

**Autoreferat**  
**Przedłożony Radzie Doskonałości Naukowej**

dr Miłosz Jacek Ruszkowski  
Instytut Chemii Bioorganicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
w Poznaniu

Poznań 2020

## **1. IMIĘ I NAZWISKO:**

Miłosz Jacek Ruszkowski

## **2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE:**

### **Magister chemii 2009**

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii. Promotor: prof. Henryk Koroniak

Praca magisterska pt. „Próba opracowania metody syntezy fluorowanych azyrydynowych pochodnych uracylu”.

### **Doktor nauk chemicznych w zakresie biochemii (z wyróżnieniem) 2014**

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Promotor: dr hab. Michał Sikorski

Rozprawa doktorska pt. „Badania strukturalne i biochemiczne białek zaangażowanych w regulację hormonalną u roślin”.

## **3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:**

### **Stażysta podoktorski (PostDoc) 2014-2018**

Synchrotron Radiation Research Section,  
Macromolecular Crystallography Laboratory, National Cancer Institute,  
Argonne, Stany Zjednoczone

### **Adiunkt 2019 - obecnie**

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

## 4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY

### 4.A. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Struktura i molekularne mechanizmy wybranych enzymów roślinnych szlaków metabolicznych aminokwasów białkowych

### 4.B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

*(nazwisko habilitanta jest wytłuszczone; \* oznacza autora korespondencyjnego; dane bibliograficzne podano wg Web of Science Core Collection)*

---

**H1.** Forlani, G., Makarova, K. S., **Ruszkowski, M.**, Bertazzini, M., & Nocek, B.\*  
Evolution of plant  $\delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate reductases from phylogenetic and structural perspectives.  
*Frontiers in Plant Science* (2015) 6, 567.  
IF(2015)=4,495, IF5= 5,207; liczba cytowań: 10

*Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: wykonaniu analiz strukturalnych oraz ich opisanie w manuskrypcie.*

---

**H2.** Forlani, G.\*, Bertazzini, M., Zarattini, M., Funck, D., **Ruszkowski, M.**, & Nocek, B.  
Functional properties and structural characterization of rice  $\delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase.  
*Frontiers in Plant Science* (2015) 6, 565.  
IF(2015)=4,495, IF5= 5,207; liczba cytowań: 11

*Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: produkcji białka do badań strukturalnych, wykonaniu badań strukturalnych i ich analizie, napisaniu części manuskryptu dotyczącego struktury, poprawie części manuskryptu dot. analizy strukturalnej, zgodnie z zaleceniami recenzentów.*

---

**H3.** **Ruszkowski, M.\***, Nocek, B., Forlani, G., & Dauter, Z.  
The structure of *Medicago truncatula*  $\delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase provides new insights into regulation of proline biosynthesis in plants.  
*Frontiers in Plant Science* (2015) 6, 869.  
IF(2015)=4,495, IF5= 5,207; liczba cytowań: 14

*Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego, zaplanowaniu pracy, wykonaniu eksperymentów (poza pomiarami kinetycznymi), analizie wyników, napisaniu manuskryptu, pełnej edycji pracy, poprawie manuskryptu zgodnie z zaleceniami recenzentów, pełnieniu funkcji autora korespondującego.*

---

**H4. Ruszkowski, M.\*, & Dauter, Z.**

Structural studies of *Medicago truncatula* histidinol-phosphate phosphatase from inositol monophosphatase superfamily reveal details of penultimate step of histidine biosynthesis in plants.

*Journal of Biological Chemistry* (2016) 291(19), 9960–9973.

IF(2016)=4,125, IF5=4,237; liczba cytowań: 11

*Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego, zaplanowaniu pracy, wykonaniu eksperymentów, analizie wyników, napisaniu manuskryptu, pełnej edycji pracy, poprawie manuskryptu zgodnie z zaleceniami recenzentów, pełnieniu funkcji autora korespondującego.*

---

**H5. Ruszkowski, M.\*, & Dauter, Z.**

On methylene-bridged cysteine and lysine residues in proteins.

*Protein Science*, (2016) 25, 1734–1736.

