jednak optymalnym. Problematyczność tego podejścia pokazują dobrze obserwowane zmiany ekspresji *lolF*. Ponownie należy podkreślić rzetelne podejście autorki – mimo dużego nakładu pracy włożonej w produkcję szczepów konkluduje ona, iż szczepy te nie są odpowiednie do dalszych analiz z uwagi na wpływ komplementacji na ekspresję genów trzecich. Istotne także, iż autorka podjęła sekwencjonowanie całych genomów szczepów z mutacjami które wykazało, iż rzeczywiście mutacje *secA* są odpowiedzialne za kompensację aktywności HtrA, a nie są tylko jednym z efektów obserwowanych przy inaktywacji HtrA.

W trzeciej części pracy autorka bada wpływ mutacji SecA na fizjologię komórki. Autorka pokazuje, iż mutacje w C-końcowej części SecA wpływają na autoaglutynację (co pośrednio wskazuje na modyfikację powierzchni komórki). Efekty są niewielkie, choć statystycznie istotne. Występują też pewne różnice we wrażliwości na SDS w badaniach półilościowych. Są one jednak na tyle niewielkie, że bez badań ilościowych i analizy statystycznej trudno określić istotność tej obserwacji. Szczepy z mutacjami wykazują nieznacznie zmniejszoną wrażliwość na tetracyklinę, efekt ten jednak z ledwością osiąga istotność statystyczną. W dyskusji autorka próbuje wskazywać na potencjalne mechanizmy, nie prowadzi jednak żadnych eksperymentów na potwierdzenie tych przypuszczeń. Pewne zmiany zaobserwowano również w zdolności do sekrecji γ -glutamylotransferazy (gGT), stanowiącej marker aktywności systemu Sec, jednak zmiany te nie osiągnęły istotności statystycznej. Co istotne – eksperyment ten wykazał, iż mutacje w C-końcowej części SecA nie powodują zmniejszenia translokacji substratów SecA. Ciekawa byłaby tutaj analiza poziomu translokacji HtrA, nie została ona jednak podjęta. Obserwowano istotny statystycznie wpływ mutacji SecA na transkrypcję *cagA*, jednak efekt ten nie był obserwowalny na poziomie białka.

W czwartej części pracy analizowano wpływ czynników stresowych na ekspresję elementów translokonu Sec. Odpowiedź bakterii na różne czynniki stresogenne mierzona poziomem transkryptów elementów translokonu Sec była zróżnicowana, a niektóre z obserwowanych efektów były znaczące. Gen *secY* był najbardziej podatny na represję.

Podsumowując, autorka wychodzi od bardzo ciekawej obserwacji, iż inaktywacja HtrA w *H. pylori* jest możliwa jedynie przy kompensacyjnych mutacjach w C-terminalnej części SecA. Zadaje oczywiste w tym przypadku pytanie, tj. jaki jest efekt tych mutacji w szczepach z aktywnym HtrA. Uzyskanie odpowiedzi nie jest jednak proste. Uzyskanie odpowiednich szczepów okazuje się wyzwaniem, a gdy w końcu udaje się pokonać tą przeszkodę techniczną, fenotyp szczepów nie manifestuje się wyraźnie w analizowanym zakresie. Szkoda, że autorka nie zbadala np. proteomu błony zewnętrznej i peryplazmy. Być może zmiany składu ilościowego pozwoliłyby rozwikłać wpływ mutacji w C-końcowej domenie SecA. Badania te są zapewne w planach, jednak na tą chwilę hipoteza zmienionej aktywności translokacyjnej nie znajduje potwierdzenia w przedstawionych danych. Praca opisuje efekty szeregu podjętych poszukiwań, niestety brak jednoznacznej konkluzji co do roli mutacji w C-końcowej domenie SecA na tolerancję na inaktywację HtrA lub ogólnie fenotypu tych mutacji. Kwestia ta pozostaje więc otwarta pomimo dużego nakładu pracy włożonego w próbę jej rozwikłania.

