

16.01.2026

Dr hab. Stanisław Dunin-Horkawicz  
Instytut Biologii Ewolucyjnej  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Warszawski

Recenzja rozprawy doktorskiej  
Pani mgr **Marianny Krysińskiej**  
Pt. *Ewolucja domen ADP-rybozylotransferaz i kinaz oraz bioinformatyczne  
poszukiwanie nowych rodzin*

**Aspekty formalne.** Recenzję sporządzono na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych SGGW w Warszawie z dnia 30.10.2025 (6/NB-2025/2026), zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571) oraz przepisami wewnętrznymi SGGW. Recenzję przygotowano w oparciu o art. 187 PSWiN oraz Regulamin SGGW – Załącznik nr 3.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Marianny Krysińskiej pt. „Ewolucja domen ADP-rybozylotransferaz i kinaz oraz bioinformatyczne poszukiwanie nowych rodzin”, **w dyscyplinie nauki biologiczne**, została przygotowana w Instytucie Biologii SGGW w Warszawie **w formie rozprawy opartej o cykl trzech publikacji**. Praca powstała pod kierunkiem dr. hab. Krzysztofa Pawłowskiego (University of Texas Southwestern Medical Center; Howard Hughes Medical Institute, Dallas, USA), a promotorem pomocniczym była dr hab. Małgorzata Dudkiewicz (Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Instytut Biologii, SGGW). Badania stanowiące podstawę rozprawy były współfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektów nr 2019/33/B/NZ2/01409 oraz 2023/49/N/NZ2/03440.

Rozprawa zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, a także jednoznacznie sformułowany cel i hipotezę badawczą, opis danych i metod, syntetyczne omówienie publikacji, wnioski oraz bibliografię. Załączono pełne teksty trzech publikacji wchodzących w skład cyklu wraz z oświadczeniami współautorów, co pozwala na ocenę wkładu własnego.

**Cel i zakres pracy.** Przedmiotem rozprawy, przygotowanej w formie cyklu trzech publikacji, jest bioinformatyczna **identyfikacja i charakterystyka domen ADP-rybozylotransferaz (ART) oraz domen kinazowych w kontekście patogenezy bakterii z rodzaju *Legionella***. Motywacją do podjęcia badań jest to, że zarówno ADP-rybozylotransferazy, jak i kinazy należą do enzymów wykorzystywanych przez *Legionella* jako efekторы, czyli białka wprowadzane do komórki eukariotycznego gospodarza w trakcie infekcji w celu modyfikowania jego procesów komórkowych; ich rozpoznanie i charakterystyka są więc istotne dla zrozumienia mechanizmów patogenezy. Analiza tych domen stanowiła jednocześnie **istotne wyzwanie metodologiczne**, ponieważ ich duża dywergencja powoduje, że homologiczne białka często wykazują poniżej 10% identyczności sekwencji (tzw. *twilight zone*), co utrudnia ich

identyfikację i klasyfikację w oparciu wyłącznie o porównania sekwencji. W pracy postawiono pytania o repertuar i zróżnicowanie domen ART w panproteomie *Legionella*, o istnienie dodatkowych, dotąd nieopisanych rodzin ART-podobnych oraz o skład i zróżnicowanie domen kinazowych *Legionella*. Dwie publikacje (1 i 3 w wykazie) dotyczą bezpośrednio *Legionella*, natomiast trzecia (2 w wykazie) jest skoncentrowana na nowej rodzinie eukariotycznej białek ART-podobnych i stanowi uzupełnienie wątku ADP-rybozylacji oraz poszukiwania odległych homologów.