IF(2016)=2,523, IF5=3,230; liczba cytowań: 6

*Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego, zaplanowaniu pracy, wykonaniu eksperymentów (in-silico), analizie wyników, napisaniu manuskryptu, pełnej edycji pracy, poprawie manuskryptu zgodnie z zaleceniami recenzentów, pełnieniu funkcji autora korespondującego.*

---

**H6. Ruszkowski, M.\*, & Dauter, Z.**

Structures of *Medicago truncatula* L-Histidinol Dehydrogenase Show Rearrangements Required for NAD<sup>+</sup> Binding and the Cofactor Positioned to Accept a Hydride.

*Scientific Reports* (2017) 7, 10476.

IF(2017)=4,122, IF5=4,576; liczba cytowań: 3

*Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego, zaplanowaniu pracy, wykonaniu eksperymentów, analizie wyników, napisaniu manuskryptu, pełnej edycji pracy, poprawie manuskryptu zgodnie z zaleceniami recenzentów, pełnieniu funkcji autora korespondującego.*

---

**H7. Ruszkowski, M.\*, Sekula, B., Ruszkowska, A., & Dauter, Z.**

Chloroplastic Serine Hydroxymethyltransferase From *Medicago truncatula*: A Structural Characterization.

*Frontiers in Plant Science* (2018) 9, 584.

IF(2018)=4,106, IF5= 5,207; liczba cytowań: 6

*Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: udziale (szacowanym na 60%) w sformułowaniu problemu badawczego, zaplanowaniu pracy, wykonaniu eksperymentów, analizie wyników, napisaniu manuskryptu, pełnej edycji pracy, poprawie manuskryptu zgodnie z zaleceniami recenzentów, pełnieniu funkcji autora korespondującego.*

---

**H8.** Sekula, B.\*, **Ruszkowski, M.**, & Dauter, Z.  
Structural Analysis of Phosphoserine Aminotransferase (Isoform 1) From *Arabidopsis thaliana*– the Enzyme Involved in the Phosphorylated Pathway of Serine Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* (2018) 9, 876.  
IF(2018)=4,106, IF5= 5,207; liczba cytowań: 4

*Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: udziale (szacowanym na 40%) w sformułowaniu problemu badawczego, zaplanowaniu pracy, wykonaniu eksperymentów, analizie wyników, napisaniu manuskryptu i jego edycji.*

---

**H9.** **Ruszkowski, M.\***  
Guarding the gateway to histidine biosynthesis in plants: *Medicago truncatula* ATP-phosphoribosyltransferase in relaxed and tense states. *Biochemical Journal* (2018) 475, 2681-2697.  
IF(2018)=4,331, IF5=4,086; liczba cytowań: 0

*Jestem jedynym autorem tej publikacji. Wykonałem całość prac związanych z jej powstaniem.*

---

**H10.** **Ruszkowski, M.\***, Sekula, B., Ruszkowska, A., Contestabile, R., Nogues, I., Angelaccio, S., Szczepaniak, A., & Dauter, Z.  
Structural basis of methotrexate and pemetrexed action on serine hydroxymethyltransferases revealed using plant models. *Scientific Reports* (2019) 9, 19614.  
IF(2018)=4,011, IF5=4,576; liczba cytowań: 1

*Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego i postawieniu hipotezy, doborze metodyki, koordynacji współpracy z grupą dra Roberto Contestabile (Uniwersytet Sapienza, Rzym), interpretacji wyników strukturalnych, ułożeniu koncepcji pracy i jej napisaniu (poza częścią opisującą badania kinetyczne), pełnej edycji pracy, poprawie manuskryptu zgodnie z zaleceniami recenzentów, pełnieniu funkcji autora korespondującego.*

---

#### **4.C. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Celem badań było poznanie na poziomie atomowym struktur przestrzennych wybranych roślinnych enzymów ze szlaków metabolicznych aminokwasów prolina, histydyliny oraz seryny. Szczególną uwagę poświęcono oddziaływaniom białek z małymi cząsteczkami o aktywności biologicznej, takimi jak: substraty, produkty, kofaktory czy regulatory aktywności. W sekcjach 4.C.1.-4.C.4. przedstawiono szczegółowe cele oraz wyniki dla poszczególnych obiektów badawczych.

