



**WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII**

**Zakład Biochemii Analitycznej**

**Dr hab. Benedykt Władysław, prof. UJ**

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Ciemińskiej pt.  
„Molekularny mechanizm stabilności termicznej endolizyny Ts2631  
bakteriofaga vB\_Tsc2631 infekującego *Thermus scotoductus*”**

Praca doktorska Pani mgr Karoliny Ciemińskiej została wykonana w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Płotki, prof. UG. W ramach rozprawy przedstawiono badania nad determinantami termostabilności endolizyny Ts2631. Już na początku warto zaznaczyć, że duża część wyników została już opublikowana w czasopiśmie Scientific Reports, a Doktorantka jest pierwszym autorem tej publikacji.

Białka enzymatyczne są nie tylko podstawą wszelkich przemian metabolicznych pozwalających na funkcjonowanie organizmów żywych, ale również uczestniczą w szeregu procesów związanych z interakcjami między nimi, oraz między organizmami i środowiskiem w którym bytują. Owe warunki w których działają enzymy mogą być ekstremalne, np. w kontekście temperatury, pH czy zasolenia. Wymusza to między innymi optymalizację ich struktury aby wydajnie spełniać swoją biologiczną rolę. Tego typu właściwości białek (enzymatycznych) są również przedmiotem zainteresowania naukowców, nie tylko z czystej „ciekawości świata”, ale również możliwości praktycznego zastosowania. Badania przedstawione w recenzowanej rozprawie skupiają się nad molekularnymi mechanizmami termostabilności enzymów na przykładzie endolizyny bakteriofaga infekującego bakterie termofilne *Thermus scotoductus*. Ponadto wyniki uzyskane w pierwszej części badań posłużyły jako podstawa do badań nad podniesieniem stabilności termicznej białek z organizmów mezofilnych.

Praca doktorska mgr K. Ciemińskiej jest monografią liczącą 208 stron. Składa się z wykazu skrótów, streszczeń w języku polskim i angielskim, wstępu teoretycznego, celu pracy, rozdziałów dotyczących materiałów i metod, połączonych wyników i dyskusji, oraz wniosków wraz z kończącym dysertację spisem literatury i suplementem.

We wstępie Doktorantka sygnalizuje problem rosnącej antybiotykooporności bakterii oraz przedstawia skrótowo mechanizmy lekooporności. Następnie dość systematycznie opisuje alternatywne dla antybiotyków strategie zwalczania patogenów bakteryjnych. Wśród nich

znajdują się enzybiotyki, ze szczególnym uwzględnieniem endolizyn. W kolejnych częściach wstępu opisuje m.in. znaczenie stabilności termicznej białek, w tym w kontekście zastosowań praktycznych. Na końcu wstępu Doktorantka przedstawia „bohatera” rozprawy, endolizynę Ts2631. Wprowadzenie teoretyczne jest informatywne i oparte o ponad 100 pozycji literaturowych. Zostało ono zilustrowane 8 rycinami z których ostatnie trzy są szczególnie wartościowe i mocno merytorycznie związane z częścią eksperymentalną pracy. W mojej ocenie zbyt duży nacisk położono na opis alternatywnych strategii eliminacji bakterii (w tym antybiotykoopornych). Ma to dość luźny związek z przedmiotem pracy doktorskiej. Zabrakło z drugiej strony bardziej pogłębionego przedstawienia mechanizmów związanych ze stabilnością strukturalną białek, pokazania motywów uporządkowanych i wewnątrznie nieustrukturyzowanych wraz podaniem ich roli. Również brakuje szerszego przedstawienia wpływu środowiska na parametry reakcji enzymatycznych, przede wszystkim temperatury, ale także pH czy zasolenia. Elementy te były brane pod uwagę w badaniach eksperymentalnych, więc ich szersze zaprezentowanie ułatwiłoby przedstawienie nie tylko zasadności poszczególnych badań ale również dyskusję. Oceniając całościowo tą część pracy bez wątplenia stwierdzam, że Doktorantka posiada należyłą wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne.

Cele pracy przedstawione są krótko w postaci celu głównego i pięciu szczegółowych zadań badawczych, których realizacja znajduje późniejsze odzwierciedlenie w prezentowanych wynikach. Choć krótka i rzeczowa prezentacja celów jest często stosowana i wystarczająca, to można tu było pokusić się o szerszą argumentację, gdyż można się tylko domyślać że identyfikacja determinant stabilności termicznej miała posłużyć do dalszych bardziej aplikacyjnych prac polegających na inżynierii białek z organizmów mezofilnych w celu poprawy ich stabilności termicznej.

