



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii
dr hab. Agnieszka Wyszyńska



Warszawa, 12 stycznia 2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Ambroziak, pt.

„Translokon SEC jako mediator odpowiedzi komórki na zaburzenie pozacytoplazmatycznej homeostazy u bakterii *Helicobacter pylori*”

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

pod kierunkiem

Promotor: prof. dr hab. Joanna Skórko-Glonek

Promotor pomocniczy: dr inż. Donata Figaj

System SEC jest podstawowym systemem sekrecji białek u bakterii i odgrywa kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórki, uczestnicząc w biogenezie błon, tworzeniu struktur powierzchniowych oraz utrzymaniu homeostazy białkowej w przestrzeni pozacytoplazmatycznej. Choć mechanizm działania tego systemu został szczegółowo scharakteryzowany u modelowej *Escherichia coli*, znacznie mniej wiadomo o jego funkcjonowaniu u bakterii o odmiennych wymaganiach ekologicznych i fizjologicznych, którą jest *Helicobacter pylori*. Jest to gatunek o zredukowanym zestawie białek pomocniczych, a jego mechanizmy adaptacyjne są silnie zależne od sprawnego działania systemów eksportu białek.

Przedstawione w rozprawie badania koncentrują się na jednym z kluczowych elementów bakteryjnego aparatu sekrecyjnego — białku SecA, pełniącym centralną rolę w funkcjonowaniu systemu SEC odpowiedzialnego za eksport białek poza cytoplazmę. Impulsem do ich podjęcia była obserwacja, że w szczepach *H. pylori* z mutacją w genie *htrA*, kodującym jeden z głównych czynników wirulencji i zarazem element pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości białek, pojawiają się mutacje w C-końcowym fragmencie białka SecA. Co istotne, uzyskane wyniki wskazywały, że obecność mutacji w SecA jest warunkiem koniecznym do wprowadzenia mutacji w genie *htrA*, co sugeruje istnienie funkcjonalnej zależności pomiędzy tymi dwoma elementami. Zasadne stało się więc ustalenie, czy skutkiem mutacji w białku SecA jest modyfikacja efektywności działania poszczególnych komponentów systemu SEC czy też modulacja składu kompleksu translokonowego. Problem ten wyznacza główny cel naukowy rozprawy, jasno sformułowany i konsekwentnie realizowany w jej kolejnych częściach.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim w formie spójnego tematycznie opracowania. Liczy ona 191 stron i została opatrzona 47 rycinami i 38 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*, *Cel pracy*, *Materiały*, *Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Podsumowanie* oraz spis cytowanej literatury. W pracy zamieszczono także *Wykaz stosowanych skrótów* oraz informację na

temat źródła finansowania badań. Przejrzysta narracja oraz logiczna struktura pracy ułatwiają czytelnikowi śledzenie realizacji założonych celów oraz analizę uzyskanych wyników.

Z obowiązku recenzenta muszę zaznaczyć, że w rozprawie występują pewne uchybienia natury redakcyjnej i językowej. Obejmują one m.in. (a) błędy interpunkcyjne (str. 17, 36, 39, 118, 141), (b) błędy literowe (np. *gluczorakorak* - str. 38; *beart* - str. 14), oraz (c) niedociągnięcia redakcyjne, takie jak nieprawidłowe odnośniki do rozdziałów i podrozdziałów (str. 104, 107). W tekście pojawiają się też pojedyncze niezręczne sformułowania, np.: „omijając peryplazmę” (str. 17); „nie jest wiadome” (str. 40).

