



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

CeNT CENTRUM
NOWYCH
TECHNOLOGII

15 stycznia, 2026

Prof. dr hab. Joanna Trylska
e-mail: joanna@cent.uw.edu.pl
telefon (22) 55 43 600
<http://bionano.cent.uw.edu.pl>

prof. dr hab. Agnieszka Gniazdowska-Piekarska
Przewodnicząca Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 166
02-787 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marianny Krysińskiej

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Marianny Krysińskiej jest zatytułowana „Ewolucja domen ADP-rybozylotransferaz i kinaz oraz bioinformatyczne poszukiwanie nowych rodzin” (ang. *“Evolution of ADP-ribosyltransferase and kinase domains and bioinformatic search for new families”*). Promotorem rozprawy jest dr. hab. Krzysztof Pawłowski z University of Texas Southwestern Medical Center oraz Howard Hughes Medical Institute w Dallas w USA. Promotorką pomocniczą jest dr hab. Małgorzata Dudkiewicz z Katedry Biochemii i Mikrobiologii, Instytutu Biologii, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Tematyka rozprawy dotyczy poszukiwania nowych rodzin enzymów z klasy transferaz: ADP-rybozylotransferaz oraz kinaz, w szczególności u bakterii z rodzaju *Legionella*, przy użyciu metod bioinformatycznych opartych na porównywaniu sekwencji i struktur.

Na rozprawę składają się trzy opublikowane artykuły w renomowanych anglojęzycznych czasopismach naukowych (*BMC Genomics*, *PeerJ* i *Scientific Reports*). Artykuły te przeszły zewnętrzne recenzje przez ekspertów w dziedzinie. Są to obszerne oryginalne prace, zawierające suplementy oraz dwie publicznie dostępne bazy danych. Załączone artykuły poprzedza niezależne wprowadzenie (około 20 stronicowe) w języku polskim napisane przez autorkę rozprawy. Wprowadzenie podzielone jest na rozdziały: Wstęp, Cel i zakres pracy, Hipoteza badawcza oraz Metodyka. Po Wprowadzeniu autorka krótko omawia i załącza trzy artykuły. Następnie podsumowuje swoją rozprawę, umieszcza bibliografię zawierającą odniesienia do 84 artykułów oraz oświadczenia, swoje i współautorów, dotyczące indywidualnych udziałów w pracach zbiorowych.

W rozdziale Wstęp pani Krysińska omawia, czym zajmuje się bioinformatyka; opisuje pojęcia bioinformatyczne, główne narzędzia i bazy danych bioinformatycznych, a także zastosowania bioinformatyki. Następnie autorka opisuje budowę białek. Skupia się na enzymach i w skrócie opisuje mechanizm działania enzymów, kofaktory, inhibicję reakcji enzymatycznych oraz klasyfikację enzymów. Kolejne podrozdziały poświęca dwóm typom enzymów, które klasyfikowała i

charakteryzowała w rozprawie doktorskiej, oraz katalizowanym przez nie reakcjom. Rozpoczyna od ADP-rybozylacji, która jest modyfikacją post-translacyjną białek polegającą na kowalencyjnym przyłączeniu ADP-rybozy. Tę reakcję katalizują ADP-rybozylotransferazy (ART). Modyfikacja ta jest istotna w sygnalizacji komórkowej i procesach prowadzących do infekcji. W tej części Wstępu autorka w skrócie opisuje te enzymy, ich zaangażowanie w procesy komórkowe, patogenezę, dotychczasową klasyfikację oraz występowanie. Dalej opisuje kinazy białkowe i fosforylację wraz z klasyfikacją kinaz. Wstęp kończy omówieniem klasyfikacji ART i kinaz w oparciu o sekwencje i struktury według bazy rodzin Pfam oraz charakterystyką bakterii *Legionella*. Autorka skupia się na bakteriach z rodzaju *Legionella*, gdyż są to patogeny wywołujące m.in. legionelozę. W komórce gospodarza wytwarzają efekторы, czyli białka ingerujące w szlaki sygnałowe i obronne gospodarza. Funkcje efektorów pełnią też ART i kinazy białkowe, których działanie prowadzi do inaktywacji białek gospodarza.

Rozdział 2 i 3 to odpowiednio cel pracy i hipoteza badawcza. Cel został poprawnie sformułowany i dotyczy bioinformatycznej analizy rodzin ADP-rybozylotransferaz i kinaz w publicznych bazach danych: badań ewolucji ich domen, poszukiwania nowych białek zawierających podobne do ART i kinaz domeny oraz przewidywania ich funkcji. W szczególności celem była kompleksowa analiza proteomu bakterii *Legionella* i człowieka w poszukiwaniu domen podobnych do ART i kinaz. Tak postawione cele zostały przez autorkę osiągnięte, a jej hipoteza badawcza została sprawdzona i potwierdzona.