Materiały wykorzystane w pracy zostały przedstawione na blisko 20 stronach rozprawy. Oprócz tabel szczepów, konstruktów plazmidowych i oligonukleotydów do mutagenyzy rozdział ten zawiera ponadto zestawienie i składy podłoży hodowlanych i buforów, oraz programy komputerowe i narzędzia bioinformatyczne. Na kolejnych 10 stronach opisano metody badawcze stosowane do otrzymania prezentowanych później wyników. Oba rozdziały (Materiały i Metody) przygotowane są starannie i szczegółowo. Metody dobrane są adekwatnie do założeń badawczych i pośrednio wskazują na biegłość Doktorantki zarówno w analizach *in silico* jak i w pracy laboratoryjnej.

Do tej części pracy mam prośbę o przedstawienie podczas obrony bardziej szczegółowo założeń działania różnicowej fluorymetrii skaninigowej (nanoDSF), w tym analizy i interpretacji otrzymanych wyników. Dlaczego tylko dla białek K11gp3.5 oraz LytA\_27 wartości pochodzące z pierwszej pochodnej zostały pomnożone przez -1? Jest to kluczowa metoda na podstawie której otrzymywane są najistotniejsze wyniki i wyciągane kluczowe wnioski. Proszę też o zaproponowanie alternatywnych lub komplementarnych metod analizy stabilności strukturalnej białek, zwłaszcza w połączeniu z ich aktywnością (enzymatyczną).

Wyniki i ich dyskusja przedstawione w pracy w jednym rozdziale. Już na początku zaznaczę, że nie jest to najtrafniejszy sposób prezentacji i omówienia wyników. W wielu miejscach wprowadza to niepotrzebny chaos i niekonsekwencję (np. informacje o roli tryptofanu w podrozdziale o 5.5.4 o wariantach argininowych, s.96). Ponadto trudno czasami oddzielić co jest oryginalnym wynikiem, co wynikiem cytowanym jako element wcześniejszych badań. Podobnie z komentarzami będącymi elementami dyskusji; nie zawsze wiadomo co jest autorskim komentarzem Doktorantki a co argumentem podawanym w oparciu o cytowaną literaturę.

W pierwszej części rozdziału „Wyniki i dyskusja” Doktorantka opisuje porównanie właściwości strukturalnych i składu aminokwasowego endolizyny Ts2631, głównie z lizozymem T7. Skupia się na porównaniu częstości występowania reszt aminokwasowych, konkludując, że w endolizynie z większą częstością występuje tryptofan, arginina, tyrozyna i prolina, natomiast rzadziej kwas asparaginowy i seryna. Choć ta stosunkowo prosta analiza przeprowadzona jest poprawnie to już bardziej ogólne wnioski, choć być może prawdziwe, są oparte jednak o jednostkowe porównanie dwóch białek. Dużo lepszym rozwiązaniem byłoby użycie większego zbioru sekwencji aminokwasowych oraz podanie nie tylko procenta występowania poszczególnych aminokwasów ale też zakresu tych wartości (np., tzw. wykres pudełkowy; box-and-whisker plot) i tam gdzie to możliwe zastosowanie analizy statystycznej weryfikującej istotność obserwowanych różnic. Nie można bowiem wykluczyć że co najmniej jedno z porównywanych białek jest nietypowe pod względem składu aminokwasowego. Namiastką tak poszerzonej analizy są wyniki prezentowane w dalszej części rozprawy, m.in. w tabeli 7. Na tym etapie zabrakło również uliniowania sekwencji, które prezentowane jest dopiero w odległej części pracy na rycinie 24 (s. 103). W niektórych miejscach pojawia się też porównanie (cyt.) „ilości” poszczególnych aminokwasów (s. 76 i 79). Powinna to być zawsze frakcja (%), bo jest to miara niezależna od długości białka.

