



dr hab. Katarzyna Turecka  
Katedra i Zakład Mikrobiologii  
Farmaceutycznej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
Ul. Gen. J. Hallera 107  
80-416 Gdańsk  
[katarzyna.turecka@gumed.edu.pl](mailto:katarzyna.turecka@gumed.edu.pl)

14.05.2026

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**  
**mgr Karoliny Ciemińskiej**  
**pt. „ Molekularny mechanizm stabilności termicznej endolizyny Ts2631**  
**bakteriofaga vB\_Tsc2631 infekującego *Thermus scotoductus*”**

**Formalna podstawa przygotowania recenzji**

Recenzja została przygotowana na podstawie pisma Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego z dnia 10.03.2026 r, zgodnie z wymaganiami określonymi 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.). Promotorem pracy doktorskiej jest dr hab. Magdalena Płotka, prof. UG, kierownik Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Gdańskiego.

**Znaczenie podjętych badań i aktualność tematyki**

W dobie narastającego, globalnego kryzysu antybiotykooporności, poszukiwanie nowych, alternatywnych strategii terapeutycznych stało się jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej biomedycyny i mikrobiologii. Tradycyjne antybiotyki, przez dziesięciolecia stanowiące fundament walki z infekcjami bakteryjnymi, tracą swoją skuteczność wobec ewolucji mechanizmów obronnych patogenów, co prowadzi do pojawienia się szczepów wielolekoopornych (MDR, ang. *multidrug-resistant*). W tym kontekście endolizyny pochodzenia bakteriofagowego wyłaniają się jako niezwykle obiecująca klasa enzybiotyków. Są one zdolne do bezpośredniej i szybkiej degradacji peptydoglikanu, co stanowi kluczowy element ściany komórkowej bakterii, a ich mechanizm działania utrudnia patogenom wykształcenie oporności.

Wybór tematyki badawczej przez mgr Karolinę Ciemińską zasługuje na najwyższe uznanie. Autorka skoncentrowała swoją uwagę na endolizynie Ts2631, enzymie pochodzącym z bakteriofaga vB\_Tsc2631, który infekuje ekstremofilną

bakterię *Thermus scotoductus*. Wykorzystanie organizmów ekstremofilnych jako źródła enzymów jest strategicznym posunięciem naukowym. Białka te, wyewoluowane do funkcjonowania w warunkach ekstremalnie wysokich temperatur, charakteryzują się nie tylko niezwykłą stabilnością termiczną, ale często również odpornością na skrajne wartości pH oraz obecność rozpuszczalników organicznych i detergentów.

Znaczenie podjętych badań przejawia się w dwóch głównych płaszczyznach:

- **Płaszczyzna poznawcza:** Rozprawa stanowi istotny wkład w zrozumienie fundamentalnych zasad biologii strukturalnej i biofizyki białek. Pytanie o to, jakie specyficzne cechy molekularne pozwalają enzymowi zachować swoją strukturę i aktywność w temperaturach bliskich 100°C, pozostaje jednym z centralnych zagadnień nowoczesnej inżynierii białka. Zrozumienie roli poszczególnych reszt aminokwasowych pozwala na sformułowanie ogólnych reguł termostabilizacji, które mogą być stosowane do projektowania białek mezofilnych o zwiększonej wytrzymałości.
- **Płaszczyzna aplikacyjna:** Endolizyny wykazują wysoką specyficzność i niski potencjał do wywoływania oporności. Badana przez Autorkę endolizyna Ts2631 wykazuje naturalną aktywność wobec alarmowych patogenów, takich jak *Acinetobacter baumannii* czy *Pseudomonas aeruginosa*. Wykazanie mechanizmów jej stabilności oraz badanie synergii z nowoczesnymi rozpuszczalnikami typu DES (ang. *Deep Eutectic Solvents*) otwiera drogę do opracowania stabilnych i skutecznych preparatów przeciwbakteryjnych, co ma krytyczne znaczenie dla współczesnej medycyny.