W rozdziale 4 autorka opisuje stosowane w pracy metody. Badania mgr Krysińskiej opierają się na porównaniu zarówno sekwencji, jak i struktur białek. Zastosowane metody są podsumowane na dwóch schematach. Podobieństwa strukturalne pozwoliły na znalezienie odległych homologów, które ujawniły rodziny niepodobne sekwencyjnie do znanych ART i kinaz. Niedostępne w bazach danych struktury białek zostały przez autorkę przewidziane. Metody wykrywania odległych homologii na podstawie podobieństw struktur okazały się szczególnie istotne dla wykrycia nowych rodzin badanych enzymów.

Pierwsza omawiana i załączona publikacja wchodząca w skład rozprawy zatytułowana "*A survey of ADP-ribosyltransferase families in the pathogenic Legionella*" została opublikowana w czasopiśmie *BMC Genomics* (IF = 3.7, punkty MNiSW = 140) w roku 2025. Mgr Krysińska jest pierwszym z pięciu współautorów tej pracy (ostatnimi współautorami są promotorzy).

W tej pracy autorzy zbadali enzymy ART w obrębie rodzaju *Legionella*. Celem tego projektu była analiza proteomów ponad 40 gatunków *Legionella* w celu zidentyfikowania i scharakteryzowania nowych rodzin białek podobnych do ART. Analizy porównawcze wykazały podobieństwa sekwencyjne i strukturalne (m. in. przy użyciu narzędzia AlphaFold) między nowymi rodzinami przypominającymi ART a znanymi ART. Zidentyfikowanie nowych rodzin przypominających ART jest kluczowe dla zrozumienia patogenności bakterii *Legionella* oraz może wspomóc opracowanie strategii terapeutycznych.

Autorzy zidentyfikowali ponad 60 białek wykazujących podobieństwo do ART, w tym ponad 20 nowych rodzin. Przewidzieli, że większość białek nowych rodzin ART to efekторы. Może to być istotne, gdyż ADP-rybozylacja jest kluczowym mechanizmem post-translacyjnej modyfikacji, przez który te patogeny przejmują kontrolę nad określonymi funkcjami komórki gospodarza. W wielu rodzinach

autorzy zidentyfikowali miejsca aktywne, typowe dla ART. W kilku rodzinach miejsca aktywne są częściowo niekonserwowane, co sugeruje, że mogą to być pseudoenzymy (białka homologiczne do aktywnych enzymów, ale pozbawione aktywności katalitycznej).

Uważam, że praca ta stanowi istotny wkład w zrozumienie mechanizmów patogenności tych bakterii oraz ich oddziaływania z komórkami gospodarza. Autorzy opublikowali kompletny katalog wyników w bazie danych astARTE dostępnej online. Mgr Marianna Krysińska opiekuje się tą bazą danych. Oceniam, że narzędzie to będzie istotnym źródłem informacji dla badaczy zajmujących się patogennością *Legionella*.

Drugi z artykułów wchodzący w skład rozprawy, o angielskim tytule "*A novel predicted ADP-ribosyltransferase-like family conserved in eukaryotic evolution*", został opublikowany w czasopiśmie *PeerJ* (IF = 3,1, punkty MNiSW = 100) w roku 2021. Mgr Krysińska występuje jako trzecia spośród pięciu współautorów tej pracy.

Badania bioinformatyczne w tej pracy również dotyczyły enzymów z nadrodziny ADP-rybozylotransferaz (ART), ale u eukariontów. Głównym wynikiem było zidentyfikowanie i scharakteryzowanie nowej rodziny domen podobnych do ART, które są konserwowane w ewolucji eukariontów. Przy użyciu metod bioinformatycznych autorzy wykazali, że ludzkie białko LRRC9 (*Leucine-Rich Repeat Containing 9*) oraz jego homologi posiadają domenę ART-podobną, zagnieżdżoną pomiędzy domenami bogatymi w powtórzenia leucynowe (LRR). Jednak ta nowo odkryta rodzina domen ART-podobnych prawdopodobnie nie posiada klasycznej aktywności enzymatycznej ADP-rybozylotransferazy, ze względu na zmiany w miejscu aktywnym, co sugeruje, że domeny te mogą być tzw. pseudoenzymami. Autorzy nie wykluczyli jednak nietypowej aktywności ART lub innej funkcji enzymatycznej. Ostatecznie zaproponowali, że rodzina LRRC9, łącząca domeny LRR z domeną ART-podobną, może być zaangażowana w mechanizm obronny komórki lub inne mechanizmy sygnałowe.

Trzeci artykuł wchodzący w skład rozprawy doktorskiej o angielskim tytule "*Pan-kinome of Legionella expanded by a bioinformatics survey*" został opublikowany w roku 2022 w czasopiśmie *Scientific Reports* (IF = 4,6, punkty MNiSW = 140). Mgr Krysińska jest pierwszą z pięciu współautorów tego artykułu.