**Materiały i metody.** Autorka wyróżniła dwa równoległe podejścia do wykrywania odległych homologów domen enzymatycznych: standardowe (4.1) i alternatywne (4.2). Podejście standardowe oparto o sprawdzone, aktualne metody sekwencyjne do wykrywania homologii (FFAS/HHpred), uzupełnione o nowoczesne narzędzia predykcji i porównań struktur białek (AlphaFold2/RoseTTAFold) oraz analizy pomocnicze (m.in. klasteryzację sekwencji, analizę konserwacji, analizę kontekstu genomowego, filogenezę). **Uwzględnienie informacji strukturalnej było istotne dla potwierdzania i doprecyzowania wyników uzyskanych na podstawie porównań sekwencji**, zwłaszcza w przypadku bardzo odległych homologów. W podejściu alternatywnym (4.2), zastosowanym m.in. do poszukiwań domen ART, punktem wyjścia były referencyjne struktury ART, które wykorzystano do przeszukania zbioru modeli struktur rodzin Pfam (modele trRosetta/RoseTTAFold) z użyciem porównań strukturalnych (TM-align); uzyskane trafienia weryfikowano następnie narzędziami sekwencyjnymi ze ścieżki standardowej. Wyniki analiz zostały uporządkowane i udostępnione w dwóch publicznych bazach online opracowanych w ramach rozprawy: astARTE (ART) <http://bioinfo.sggw.edu.pl/astarte/> oraz Kintaro (kinazy) <http://bioinfo.sggw.edu.pl/kintaro/>.

**Części składowe rozprawy.** W skład rozprawy wchodzi trzy publikacje:

1. **Krysińska M**, Gradowski M, Baranowski B, Pawłowski K, Dudkiewicz M. A survey of ADP-ribosyltransferase families in the pathogenic *Legionella*. BMC Genomics. 2025 Oct 14;26(1):915. doi: 10.1186/s12864-025-11994-z.
2. Wyżewski Z, Gradowski M, **Krysińska M**, Dudkiewicz M, Pawłowski K. A novel predicted ADP-ribosyltransferase-like family conserved in eukaryotic evolution. PeerJ. 2021 Mar 10;9:e11051. doi: 10.7717/peerj.11051.
3. **Krysińska M**, Baranowski B, Deszcz B, Pawłowski K, Gradowski M. Pan-kinome of *Legionella* expanded by a bioinformatics survey. Sci Rep. 2022 Dec 16;12(1):21782. doi: 10.1038/s41598-022-26109-x.

Poza trzema publikacjami rozprawa zawiera sekcje porządkujące kontekst oraz cel badań (sekcje 1–3), opis przyjętej metodyki (sekcja 4) oraz syntetyczne omówienie publikacji i wspólne wnioski (sekcje 5–6). W całym cyklu stosowano zasadniczo jednolite podejście (bioinformatyczne wykrywanie i charakterystyka odległych homologów z wykorzystaniem metod sekwencyjnych oraz analiz strukturalnych), przy czym publikacja 2 ma charakter uzupełniający względem prac dotyczących *Legionella*.

**Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy.** Przedstawione publikacje łączą wspólny problem badawczy oraz spójną metodykę: identyfikacja i charakterystyka bardzo odległych homologów domen enzymatycznych z wykorzystaniem czułych metod sekwencyjnych wspartych analizą struktury białek, co jest szczególnie istotne przy dużej dywergencji sekwencji. Dwie prace (1 i 3) odnoszą tę metodykę do patogenezy bakterii z rodzaju *Legionella*, porządkując repertuar dwóch klas domen efektorowych: ADP-rybozylotransferaz oraz kinaz. Trzecia praca stanowi uzupełnienie wątku o ADP-rybozylacji poprzez opis nowej rodziny ART-podobnej konserwowanej u eukariontów, w tym u człowieka.