##### **4.C.1. Określenie struktury przestrzennej roślinnej reduktazy $\delta^1$ -pirolino-5-karboksylianowej i wyjaśnienie molekularnych podstaw regulacji aktywności (publikacje H1-H3)**

Iminokwas L-prolina (dalej: prolina) w unikalny sposób przyczynia się do fałdowania i stabilności szkieletu struktury białek z powodu sztywnej i cyklicznej struktury łańcucha bocznego (Ge and Pan, 2009). Fizjologiczna rola prolina w komórkach roślinnych jest jednak znacznie szersza (Szabados and Savoure, 2010). U wielu gatunków roślin udowodniono szybki i odwracalny wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wolnej prolina w odpowiedzi na stres osmotyczny, oksydacyjny lub temperaturowy (Verbruggen and Hermans, 2008; Verslues and Sharma, 2010; Hayat et al., 2012; Liang et al., 2013). Ponadto, z badań wynika, że zarówno poziom wolnej prolina jak i regulacja jej metabolizmu w roślinach wpływa na przejście do kwitnienia (Mattioli et al., 2009), jak również na rozwój pyłku i zarodków (Lehmann et al., 2010; Funck et al., 2012). W związku z powyższym, prolina pełni aż trzy kluczowe role: budulcową, ochronną oraz regulacyjną.

U roślin wyższych istnieją dwie drogi metaboliczne prowadzące do produkcji prolina. Przy wysokiej dostępności azotu biosynteza prolina biegnie głównie przez ornitynę, która jest półproduktem w biosyntezie i degradacji argininy. Ornityna przekształcana jest w  $\delta^1$ -pirolino-5-karboksylian (P5C) przez zależną od fosforanu pirydoksalu (PLP) ornityno- $\delta$ -aminotransferazę (da Rocha et al., 2012). Z kolei w warunkach stresu osmotycznego i/lub niedoboru azotu, P5C jest syntetyzowany z glutaminianu przez syntazę P5C (Kishor et al., 1995; Turchetto-Zolet et al., 2009). Obydwa szlaki kończą się wspólną reakcją, w której P5C jest redukowany do prolina przez reduktazę P5C (P5C, EC 1.5.1.2). To oznacza, że w przypadku braku funkcjonalnej reduktazy P5C obie drogi biosyntezy prolina są blokowane, gdyż jak dotąd nie opisano alternatywnej ścieżki. W konsekwencji mutacje zerowe reduktazy P5C są śmiertelne dla zarodków (Funck et al., 2012), a inhibitory reduktazy P5C są fitotoksyczne, co ma potencjalne zastosowanie w poszukiwaniu nowych herbicydów (Forlani et al., 2007; Forlani et al., 2008).