Do innych przykładowych niedociągnięć należą:

- str. 30 – sformułowanie „...jest uważane za atrakcyjny obiekt badań nad lekami przeciwbakteryjnymi...” – w tym kontekście trafniejsze byłoby użycie słowa *cel*, które lepiej oddaje sens badań farmakologicznych;

- str. 30 – zdanie „...Białko SecA nie zostało zidentyfikowane u eukariontów, z wyjątkiem chloroplastów, które posiadają homolog SecA ze względu na ich ewolucyjne pochodzenie...” jest sformułowane w sposób nie do końca jasny i wymaga przeformułowania, np.: *Białko SecA nie zostało zidentyfikowane u eukariontów, z wyjątkiem chloroplastów, które - ze względu na swoje ewolucyjne pochodzenie - posiadają homolog SecA.*

- str. 31 – stwierdzenie „...HSD jest długą domeną α -helikalną, która łączy wszystkie pozostałe domeny SecA...” można zastąpić bardziej precyzyjnym opisem, wskazującym, że HSD jest długą domeną α -helikalną, wokół której zorganizowane są pozostałe domeny SecA, a tym samym pełni funkcję platformy strukturalnej odpowiedzialnej za utrzymanie prawidłowej architektury SecA.

W tekście pojawiają się też kilka anglicyzmów, np. „...Białka, których ostateczną destynacją...” (str. 18); „...kompetycja między bakteriami...” (str. 20). Warto, o ile to możliwe, zastępować je odpowiednikami lepiej wpisującymi się w normy języka polskiego. Należy jednak podkreślić, że są to drobne potknięcia typowe dla obszernych opracowań, które nie zakłócają merytorycznego odbioru pracy ani nie wpływają na jej zrozumiałość.

Ocena poszczególnych części rozprawy

Rozdział *Wstęp* został przygotowany w oparciu o bogaty i starannie dobrany zestaw pozycji literaturowych, obejmujący zarówno prace przeglądowe, jak i oryginalne publikacje badawcze. Znaczący udział publikacji z ostatnich lat świadczy o uwzględnieniu aktualnego stanu wiedzy. *Wstęp*, liczący 30 stron, został podzielony na siedem merytorycznie równorzędnych podrozdziałów. Doktorantka omówiła systemy sekrecji białek u bakterii Gram-ujemnych, kładąc szczególny nacisk na systemy dwuetapowe oraz mechanizm sekrecji i transportu lipoprotein, których funkcjonowanie jest ściśle powiązane z prawidłowym działaniem systemu SEC. Następnie przedstawiła proces translokacji białek zależny od systemu SEC, po czym szczegółowo omówiła strukturę, właściwości oraz mechanizm działania białka SecA – kluczowego elementu dalszych analiz. Kolejna część wstępu poświęcona została mechanizmowi regulacji ekspresji genów kodujących komponenty translokonu SEC. Rozdział zamyka syntetyczne omówienie biologii *Helicobacter pylori* ze szczególnym uwzględnieniem funkcjonowania systemu SEC, systemu Lol oraz mechanizmów odpowiedzi na stres i pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości białek u tego gatunku.

Przy opisie mechanizmu działania białka SecA Doktorantka odwołuje się przede wszystkim do koncepcji power-stroke. Warto jednak zaznaczyć, że w literaturze pojawiły się nowsze badania, w tym praca wykorzystująca technikę HS-AFM (high-speed atomic force microscopy, Kanaoka, 2025), które dostarczają pierwszych bezpośrednich danych dotyczących zmian konformacyjnych

SecA zachodzących podczas translokacji białek. Uwzględnienie tych doniesień pozwoliłoby pełniej przedstawić aktualny stan wiedzy w tym zakresie.

W tekście występują również nieliczne uchybienia merytoryczne wymagające korekty. Na stronie 22 elastaza LasB oraz egzotoksyna A zostały przedstawione jako enzymy kluczowe dla patogenyzy mukowiscydozy, podczas gdy są to ogólne czynniki wirulencji *Pseudomonas aeruginosa*, uczestniczące w kolonizacji, modulacji odpowiedzi immunologicznej oraz uszkodzaniu tkanek w różnych typach zakażeń, a nie wyłącznie w przebiegu mukowiscydozy. Na stronie 23 w opisie biogenezy autotransporterów błędnie umiejscowiono system Sec w błonie zewnętrznej. Z kolei na stronie 25 pojęcie Bacteroidetes zostało nieprawidłowo określone jako rodzaj, mimo że jest to typ bakterii.