### Ocena formalna i merytoryczna rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma formę monografii naukowej, w której Doktorantka wnikliwie omówiła bardzo obszerną ilość wyników. Składa się z 9 rozdziałów i około 100 podrozdziałów. Całość pracy liczy 208 stron i charakteryzuje się przejrzystym układem: rozprawę otwiera zestawienie dorobku naukowego Autorki, następnie streszczenia (w języku polskim i angielskim), wykaz stosowanych skrótów oraz wprowadzenie. Doktorantka poświęciła 25 stron na omówienie dotychczasowego stanu wiedzy w badanym obszarze. Merytoryczny trzon pracy stanowi obszerna część doświadczalna. Zawiera ona sformułowany cel pracy, opis metodyki, prezentację oraz dyskusję wyników, a także podsumowanie i wnioski. Całość wieńczy bibliografia, zawierająca 226 pozycji oraz suplement. Autorka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, planowania eksperymentów, analizy danych oraz ich syntetycznego przedstawienia w formie publikacyjnej. Praca charakteryzuje się logicznym układem, a postawione hipotezy badawcze znajdują pełne odzwierciedlenie w przeprowadzonych doświadczeniach.

Struktura merytoryczna rozprawy obejmuje szerokie spektrum zaawansowanych metod badawczych, co świadczy o wysokich kompetencjach warsztatowych Autorki. Do najważniejszych zastosowanych technik należą:

- Bioinformatyczna analiza sekwencji i modelowanie strukturalne:** Autorka przeprowadziła szczegółowe porównanie endolizyny Ts2631 z jej mezofilnymi homologami, endolizyną K11gp3.5 pochodzącą z bakteriofaga K11, który infekuje *Klebsiella pneumoniae* oraz domeną amidazową białka LytO, która pochodzi z *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NCTC 8325, identyfikując kluczowe różnice w składzie aminokwasowym i architekturze białka, co pozwoliło na wytypowanie celów do mutagenezy.
- Inżynieria genetyczna i mutageneza kierowana:** Przygotowanie 55 wariantów punktowych białka jest zadaniem o ogromnej skali trudności i pracochłonności, co zasługuje na szczególne wyróżnienie. Proces ten wymagał nie tylko precyzji technicznej, ale i doskonałego zrozumienia struktury enzymu.
- Analiza biofizyczna i termodynamiczna:** Wykorzystanie dichroizmu kołowego (CD) oraz nanoróżnicowej fluorymetrii skaningowej (nanoDSF) pozwoliło na precyzyjne wyznaczenie temperatur topnienia ( $T_m$ ) oraz zmian entalpii ( $\Delta H$ ). Są to twarde dane fizykochemiczne, które stanowią fundament dowodowy dla wniosków o stabilności badanych wariantów.
- Mikrobiologiczne testy aktywności:** Ocena potencjału litycznego wobec szerokiego spektrum bakterii Gram-ujemnych, w tym szczepów MDR, oraz badanie synergii z rozpuszczalnikami typu DES, co pozwoliło na ocenę potencjału terapeutycznego enzymu.

Praca jest napisana językiem poprawnym naukowo, z zachowaniem właściwej terminologii naukowej. Wstęp teoretyczny w sposób klarowny wprowadza czytelnika w problematykę stabilności termicznej białek, omawiając dotychczasowy stan wiedzy oraz luki badawcze, które praca ta wypełnia. Autorka słusznie zwraca uwagę, że choć wiele endolizyn zostało scharakteryzowanych biochemicznie, Ts2631 jest pierwszym enzymem tego typu, pochodzącym od faga termofilnego, z eksperymentalnie potwierdzonym centrum katalitycznym.

Głównym osiągnięciem mgr Karoliny Ciemińskiej jest dekonstrukcja mechanizmów termostabilności endolizyny Ts2631 poprzez systematyczną analizę 55 mutantów. Jest to podejście rzadko spotykane w literaturze ze względu na swoją pracochłonność, ale dające niezwykle bogaty i kompletny obraz krajobrazu energetycznego białka. Jednym z kluczowych wniosków płynących z pracy jest rola głęboko ukrytych reszt aromatycznych. Autorka wykazała, że reszty w pozycjach W102, W109, W145 oraz i P140 są istotne dla stabilności termicznej endolizyny Ts2631. Sugeruje to, że te reszty pełnią funkcję "molekularnych kotwic", stabilizujących rdzeń hydrofobowy poprzez silne oddziaływania typu van der Waalsa oraz kation- $\pi$ . To odkrycie ma fundamentalne znaczenie dla strategii termostabilizacji innych białek – sugeruje, że wprowadzanie tryptofanu w specyficzne, dobrze osłonięte miejsca rdzenia może być skutecznym sposobem na zwiększenie stabilności strukturalnej.