W kolejnej części opisane jest przygotowanie wariantów endolizyny z zamienionymi aminokwasami w szeregu miejsc tego enzymu. Łącznie otrzymano i przetestowano 55 wariantów substytucyjnych, co odpowiada blisko jednej trzeciej całkowitej liczby aminokwasów budujących Ts2631. Już samo zaplanowanie, a następnie przygotowanie konstruktów plazmidowych oraz późniejsze oczyszczenie tyłu białek rekombinowanych pokazuje ogromny nakład pracy i jednocześnie dokumentuje biegłość Doktorantki w pracy laboratoryjnej. Następnie Doktorantka sukcesywnie testuje otrzymane warianty endolizyny pod kątem ich stabilności termicznej i aktywności enzymatycznej. W wyniku tych badań udało się zidentyfikować reszty odpowiedzialne za termostabilny charakter białka. Są to w szczególności W102, W109, P140 i W145. Ponadto wykazano znaczącą utratę termostabilności dla wariantów substytucyjnych w centrum aktywnym (wiążącym jon cynku). Wiązało się z oczywistą i oczekiwaną utratą aktywności enzymatycznej. Wynik ten jednak jest wartościowy, gdyż pokazuje że zaburzenie centrum aktywnego może skutkować utratą stabilności termicznej. Zatem, centrum aktywne oprócz wiodącej roli w katalizie ma też istotny wkład w utrzymanie struktury całego białka. W większości wariantów stosowano

substytucję alaniną, co jest ogólnie przyjętą strategią. Jednak dla reszt w centrum aktywnym zastosowano niezrozumiałe dla mnie podstawienia oparte o sekwencję lizozymu T7 (rozdział 5.5.1). Reszty te w lizozymie T7 są jednak identyczne jak w Ts2631, wbrew temu co pisze Doktorantka. Prosiłbym o wyjaśnienie tej rozbieżności w trakcie obrony oraz przedstawienie na jakiej podstawie zostały wytypowane reszty konserwowane w endolizynie Ts2631, w szczególności rolę T137 jako reszty wchodzącej w skład centrum aktywnego (zaprezentowane na rycinie 12 D).

Ciekawym wynikiem, niestety zbyt pobieżnie przedyskutowanym i niewykorzystanym w dalszych analizach i badaniach, jest wykazanie zwiększonej stabilności termicznej dla kilku wariantów substytucyjnych (I79, C80, N85, G95 i V135). Są to reszty wskazywane przez Doktorantkę jako konserwowane, zatem w domyśle istotne przynajmniej dla aktywności enzymatycznej. Jak zatem owe substytucje wpłynęły na aktywność? Czy reszty te (jako konserwatywne) występują w odpowiednikach białek z organizmów mezofilnych? I w końcu czy można tego typu substytucje wykorzystać do zwiększenia stabilności termicznych tych białek? Pytania te wiążą się z trzecią częścią pracy, w której Doktorantka opisuje próby wykorzystania uzyskanych wcześniej wyników do przygotowania białek strukturalnie i częściowo funkcjonalnie podobnych do endolizyny, lecz pochodzących z organizmów mezofilnych. Doktorantka chciała zweryfikować hipotezę, czy zamiana reszt odpowiedzialnych za stabilność termiczną endolizyny Ts2631 zwiększy stabilność białek o niższej termostabilności. Do badań zostało wybranych 5 białek. Nie wszystkie prace zakończyły się powodzeniem, co wynikało w dużej mierze z trudności w otrzymaniu białek rekombinowanych lub analiz ich aktywności enzymatycznej. Nasuwa to pytanie, dlaczego do badań nie użyto lizozymu T7, który w początkowych analizach stanowił białko odniesienia? Badając nowe białka zmodyfikowano podejście eksperymentalne, gdyż nie testowano pojedynczych substytucji aminokwasowych, a od razu zmieniano trzy lub dwa aminokwasy. W przypadku endolizyny K11gp3.5 substytucje te skutkowały odpowiednio utratą aktywności enzymatycznej (wariant K11gp3.5\_N91W\_M101W\_Q137W) lub utratą stabilności termicznej przy jednoczesnym zachowaniu aktywności enzymatycznej (wariant K11gp3.5\_N91W\_Q137W). Natomiast w przypadku domeny amidazowej autolizyny LytO udało się zwiększyć stabilność termiczną wariantu Q115W\_F179W o blisko 10°C. Ponadto wariant ten charakteryzował się większą aktywnością enzymatyczną w temperaturze 60°C niż białko typu dzikiego. Pokazuje to że nie ma prostej recepty na inżynierię białek prowadzącej do zwiększenia ich stabilności termicznej.