**Omówienie publikacji 1** (*A survey of ADP-ribosyltransferase families in the pathogenic Legionella*). W pracy przeprowadzono poszukiwanie domen ADP-rybozylotransferaz w proteomach 41 gatunków rodzaju *Legionella*, z wykorzystaniem metod sekwencyjnych do wykrywania odległej homologii, wspartych modelowaniem struktury (w tym analizą wiązania NAD<sup>+</sup>) oraz porównaniami struktur białek. Struktury wykorzystano do potwierdzania przynależności zidentyfikowanych kandydatów do nadrodziny ART; niezależnie wykonano także *screening* strukturalny (podejście „alternatywne” zdefiniowane przez doktorantkę), w którym referencyjne struktury ART porównano z modelami struktur rodzin Pfam, co **pozwoiliło przypisać rodzinę DUF4291 do nadrodziny ART mimo braku jednoznacznego sygnału sekwencyjnego**. Celem było zidentyfikowanie i sklasyfikowanie rodzin ART-podobnych, w tym rodzin potencjalnie związanych z patogenezą oraz białek o cechach efektorowych. W wyniku analiz wytypowano 63 białka o istotnym podobieństwie do ART, pogrupowane w 39 rodzin, w tym 26 nowych. Dodatkowym źródłem argumentów funkcjonalnych jest analiza sąsiedztwa genomowego: dla DUF4291 pozwoliło to na powiązanie tej rodziny z modułami genowymi związanymi z ADP-rybozylacją i procesami zależnymi od RNA. Wyniki udostępniono *online* w bazie astARTE (<http://bioinfo.sggw.edu.pl/astarte/>).

**Omówienie publikacji 2** (*A novel predicted ADP-ribosyltransferase-like family conserved in eukaryotic evolution*). W pracy **zidentyfikowano nową, konserwowaną u eukariontów rodzinę domen ART-podobnych, z człowiekiem jako jednym z przedstawicieli (białko LRRC9)**. Analizy oparto przede wszystkim o „standardowe” podejście sekwencyjne do wykrywania odległej homologii (m.in. FFAS03, HHpred), uzupełnione modelowaniem i analizą struktury domeny oraz oceną konserwacji kluczowych motywów potencjalnego miejsca aktywnego (nie stosowano tu podejścia „alternatywnego” w sensie strukturalnego *screeningu* na dużych zbiorach modeli). Wykazano, że zidentyfikowana domena ART-podobna jest osadzona pomiędzy domenami LRR, co sugeruje jej **możliwe powiązanie z mechanizmami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej** (przy czym argument ma charakter analogii wynikającej z obecności domen LRR i nie stanowi rozstrzygającego dowodu funkcjonalnego). Co więcej wykazano, że układ i konserwacja reszt w potencjalnym miejscu aktywnym istotnie odbiegają od typowych enzymów ART, co doprowadziło do hipotezy o funkcji pseudoenzymatycznej, tj. braku typowej aktywności transferazy ADP-rybozy przy zachowaniu możliwej roli regulacyjnej lub wiążącej.

**Omówienie publikacji 3** (*Pan-kinome of Legionella expanded by a bioinformatics survey*). W pracy wykonano przegląd domen kinazowych kodowanych przez genomy rodzaju *Legionella* w kontekście ich roli w patogenezie jako białek efektorowych translokowanych do komórki gospodarza. Analizy prowadzono przede wszystkim „standardowym” podejściem sekwencyjnym do wykrywania odległej homologii, uzupełnionym modelowaniem i porównaniami struktur, co było istotne ze względu na nietypowość i dywergencję wielu rodzin. Potencjalny charakter efektorowy kinaz oceniano narzędziami bioinformatycznymi do predykcji sygnałów sekrecji. Warto podkreślić, że w analizie CLANS wiele nowych rodzin lokuje się peryferyjnie względem kinaz eukariotycznych, co autorzy interpretują jako argument przeciw ich niedawnemu pochodzeniu od gospodarza. **W wyniku analiz opisano 13 nowych rodzin kinaz, określonych jako potencjalne efekторы**, oraz zestawiono je z 16 znanymi rodzinami w ramach katalogu online w bazie Kintaro (<http://bioinfo.sggw.edu.pl/kintaro/>). Praca, chociaż skupiająca się na innych domenach (kinazy), jest komplementarna w stosunku do pierwszej publikacji, gdzie proteomy *Legionella* analizowano pod kątem innej klasy potencjalnych efektorów (ADP-rybozylotransferaz).