Pomijając wskazane drobne uwagi, rozdział Wstęp został przygotowany na bardzo dobrym poziomie merytorycznym i stylistycznym. Jego treść w sposób logiczny i konsekwentny prowadzi czytelnika do jasno sformułowanego *Celu naukowego*, umożliwiając zrozumienie biologicznego znaczenia badanych cząsteczek oraz uzasadniając podjęcie przedstawionych badań.

W kolejnych dwóch rozdziałach rozprawy przedstawiono zastosowane materiały oraz metody badawcze. Rozdziały te zostały opracowane w sposób rzetelny i spójny, a poszczególne etapy badań Doktorantka opisała na tyle szczegółowo, że umożliwiają ich odtworzenie wyłącznie na podstawie zawartych informacji. W ramach uwag redakcyjnych warto zwrócić uwagę na sposób zapisu fenotypów oporności na antybiotyki. Zgodnie z przyjętymi zasadami, oporność determinowana przez geny plazmidowe oznaczana jest kodem dwuliterowym (np. Ap^R), natomiast w przypadku genów chromosomowych stosuje się zapis trzyliterowy (np. Amp^R). Reguła ta nie została zastosowana przy opisie fenotypów plazmidów i szczepów bakteryjnych (str. 58-60). Określenia „starter przedni” i „starter wsteczny” są zrozumiałe i spotykane w praktyce laboratoryjnej, w literaturze naukowej częściej stosuje się jednak ustalone nazewnictwo *forward* i *reverse*. W tym przypadku ich użycie wynika z przyjętej konwencji terminologicznej, a nie z nieuzasadnionego stosowania anglicyzmów.

Wyniki przedstawiono na 52 stronach rozprawy. Tworzą one logiczny ciąg przyczynowo-skutkowy, dzięki czemu tok rozumowania Doktorantki jest łatwy do prześledzenia. W badaniach został wykorzystany bogaty zestaw metod z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej, genetyki, biochemii, biofizyki oraz inżynierii białek. Dobór metod był adekwatny do realizowanych zadań, co wskazuje na bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego oraz umiejętność jego właściwego zastosowania. Na podkreślenie zasługuje również krytyczna ocena stosowanych podejść metodologicznych. Sposób prezentacji wyników nie budzi zastrzeżeń.

Prace rozpoczęto od biochemicznej charakterystyki białka SecA *H. pylori* oraz pięciu jego wariantów zawierających mutacje w rejonie C-końcowym. W tym celu białka zostały oczyszczone, a następnie wykorzystane do analizy stabilności termicznej metodą dichroizmu kołowego oraz do oceny stopnia oligomeryzacji z zastosowaniem ultrawiwiania analitycznego. Wyniki tej części pracy wskazują, że substytucje w rejonie C-końcowym SecA nie powodują istotnych zmian strukturze II-rzędowej białka, natomiast w zróżnicowanym stopniu oddziałują na jego stabilność termiczną. Badane mutacje nie wpływają także znacząco na strukturę IV rzędową SecA, jednak zaobserwowano, że zmiany zaburzające rejon wiązania metalu prowadziły do niewielkich różnic w proporcjach pomiędzy poszczególnymi formami oligomerycznymi.