Poza pytaniami zawartymi w tekście powyżej, proszę dodatkowo o przeanalizowanie następującego zagadnienia: Autorka wielokrotnie wskazuje, iż niewielki procent homologii białek (np. między *E. coli*

i *H. pylori*) wskazuje na potencjalnie odmienne funkcje tych białek (lub bardziej ogólnie, na różnice zaangażowanych mechanizmów). Wiadomo jednak, iż szereg białek nie wykazujących praktycznie żadnej homologii sekwencji posiada analogiczne struktury i funkcje. Proszę o analizę tego typu powiązań homologii sekwencji, analogii strukturalnych i funkcji białek oraz o odpowiedź na pytanie czy niewielki procent homologii to już podstawa do przypuszczalnej różnej funkcji. Z mojego doświadczenia wynika, że identyczność sekwencji na poziomie ~30% to bardzo duża homologia, wskazująca prawie zawsze na identyczną funkcję, podczas gdy autorka sugeruje, iż to niewielka homologia (np. strona 44 czwarty paragraf, ale też szereg innych miejsc). Definicja, co uważamy za wielkie lub niewielkie jest subiektywna, może więc warto byłoby ją określić bardziej obiektywnie, np. przez statystyczną analizę jaki poziom homologii daje jeszcze znaczące podobieństwo funkcji. Ponadto, przy bogactwie dostępnych danych sekwencyjnych, często znacznie lepszym sposobem identyfikacji podobieństw funkcjonalnych jest analiza homologii w dużych grupach genów w miejsce arbitralnej selekcji dwóch gatunków.

Kolejna uwaga dotyczy definicji pojęć i spójności przekazu. Autorka wielokrotnie wzmiankuje badanie „wydajności funkcjonowania translokonu SEC”. Nie definiuje jednak co rozumie pod tym pojęciem, a dalej nie prowadzi praktycznie eksperymentów które mogłyby zmierzyć tą właściwość (jakkolwiek nie byłaby zdefiniowana). Czy wydajność translokonu to ogólna zdolność do sekrecji zróżnicowanej puli białek? Ale wtedy musiałaby rosnąć/maleć także produkcja tych białek. Czy wydajność to szybkość transportu pojedynczego białka (wtedy przy stałym poziomie produkcji białek powinna maleć ilość translokonu Sec). Jeśli tak, to którego białka – być może domena C-terminalna moduluje szybkość transportu tylko niektórych białek. Itd. Bez dobrej definicji problemu trudno zaplanować odpowiednie eksperymenty.

Pomimo powyższych uwag, praca jest przygotowana niezwykle starannie, co jak na takie obszerne opracowanie jest osiągnięciem wartym podkreślenia. Jednocześnie jest dla mnie zbyt długa. Zdaję sobie sprawę z przyjętej formy zwyczajowej, jednak uważam, iż powinniśmy raczej dążyć do przedstawiania skondensowanej esencji, szczególnie w czasach zalewu wszelkiego rodzaju informacją. Praca nie zawiera znaczących elementów nadmiarowych, a jednak w moim odczuciu byłaby jeszcze ciekawsza, gdyby udało się informację w niej zawartą zmieścić na ~120 w miejsce 191 stron. To subiektywna opinia, nie mająca wpływu na wysoką ocenę rozprawy.

Ponadto, z całością rzetelnie przygotowanej rozprawy kontrastuje zdanie: „Aktywność ATPazy oczyszczonych preparatów SecA *E. coli* (aktywność spoczynkowa) jest nieduża.” Tego typu nieprecyzyjne sformułowanie nie pasuje do literatury naukowej. Potaję ten przykład jako element

bardziej humorystyczny, jedno z niewielu potknięć w długiej i dobrze przygotowanej pracy, autorka powinna jednak wystrzegać się tego typu nienaukowych stwierdzeń w przyszłych opracowaniach.

Według mojej oceny wyniki przedstawione w rozprawie uzasadniają nadanie kandydatce stopnia naukowego doktora. Rozprawa doktorska mgr Patrycji Ambroziak spełnia normy zwyczajowe i prawne, w tym odpowiada wymaganiom określonym w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Dlatego **wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Ambroziak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

prof. dr hab. Grzegorz Dubin

Kierownik Grupy Badawczej Krystalografii Białek

p.o. Dyrektor MCB UJ