#### Ocena merytoryczna.

**Wiedza teoretyczna.** Wstęp i podsumowanie, którymi opatrzone są publikacje wchodzące w skład rozprawy, zostały przygotowane sumiennie i w sposób adekwatny wprowadzają do tematyki prac oraz uzasadniają ich podjęcie. Uwagi, które mam, są w większości kosmetyczne, ale dotyczą kilku miejsc, gdzie warto doprecyzować tło teoretyczne. W części 1.2.1 opis struktur drugorzędowych jest dość skrótowy i może sprawiać wrażenie niepełnego; podobnie części 4.1 i 4.2 są zbyt zwarte i brakuje w nich przedstawienia istoty obu podejść, ze szczególnym uwzględnieniem kryteriów przejść między kolejnymi etapami. Ponieważ wszystkie prace przyjmują perspektywę ewolucyjną w identyfikacji i katalogowaniu domen, zwracam uwagę na **brak omówienia pojęć homologii i analogii w kontekście ewolucji białek**. Ma to znaczenie, ponieważ część domen została zidentyfikowana lub potwierdzona jedynie w oparciu o podobieństwo strukturalne przy braku jednoznacznego podobieństwa sekwencyjnego. Przypadki te są w publikacjach opisane rzetelnie, a autorzy przedstawiają dodatkowe przesłanki (konserwacja kluczowych reszt, syntenia/kontekst genomowy), jednak w takich sytuacjach należy pamiętać o teoretycznej możliwości konwergencji (która np. jest przypuszczana w kontekście zwoju Rossmanna). Nie traktuję tego jako istotnego zastrzeżenia do wyników doktorantki, ale kierunek warty zbadania, zwłaszcza jeśli przeszukiwania strukturalne zwróciły przypadki brzegowe, które ostatecznie zostały odrzucone na podstawie innych kryteriów.

**Oryginalność rozwiązania problemu badawczego.** Przedłożona praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego poprzez zastosowanie solidnej i dobrze zaplanowanej metodyki do jasno zdefiniowanego zadania badawczego. Chociaż większość użytych narzędzi to klasyczne metody bioinformatyczne, zostały one połączone w sposób przemyślany i wskazujący na dobre rozumienie istoty problemu wykrywania odległej homologii. Na uwagę

zastępuje także włączenie do analiz najnowszych osiągnięć metodologicznych w zakresie przewidywania struktury białek. Ten element jest istotny dla zwiększenia czułości i wiarygodności identyfikacji, co znajduje odzwierciedlenie w wynikach przedstawionych w publikacjach, w tym w wyodrębnieniu nowych rodzin ART i kinaz. Rezultaty badań stanowią wartość dodaną, a dzięki publikacji w recenzowanych czasopismach mogą stać się punktem wyjścia do dalszej weryfikacji doświadczalnej, także przez inne zespoły.

**Wkład własny oraz samodzielność naukowa doktorantki.** Na podstawie oświadczeń współautorów wkład doktorantki w publikacje 1 i 3 należy ocenić jako wiodący i obejmujący kluczowe elementy pracy badawczej: od współtworzenia koncepcji, przez wykonanie większości analiz obliczeniowych, po opracowanie wyników i przygotowanie manuskryptu. W publikacji 1 doktorantka deklaruje wykonanie zasadniczej części analiz (m.in. wykrywanie odległych homologów, porównania sekwencyjne i strukturalne, modelowanie, analizy sąsiedztwa genomowego) oraz przygotowanie głównej wersji tekstu i materiałów uzupełniających, a oświadczenia pozostałych współautorów wskazują ich udział jako cząstkowy. W publikacji 3 wkład doktorantki obejmuje identyfikację i charakteryzację nowych rodzin, analizy podobieństw sekwencyjnych, analizy taksonomiczne i filogenetyczne oraz przygotowanie roboczych wersji manuskryptu; wkłady współautorów mają charakter uzupełniający. W publikacji 2 doktorantka nie jest pierwszą autorką, a jej udział (zgodnie z oświadczeniem) dotyczy konkretnych analiz (architektura domenowa LRRC9, podobieństwa strukturalne, analizy filogenetyczne oraz przygotowanie rysunków i tabel), co należy uznać za istotny, lecz częściowy wkład współautorski. Deklarowany udział doktorantki w opublikowanych pracach, solidna logika stojących za nimi badań, bardzo dobry dobór metod oraz dyskusja wyników świadczą o jej wysokiej samodzielności naukowej.