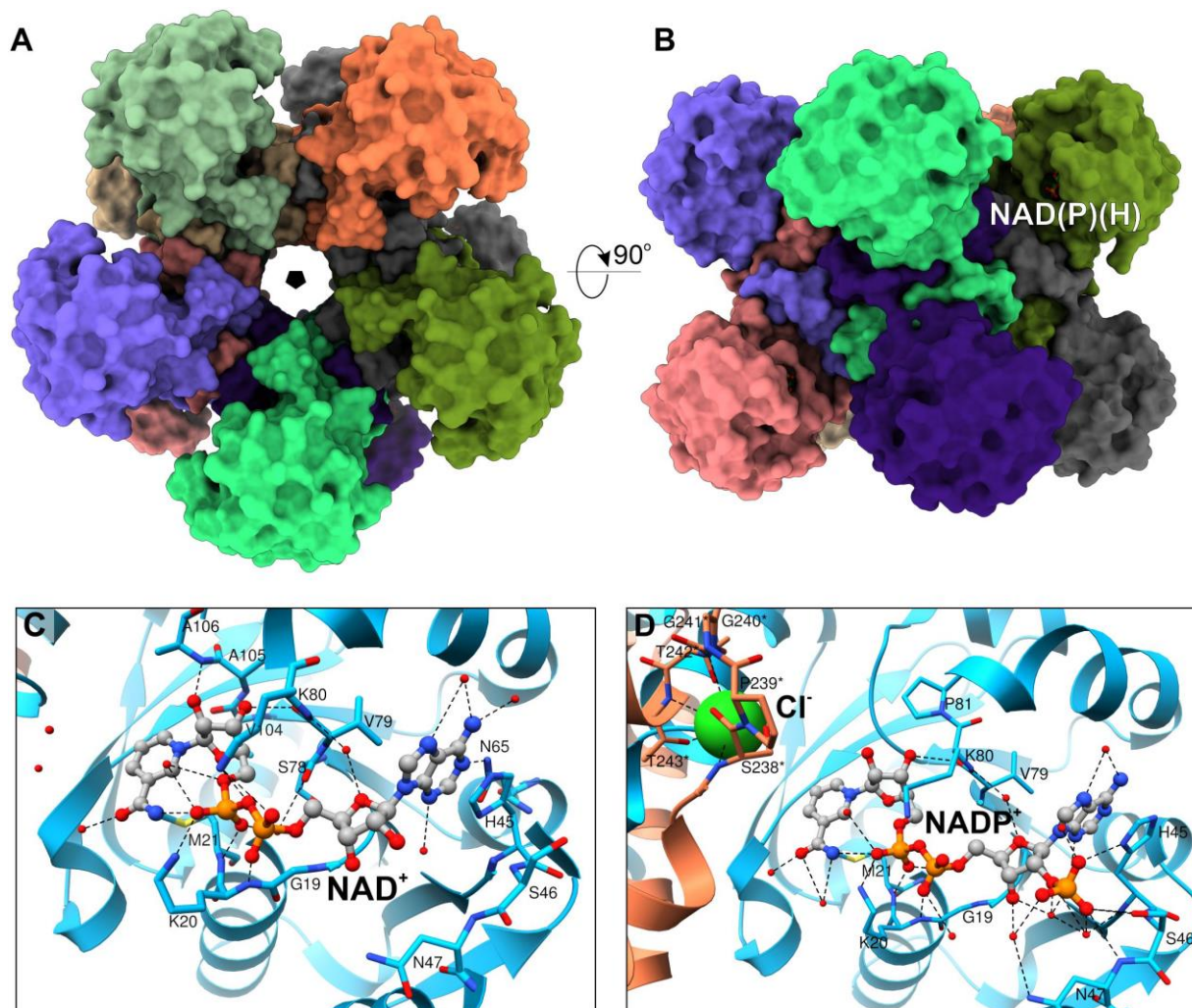
Pomimo tego, że redukcja P5C nie stanowi etapu ograniczającego szybkość biosyntezy prolina, jej ekspresja i aktywność są regulowane. Co ciekawe, poziomy prolina, reduktazy P5C oraz odpowiadające jej transkrypty mRNA są niezgodne względem siebie, przez co

upatruje się złożonego wzoru regulacji, w której stabilność mRNA, wiązanie polisomów, wpływ 5'UTR (z *ang.* untranslated regions) wydają się odgrywać kluczową rolę podczas translacji (Hua et al., 1997; Hua et al., 2001). Niewiele natomiast było wiadomo na temat molekularnych podstaw potranslacyjnej regulacji aktywności roślinnych reduktaz P5C. Aby umożliwić dogłębne poznanie i zrozumienie tych regulacji, potrzebne były trójwymiarowe struktury roślinnych reduktaz P5C.

W obliczu braku struktur krystalicznych roślinnych reduktaz P5C przeprowadziliśmy dogłębną analizę filogenetyczną tych enzymów w różnych domenach życia. Wyniki przedstawiono w publikacji H1. Pokazują one, że roślinne reduktazy P5C są bardziej podobne do enzymów z *Metazoa* niż do izoform z cyjanobakterii. Idąc dalej, roślinne reduktazy P5C charakteryzuje wysokie podobieństwo sekwencyjne. Oznacza to, że wyniki uzyskane w ramach całego celu C.1. (roślinnych reduktaz P5C) można z dużym prawdopodobieństwem ekstrapolować na inne gatunki roślin. Następnie postanowiliśmy odnaleźć ewolucyjnie zachowawcze elementy, które pozwoliłyby powiązać sekwencję z funkcją oraz regulacją roślinnych reduktaz P5C. Skorelowaliśmy więc fragmenty sekwencji tych enzymów z informacją strukturalną pochodzącą z ortologów bakteryjnych i ludzkiego. Udało się dzięki temu zaproponować minimalistyczną strukturę reduktazy P5C oraz wskazać elementy sekwencji (i struktury), które determinują formę oligomeryczną (dimer vs dekamer). Wnioski z tych porównawczych analiz stanowiły podstawę do kolejnych odkryć i publikacji w ramach celu 4.C.1.