Wartość merytoryczna rozprawy przejawia się również w głębi interpretacji uzyskanych wyników dotyczących centrum katalitycznego. Autorka wykazała, że Ts2631 jest amidazą zależną od jonów cynku, koordynowanych przez reszty His30, His131 oraz Cys139. Mutacje w tych pozycjach nie tylko znoszą aktywność lityczną, ale często prowadzą do drastycznego obniżenia stabilności, co objawia się agregacją białka. Świadczy to o tym, że u ekstremofili struktura centrum katalitycznego jest integralnie związana z globalną architekturą białka i jego stabilnością termiczną..

Interesującym aspektem pracy jest próba przeniesienia cech termostabilnych na białka mezofilne o homologii strukturalnej do Ts2631: endolizynę K11gp3.5 oraz domenę amidazową białka LytO. Wyniki badań jednoznacznie wskazują, że prosta substytucja reszt aminokwasowych jest niewystarczająca do zwiększenia stabilności termicznej. Sukces strategii projektowej jest ściśle uzależniony od szczegółowej analizy mikrośrodowiska modyfikowanych reszt. Tym samym Autorka słusznie zauważa brak uniwersalnego algorytmu postępowania, wskazując na konieczność indywidualnego podejścia do każdego obiektu białkowego.

Mocną stroną rozprawy jest wyjście poza czystą analizę strukturalną w stronę praktycznych zastosowań biomedycznych. Autorka wykazała, że endolizyna Ts2631 posiada unikalny N-końcowy fragment, bogaty w aminokwasy dodatnio naładowane, który warunkuje jej aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-ujemnych. W przeciwieństwie do wielu mezofilnych endolizyn, które wymagają pomocy holin lub zewnętrznych czynników permeabilizujących, Ts2631 potrafi (choć z ograniczoną wydajnością) samodzielnie pokonywać barierę błony zewnętrznej.

Badania nad wzmocnieniem tej aktywności są imponujące i posiadają dużą wartość wdrożeniową. Zastosowanie chelatora jonów metali (EDTA) pozwoliło na uzyskanie redukcji miana bakterii *A. baumannii* o ponad 4 logarytmy w ciągu 1.5 godziny. Nowatorskie jest wykorzystanie rozpuszczalników głęboko eutektycznych (DES). Mgr Karolina Ciemińska wykazała, że rozpuszczalniki te (reline) nie tylko nie denaturują endolizyny, ale wręcz wspomagają jej działanie przeciwko biofilmom bakteryjnym. Wykazanie, że enzym ekstremofilny zachowuje swoją funkcję w tak specyficznym środowisku chemicznym, jest dowodem na jego ogromny potencjał w przemyśle chemicznym i farmaceutycznym. Autorka słusznie sugeruje, że połączenie endolizyn z DES może stanowić nową generację środków do eradykacji uporczywych zakażeń, które są odporne na konwencjonalne antybiotyki.

### **Uwagi edytorskie i aspekty wymagające wyjaśnienia**

Praca charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym, choć w warstwie edytorskiej można dostrzec pewne niekonsekwencje w formatowaniu tekstu głównego oraz określone usterki techniczne. W tekście pojawiają się tzw. „literówki” (np. strona 12 – RMSD - powinno być średnie kwadratowe odchylenie; strona 30, podpis pod rysunkiem 5 – powinno być endopeptydaza, strona 75, rys. 10 powinno być nałożone, itp.), błędy interpunkcyjne oraz pewne nieścisłości terminologiczne, wynikające prawdopodobnie z tłumaczenia z języka angielskiego (np. AMP jako peptydy przeciwdrobnoustrojowe, czy "masa cząsteczkowa" zamiast "wielkość

prążków"). Należy również zwrócić uwagę na unikanie słownictwa potocznego (np. „wariant oczyszczał się bez problemu”). Ważne jest także, aby w dokumentach tej rangi zachować jednolitość stylu narracji; pisząc w pierwszej osobie, należy robić to konsekwentnie w całej pracy, bądź też konsekwentnie stosować stronę bierną. Część graficzna, w tym rysunki oraz zestawienia tabelaryczne są czytelne i merytorycznie poprawne, a bibliografia (zintegrowana w publikacjach) odzwierciedla najnowsze trendy w literaturze przedmiotu. Spełnienie wymogów dotyczących streszczeń w języku polskim i angielskim dodatkowo potwierdza formalną poprawność pracy. Niezależnie od wskazanych błędów, które nie umniejszają wartości pracy, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Ciemińskiej, charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym i nowatorskim charakterem badań.