Praca ta dotyczy systematycznego przeszukiwania genomów patogennych bakterii *Legionella*, które dostarczają wielu białek efektorowych do komórki gospodarza, w tym kinaz, aby przejąć procesy komórkowe. W tej pracy autorzy skupili się na kinazach i pseudokinazach. Zidentyfikowali 13 nowych rodzin pseudo-kinaz, uznając wszystkie za potencjalne efekторы. Potwierdzone podobieństwa do znanych kinaz zdeponowano w formie publicznej bazy danych o nazwie KINTaro. Praca istotnie ta rozszerza katalog efektorów kinazowych wykorzystywanych przez te bakterie, aby manipulować komórkami gospodarza.

Rozprawa jest przygotowana poprawnie, a Wstęp jest klarowny; nie znalazłam literówek. Czasem opis jest zbyt uproszczony. Mam drobne uwagi do Wstępu rozprawy, które wymieniam poniżej, ale które nie wpływają na moją ogólną, bardzo dobrą ocenę wyników zamieszczonych w rozprawie.

strona 24, "łańcuch białkowy zsyntetyzowany w komórce przez rybosom przypomina swobodnie unoszącą się w roztworze nitkę..." Takie określenie nie jest precyzyjne i jest też zbyt popularnonaukowe jak na rozprawę doktorską, gdyż łańcuch polipeptydowy może się częściowo związać już w tunelu rybosomu i na jego powierzchni, a także część białek wymaga do poprawnego zwinięcia białek opiekuńczych.

strona 24, "w wyniku czego tworzy mniej lub bardziej sztywną bryłę", porównanie zwiniętej formy białka do bryły również jest, według mojej oceny, zbyt ogólne.

strona 25, "Wiązanie substratu z miejscem aktywnym enzymu jest bardzo specyficzną interakcją." Oddziaływanie substrat-enzym nie zawsze jest bardzo specyficzne, gdyż istnieją enzymy, np. proteazy, które hydrolizują wiele różnych substratów (np. różne sekwencje peptydów).

strona 25, "Miejsca aktywne to szczeliny lub rowki na powierzchni enzymu". Są to raczej kieszenie lub zagłębienia; nie spotkałam się z określeniem rowka lub szczeliny.

Po przeczytaniu rozprawy jestem też ciekawa:

- czy potwierdzono doświadczalnie funkcję efektorową któregoś przewidzianego przez autorów efektora ART.
- czy przewidywania strukturalne AlphaFold2 były jakoś dodatkowo walidowane?
- która z nowo zidentyfikowanych rodzin kinaz jest według autorki najbardziej interesująca?
- czy są inne patogeny bakteryjne z podobnie rozbudowanym kinomem, czy rodzaj *Legionella* jest szczególny?

W rozprawie autorka opisała swój indywidualny wkład do każdej z publikacji wchodzących w skład rozprawy. Załączyła także podpisane oświadczenia współautorów o ich wkładzie. Z tych oświadczeń wynika, że mgr Marianna Krysińska miała wyodrębniony i dominujący wkład w przedstawione wyniki badań. W przypadku pracy w *BMC Genomics* opracowała koncepcję projektu, przeprowadziła analizy bioinformatyczne, przygotowała rysunki oraz tabele do głównej części manuskryptu oraz suplementu, a także współedytowała manuskrypt publikacji. Do publikacji w *PeerJ*, mgr Krysińska miała współudział w oświadczeniach *in silico*, analizie danych, przygotowaniu rysunków i tabel do głównej części manuskryptu. Do pracy opublikowanej w *Scientific Reports*, mgr Krysińska przeprowadziła większość badań i analiz obliczeniowych, przygotowała rysunki, wykresy i tabele do głównej części artykułu oraz przygotowała manuskrypt publikacji.

Uważam, że cele rozprawy doktorskiej mgr Marianny Krysińskiej (analiza ewolucji, struktury i funkcji rodzin enzymów ART oraz kinaz z wykorzystaniem metod bioinformatycznych) zostały dobrze postawione i opisane, w pełni zrealizowane oraz są zgodne z wynikami badań autorki. Najistotniejszym osiągnięciem rozprawy było zidentyfikowanie nowych rodzin enzymów – 26 nowych rodzin ART u bakterii *Legionella* oraz 13 nowych rodzin kinaz białkowych – przy wykorzystaniu metod opartych na podobieństwach strukturalnych, które okazały się wydajniejsze od klasycznych metod polegających jedynie na porównaniu sekwencji. Wyniki udostępniono w dwóch publicznych bazach danych: astARTE i KINTaro. Uważam, że wkład autorki w zrozumienie mechanizmów, którymi *Legionella* manipuluje komórkami gospodarza poprzez ADP-rybozylację, może prowadzić do nowych podejść terapeutycznych.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marianny Krysińskiej jest zbiorem opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych (opatrzonych wstępem), w których powstanie mgr Krysińska miała indywidualny i dominujący udział. Rozprawa przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza wiedzę teoretyczną mgr Marianny Krysińskiej w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Marianny Krysińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

J. Trzylska