Następnie opisaliśmy niskorozdzielczą (3,40 Å, nie zdeponowaną w Protein Data Bank, PDB) strukturę reduktazy P5C z ryżu (publikacja H2). Dzięki niej udało się rozwiązać wątpliwości dotyczące oligomeryzacji oraz przedstawić pierwszy ogólny model strukturalny roślinnej reduktazy P5C, który przypominał jeden z typów bakteryjnych reduktaz P5C (Nocek et al., 2005). Wyniki badań funkcjonalnych pokazały, że w jednoliściennym ryżu regulacja reduktazy P5C jest podobna do tej uprzednio pokazanej dla *Arabidopsis thaliana* (Giberti et al., 2014). Tak jak w przypadku większości gatunków, reduktaza P5C z ryżu była w stanie wykorzystać *in vitro* obie formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, zarówno NADH jak i NADPH. Stwierdzono jednak zaskakujący wpływ kationów i anionów w zależności od użytego koenzymu. Hamowana była tylko aktywność zależna od NADH, podczas gdy aktywność zależna od NADPH była podniesiona. Ponadto, fizjologiczne stężenia proliny i NADP<sup>+</sup> silnie hamowały reakcję zależną od NADH, podczas gdy aktywność zależna od NADPH była zmieniana tylko nieznacznie. Nasze wyniki wskazały, że *in vivo* NADPH jest jedynym koenzymem roślinnych reduktaz P5C. Co więcej, zależne od stresu zmiany w homeostazie jonów i stosunku NADPH/NADP<sup>+</sup> mogą modulować aktywność enzymu. Związana z tym regulacja akumulacji wolnej proliny i dostosowanie zużycia NADPH wydają się kluczowe, np. podczas obrony przed stresem hiperosmotycznym. Innymi słowy, indukowany stresem wzrost zawartości jonów i/lub zwiększony stosunek NADPH/NADP<sup>+</sup> natychmiast podniósłby aktywność reduktaz P5C, bez potrzeby angażowania mechanizmów kontroli ekspresji genów.

Dokładne poznanie molekularnych podstaw powyższych mechanizmów regulacji umożliwiły dopiero otrzymane przeze mnie struktury reduktazy P5C z *Medicago truncatula* (*MtP5CR*, Rys. 1), przedstawione w publikacji H3. Warto zaznaczyć, że *M. truncatula* jest modelową rośliną bobowatą. Kryształy *MtP5CR* rozpraszały promieniowanie rentgenowskie do znacznie wyższych rozdzielczości niż w przypadku enzymu z ryżu, co pozwoliło na dokładny opis nie tylko struktury samego białka, ale również jego fizjologicznie istotnych małowcząsteczkowych partnerów. Struktury krystaliczne *MtP5CR* bez liganda oraz kompleksy tego enzymu z produktami  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  i proliną zostały rozwiązane i



**Rysunek 1.** Struktura *MtP5CR*. Poszczególne podjednostki dekameru zaprezentowano jako powierzchnie w panelach A i B. Czarny pięciokąt oznacza niekrytalograficzną pięciokrotną oś symetrii. Miejsce wiązania koenzymu pokazano dla jednej podjednostki w panelu B. Szczegółowy sposób wiązania koenzymu (na bazie form utlenionych) pokazano w panelach C i D odpowiednio dla  $\text{NAD}(\text{H})$  i  $\text{NADP}(\text{H})$  (modele pręcikowo-kulkowe). Łańcuch białka przedstawiony jest jako wstążka, oprócz oddziałujących reszt aminokwasowych pokazanych jako pręciki. Czerwone kulki obrazują położenie cząsteczek wody w okolicy centrum aktywnego. Miejsce wiązania anionu chlorkowego (zielona sfera), pokazane w panelu D, pokrywa się z grupą karboksylową proliny.