### Problemy do rozwiązania i pytania do Doktorantki

W związku z przedstawioną rozprawą, sformułowałem następujące pytania, które mogą być przedmiotem dyskusji podczas obrony:

1. W pracy opisano, że mutant C80A jest bardziej stabilny termodynamicznie niż białko typu dzikiego, ale jest nieaktywny. Czy przeprowadzono próby reintrodukcji aktywności w tym stabilniejszym szkielecie poprzez dodatkowe mutacje w obrębie centrum aktywnego? Czy możliwe jest oddzielenie "napięcia strukturalnego" niezbędnego do katalizy od globalnej stabilności białka?
2. Biorąc pod uwagę rolę N-końcowego fragmentu w przenikaniu przez błonę zewnętrzną, czy rozważano stworzenie chimerycznych białek, w których wspomniany fragment Ts2631 jest dołączany do endolizyn mezofilnych? Jak taka modyfikacja wpłynęłaby na stabilność termiczną i lityczną białka mezofilnego?
3. Większość badań prowadzono w buforach o określonym pH. Czy zakres stabilności termicznej Ts2631 zmienia się znacząco w ekstremalnych wartościach pH (np. pH 4.0 lub pH 10.0)? Czy istnieją specyficzne reszty aminokwasowe, które chronią enzym przed denaturacją kwasową/zasadową?
4. W jaki sposób Doktorantka odniesie się do potencjalnej immunogenności białka? Jako enzym pochodzenia obcego (bakteriofagowego), Ts2631 może wywoływać odpowiedź immunologiczną u ludzi i zwierząt. Czy ekstremalna stabilność termiczna może korelować z większą odpornością na proteolizę w surowicy krwi.
5. Jakie są perspektywy komercjalizacji endolizyny Ts2631 w Polsce w kontekście obecnych regulacji dotyczących nowych leków przeciwbakteryjnych? Czy wysoka stabilność enzymu ułatwia proces certyfikacji?

## Ocena dorobku naukowego

Przed podsumowaniem recenzji rozprawy doktorskiej chcę odnieść się pozytywnie do całości dorobku naukowego Doktorantki. Jest pierwszą autorką i współautorką artykułów, które ukazały się w interdyscyplinarnej bazie *Journal Citation Reports*, w renomowanym czasopiśmie, takich jak: *Scientific Reports* (2 publikacje, pierwsza autorka i współautorka), *ACS Applied Bio Materials*, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* czy *International Journal of Molecular Sciences* (współautorka). Ponadto, Pani mgr Karolina Ciemińska była kierowniczką i/lub wykonawczynią w 3 projektach (OPUS 20 – NCN, wykonawczyni; Młody Naukowiec 2022 i 2024 - kierownik). Udział w patencie oraz wyróżnienie za najlepsze wystąpienie ustne potwierdzają wysoki potencjał naukowy Doktorantki.

## Podsumowanie i wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Ciemińskiej pt. „Molekularny mechanizm stabilności termicznej endolizyny Ts2631 bakteriofaga vB\_Tsc2631 infekującego *Thermus scotoductus*” jest opracowaniem o bardzo wysokiej jakości merytorycznej i wartości naukowej. Autorka z powodzeniem połączyła zaawansowane metody bioinformatyczne, inżynierię białka oraz biofizykę, aby rzucić nowe światło na problematykę termostabilności enzymów litycznych.

Do najważniejszych osiągnięć pracy należy zaliczyć systematyczną analizę 55 mutantów punktowych, odkrycie roli "lokalnej frustracji energetycznej" w szczelinie wiążącej peptydoglikan oraz wykazanie kluczowej roli ukrytych reszt w utrzymaniu fałdu termofilnego. Wyniki uzyskane przez mgr Karolinę Ciemińską mają realną szansę przyczynić się do opracowania nowych narzędzi w walce z antybiotykoopornością, co nadaje pracy dodatkowy wymiar etyczny i społeczny.

Na podstawie powyższej analizy stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie nauki biologiczne oraz wykazuje jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Praca spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim.

Z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Karoliny Ciemińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym do publicznej obrony. Jednocześnie, **ze względu na wyjątkową wartość merytoryczną oraz nowatorski charakter badań, zwracam się z formalnym wnioskiem o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.**

Recenzent

dr hab. Katarzyna Turecka

Katedra i Zakład  
Mikrobiologii Farmaceutycznej  
dr hab. Katarzyna Turecka



odciski