Mimo pewnych kłopotów technicznych i metodologicznych oraz nie zawsze trafnych założeń koncepcyjnych Doktorantka uzyskała szereg oryginalnych i wartościowych wyników. Wskazała reszty aminokwasowe zarówno w kontekście ich właściwości chemicznych jak i lokalizacji strukturalnej wpływające na zmiany stabilności termicznej endolizyny Ts2631 oraz innych białek. Uważam to za najważniejsze osiągnięcie niniejszej pracy, o istotnym znaczeniu poznawczym. Doktorantka trafnie również interpretuje wyniki konkludując, że nie ma uniwersalnych determinant stabilności termicznej. Ważne jest również oddziaływanie

poszczególnych reszt ze sobą, a praktyczna poprawa właściwości termicznych białek przy zachowaniu ich aktywności enzymatycznej i stabilności strukturalnej wymaga niekiedy bardzo kompleksowego podejścia i żmudnego screeningu. Warto też podkreślić, że Doktorantka ma świadomość rosnącej roli analiz bioinformatycznych do predykcji skutków substytucji aminokwasowych w białkach i wykorzystała te możliwości podczas pracy.

Po lekturze pracy mam dodatkowe pytania, które łączą się z aspektami aplikacyjnymi i terapeutycznymi prezentowanymi we wstępie teoretycznym:

1. Czy stabilność termiczna białek terapeutycznych jest rzeczywiście istotna w kontekście ich praktycznego działania w temperaturze 37°C?
2. Czy oznaczana była stabilność strukturalna badanych białek, mierzona np. zdolnością do agregacji lub utratą właściwości biologicznych (enzymatycznych) przy dłuższym przechowywaniu w temperaturze pokojowej lub 37°C?

Pod względem redakcyjnym praca przygotowana jest bardzo starannie. Rysunki i tabele są czytelne oraz mają odniesienia w tekście. W pracy nie ma też praktycznie tzw. literówek. Jeśli chodzi o uwagi krytyczne to panel B na rycinie 32 jest identyczny z ryciną 28. Kolory w opisie ryciny 22 B i 45 nie zgadzają się z prezentowanymi (są zamienione).

Pod względem językowym praca napisana jest dość nietypowo, w pierwszej osobie liczby pojedynczej. Jest to ciekawa forma, nawiązująca do narracji stosowanych w niektórych publikacjach naukowych, która generalnie sprawdziła się w niniejszej rozprawie. Personalna a nie bezosobowa prezentacja wyników i ich komentarz pokazuje zaangażowanie Doktorantki w prowadzone badania. Opis pokazuje nielukrowany obraz pracy analitycznej i doświadczalnej, gdzie nie zawsze otrzymujemy oczekiwane wyniki, czasami popełniamy błędy lub umyka naszej uwadze, jak się potem okazuje, istotny szczegół techniczny czy merytoryczny. Doktorantka nie bała się prezentować zarówno swojego toku myślenia jak również pozornie negatywnych czy niekompletnych wyników. W tym kontekście rozprawa w niektórych miejscach przypomina ciekawą książkę przygodową z dużym potencjałem na kontynuację. Z drugiej strony, ta luźniejsza forma opisu wyników skutkuje niestety niekiedy zauważalną ilością skrótów myślowych czy uproszczeń stylistycznych, które jeśli czytane literalnie są nieprecyzyjne lub niepoprawne. Dla przykładu: białka mezofilne (s. 13), mutacje w białkach (s. 16), zakodowane w białkach... (s. 18), różnice w zachowaniu myszy po antybiotykach (s. 21), białka termofilne (s. 35 i 37), sekwencje nukleotydowe białek (s. 39 i 40), elektroforezę prowadzono do rozciągnięcia się ścieżek w żelu (s. 63), elektroforeza poliakrylamidowa (s. 65), po tym czasie temperaturę wyłączono (...) temperatura została ponownie włączona na 2 godziny (s. 68), maksymalna temperatura urządzenia (s. 88). Trafiają się też niefortunne spolszczenia, np. inwazja immunologiczna czy dewastacja komórek (s. 22), egzaminowała działanie endolizyny (s. 107 i 146).

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Karoliny Ciemińskiej jest ciekawym opracowaniem prezentującym nowe wyniki o znaczącej

wartości merytorycznej. W pracy zaprezentowała oryginalne rozwiązanie problemu naukowego a przeprowadzone badania, analiza ich wyników oraz dyskusja pozwala stwierdzić, że Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Zamieszczone uwagi krytyczne nie zmieniają mojej pozytywnej oceny rozprawy. Uważam, że osiągnięcia naukowe Pani mgr Karoliny Ciemińskiej odpowiadają wymaganiom zwyczajowym oraz formalnym stawianym w stosownych przepisach prawa (artykuł 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 z pełnym przekonaniem wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Ciemińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Podpisany elektronicznie przez  
Benedykt Władyka  
07.05.2026  
9:34:42 +02'00'