Doktorantka wykazała ponadto, że mutacje w C-końcowym fragmencie SecA nie wpływają na zdolność tego białka do wiązania się z liposomami utworzonymi na bazie lipidów *E. coli*, wykorzystanymi jako model błony biologicznej, natomiast wywierają zróżnicowany wpływ na jego aktywność enzymatyczną. Dwa z analizowanych mutantów (C841Y oraz C852Y) wykazywały wyraźnie zwiększone tempo hydrolizy ATP w porównaniu z białkiem typu dzikiego. W kontekście tego ostatniego eksperymentu zasadne wydaje się uzupełnienie pracy o krótkie wyjaśnienie przyczyny zastosowania oddzielnie sekwencji sygnałnej oraz białka-substratu pozbawionego własnej sekwencji sygnałnej, zamiast wykorzystania białka zawierającego natywną sekwencją sygnałną.

W kolejnym etapie badań oceniono wpływ mutacji białka SecA na cechy fenotypowe *H. pylori*. Realizacja tego etapu wymagała skonstruowania szczepów *H. pylori* zawierających mutacje punktowe w rejonie genu *secA* kodującym C-końcowy fragment białka, co okazało się zadaniem technicznie wymagającym. W pierwszych uzyskanych szczepach wprowadzone mutacje zaburzały prawidłowe funkcjonowanie operonu *secA-lolF*, co wykluczyło ich wykorzystanie w dalszych analizach. Doktorantka poradziła sobie jednak z tym problemem, decydując się na wykorzystanie wcześniej scharakteryzowanych szczepów z mutacją genu *htrA*, w których następnie przywróciła dziki wariant tego genu. Zastosowane rozwiązanie pozwoliło na kontynuację badań, choć jednocześnie ograniczyło je do trzech mutantów. Niepowodzeniem zakończyły się również próby uzyskania odpowiednich plazmidowych komplementantów, gdyż obecność dodatkowej kopii genu *secA* prowadziła do zaburzeń w regulacji ekspresji genu *lolF*.

Biorąc pod uwagę ograniczenia klasycznej i mutagenyzy w obrębie operonu *secA-lolF*, nasuwa się pytanie, czy istnieje możliwość wykorzystania alternatywnych, bardziej precyzyjnych metod wprowadzania mutacji punktowych w komórkach *H. pylori*, takich jak systemy CRISPR-Cas? Interesującym kierunkiem dalszych badań byłoby również sprawdzenie, czy wprowadzanie mutacji w domenę MBP SecA w szczepie innym niż *H. pylori* N6 umożliwiłoby zmutowanie genu *htrA*, co dotychczas się nie udawało. Otrzymanie takiego szczepu stanowiłoby dodatkowy argument przemawiający za istnieniem funkcjonalnego powiązania między tymi białkami. Czy podejmowano próby w tym kierunku?

W dalszej części pracy Doktorantka oceniła wpływ mutacji w białku SecA na integralność błony komórkowej (analiza autoagregacji oraz wrażliwości na SDS i wybrane antybiotyki), ponadto zbadała ich oddziaływanie na proces translokacji białek, oznaczając aktywność wydzielonej gamma-glutamylotransferazy. Najbardziej wyraźne, choć nadal umiarkowane, zmiany zaobserwowano w przypadku mutantów cysteinowych, potencjalnie zaburzających wiązanie metalu. Szczepy te wykazywały obniżoną zdolność do autoagregacji oraz zmniejszoną wrażliwość na tetracyklinę w porównaniu ze szczepem typu dzikiego. Doktorantka przeanalizowała również wpływ mutacji w białku SecA na poziom ekspresji genu *cagA* kodującego kluczowy czynnik wirulencji *H. pylori*. Nie jest jednak dla mnie jasne, z jakiego powodu założono, że mutacje w białku SecA mogą wpływać na poziom ekspresji genu *cagA*. W moim odczuciu nie przedstawiono wystarczającego uzasadnienia biologicznego dla takiej zależności. Chciałabym także uzyskać wyjaśnienie dlaczego w analizach poziomu ekspresji genu *ggt* nie uwzględniono szczepu, który w eksperymencie oceniającym wydajność sekrecji gGT wykazywał wyższą, statystycznie istotną aktywność tego enzymu.