**Uwagi i pytania.** Istotną uwagą praktyczną jest niedostępność serwerów. Zarówno [astARTE](http://bioinfo.sggw.edu.pl/astarte/) <http://bioinfo.sggw.edu.pl/astarte/> jak i Kintaro <http://bioinfo.sggw.edu.pl/kintaro/> zwracały błąd (*timeout error*) w momencie przygotowywania recenzji, co w moim odczuciu ogranicza dostępność uzyskanych wyników. W spisie treści jest literówka (zarówno publikacja 5.1 jak i 5.2 jest oznaczona jako „1.”).

Pytania do doktorantki:

1. Dlaczego w analizach nie zastosowano programu Foldseek? Jakie byłyby zalety i potencjalne ryzyka zastosowania tego narzędzia zamiast klasycznych podejść takich jak TM-align, DALI czy FatCat? Zwracam uwagę, że Foldseek jest wymieniony na schemacie metodyki (Rys. 5) rozprawy, chociaż nie pojawia się on w metodach z publikacji.
2. W ostatnich latach na popularności zyskują metody do wykrywania odległej homologii oparte o białkowe modele językowe (np. pLM-BLAST: <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/plmblast>). Czy ich zastosowanie mogłoby być korzystne w tego typu projektach? Czy doktorantka znajduje jakieś przypadki, w

których metody pLM wskazują na statystycznie istotne podobieństwo sekwencji (a właściwie ich reprezentacji, ang. *embeddings*), dla których obecne podejście wykazało jedynie podobieństwo strukturalne?

3. Jak doktorantka ocenia możliwość, że niektóre ze zidentyfikowanych białek są w istocie analogami, a nie homologami? Jakie strategie (także w kontekście innych badań) można zastosować, aby uwiarygodnić hipotezę o homologii białek wykazujących jedynie podobieństwo strukturalne?
4. W pracach 1 i 3 włączano do dalszych analiz trafienia statystycznie nieistotne, co ma uzasadnienie w kontekście zwiększenia czułości, ale też niesie ryzyko fałszywych pozytywów. Jak liczne były przypadki graniczne? Czy ostatecznie odrzucone przypadki były ewidentnie błędne, czy też raczej zbyt niepewne? Jaki był ich charakter (np. brak konserwacji kluczowych motywów, niespójny kontekst genomowy/syntenia)?

**Podsumowanie oceny i rekomendacja.** Praca w całości opiera się na wynikach opublikowanych w recenzowanych czasopismach (suma IF=11,3; według danych przytoczonych w rozprawie). Na uwagę zasługuje konsekwentnie zastosowana, ewolucyjnie zorientowana perspektywa, która pozwoliła osiągnąć cele pracy, tj. przejść od identyfikacji domen do hipotez o ich możliwej funkcji i znaczeniu w kontekście patogenezy. Stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w zakresie: (1) wiedzy teoretycznej doktorantki, (2) samodzielności naukowej oraz (3) oryginalności rozwiązania problemu badawczego. **Wnoszę o dopuszczenie rozprawy do dalszych etapów postępowania** w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy**. Uzasadnieniem jest szczególnie wysoki poziom naukowy pracy: skala uzyskanych wyników (identyfikacja nowych rodzin domen oraz ich charakterystyka w ujęciu ewolucyjnym) oraz ich przełożenie na testowalne hipotezy funkcjonalne istotne dla zrozumienia patogenezy. Dodatkowym atutem jest rzetelna metodyka wykrywania odległych homologów, oparta na konsekwentnym łączeniu czułych metod sekwencyjnych z analizą strukturalną, co istotnie zwiększa czułość podejścia.

Stanisław Dunin-Horkawicz

.....