W końcowym etapie badań analizowano w jakim stopniu czynniki stresogenne uszkadzające błony komórkowe i indukujące stres peryplazmatyczny wpływają na ekspresję genów kodujących główne składniki translokonu SEC. Zaobserwowano, że zmiany te dotyczą przede wszystkim genów kodujących białka tworzące kanał translokacyjny SecYEG w błonie cytoplazmatycznej, przy czym ich charakter różni się w zależności od zastosowanego czynnika stresowego, co najprawdopodobniej wynika z odmiennych mechanizmów ich działania.

W tym kontekście nasuwa się pytanie, czy rozważano uzupełnienie przeprowadzonych analiz o warunki stresowe możliwie najwierniej odzwierciedlające zaburzenia pozacytoplazmatycznej kontroli jakości białek obserwowane przy braku HtrA. Być może zastosowanie modelu stresu imitującego defekt funkcji HtrA, np. przez zaburzenie systemu Dsb lub inne podejścia prowadzące do akumulacji źle sfałdowanych białek w peryplazmie, mogłoby pozwolić na pełniejszą ocenę wpływu tego stresu na regulację ekspresji komponentów translokonu SEC oraz lepsze powiązanie uzyskanych wyników a obserwowaną zależnością funkcjonalną pomiędzy białkami SecA i HtrA.

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób rzetelny i przejrzysty, a ryciny są czytelne i poprawnie opisane. Z obowiązku recenzenta muszę jednak zwrócić uwagę na kilka nieścisłości. Na rycinie 6 i w tekście na str. 108 znacznik His opisano jako umieszczony na N-końcu białka SecA, podczas gdy w opisie konstruktu (str. 104) wskazano jego lokalizację na końcu 3' genu, co skutkuje niespójnym przedstawieniem tej samej konstrukcji. Podobna nieścisłość, polegająca na myleniu końca 5' genu z końcem 3' pojawia się na również na str. 131. Ponadto w kilku miejscach pracy (str. 106, 127) użyto określenia „rejon C-końcowy genu”, które jest sformułowaniem nieprawidłowym i najprawdopodobniej stanowi skrót myślowy. Na tym etapie pracy tego typu nieścisłości terminologiczne nie powinny się już pojawiać i wymagają korekty. Dodatkowo w podpisie do ryc. 40 pojawia się nazwa szczepu, dla którego nie przeprowadzono omawianej analizy.

Dyskusja rozprawy, licząca 18 stron, jest interesująca i rzeczowa. Doktorantka odnosi się do najważniejszych obserwacji i wątków poruszanych w pracy, właściwie osadzając uzyskane wyniki w szerszym kontekście. Interpretacja danych jest przemyślana i świadczy o dobrym zrozumieniu omawianych zagadnień. Dyskusja została poprowadzona na tle istotnych i prawidłowo dobranych publikacji naukowych, co pozwala na rzetelne porównanie własnych wyników z danymi literaturowymi oraz podkreślenie ich znaczenia i oryginalności. Na podstawie uzyskanych rezultatów Autorka sformułowała wnioski końcowe, które uważam za merytorycznie poprawne. Rozprawę zamyka bardzo obszerny spis pozycji bibliograficznych.

Podsumowując, badania przedstawione w recenzowanej rozprawie zostały przeprowadzone z wykorzystaniem właściwie dobranych metod, a sama rozprawa stanowi spójną merytorycznie całość. Uzyskane wyniki znacząco poszerzają aktualny stan wiedzy na temat funkcjonowania systemu SEC u *H. pylori*. Istotnym osiągnięciem pracy jest również szczegółowa charakterystyka biochemiczna białka SecA *H. pylori* oraz jego porównanie z dobrze scharakteryzowanym białkiem SecA *E. coli*.

W mojej ocenie recenzowana rozprawa doktorska w pełni spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i dlatego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Ambroziak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