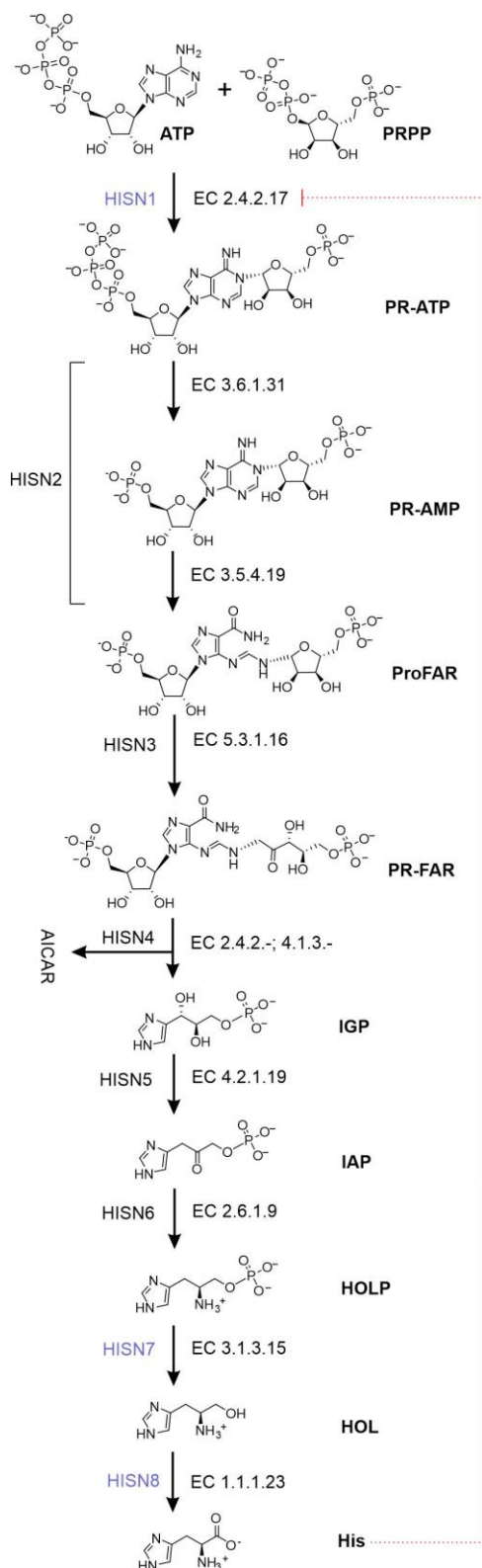
udokładnione z zastosowaniem danych dyfrakcyjnych odpowiednio przy rozdzielczości 1,7, 1,85, 1,95 i 2,1 Å. Podobnie jak reduktaza P5C z ryżu, *MtP5CR* również jest dekamerem (Rys. 1A,B). W oparciu o dane strukturalne po raz pierwszy możliwa była molekularna interpretacja preferencji roślinnych reduktaz P5C do koenzymu NADPH, a nie do NADH (Rys. 1C,D). Analiza pokazała, że wysoce zachowawcza w roślinnych reduktazach P5C pętla L3 oddziałuje z grupą fosforanową przyłączoną do O2'-rybozy NADP(H), co wyjaśniło wyższe powinowactwo do NADPH (Rys. 1D). Obserwacja strukturalna została również w ramach tej pracy zweryfikowana poprzez testy enzymatyczne *MtP5CR*, które wykazały 12-krotnie niższą wartość  $K_M$  (APP) dla NADPH niż dla NADH. Podobnie jak w przypadku enzymów z ryżu i *A. thaliana*, NADP<sup>+</sup> silnie hamował konwersję P5C do proliny w przypadku, gdy NADH był koenzymem. Dlatego biorąc pod uwagę obserwacje strukturalne sparowane z fizjologicznymi stężeniami zredukowanych i utlenionych postaci obu koenzymów, jest wysoce nieprawdopodobne, aby NADH mógł być koenzymem dla roślinnych reduktaz P5C *in vivo*.

Kolejną ważną obserwacją podczas badań reduktaz P5C było pokazanie miejsca wiązania jonów chlorkowych (Rys. 1D) w pozycji grupy karboksylowej proliny związanej w centrum aktywnym *MtP5CR* (publikacja H3). W testach *in vitro* niskie stężenia Cl<sup>-</sup> miały wpływ stymulujący na aktywność zależną od NADPH, podczas gdy wysokie stężenia Cl<sup>-</sup> hamowały *MtP5CR*. Warto podkreślić, iż identyfikacja anionu chlorkowego była możliwa dzięki danym dyfrakcyjnym zarejestrowanym przy długości fali 1,7196 Å. Mapy różnic anomalnych policzone z użyciem tych danych, wielkość pików gęstości elektronowej oraz jego chemiczne otoczenie zdecydowanie wskazały pozycję anionu chlorkowego.

Kolejną ciekawą obserwacją było znalezienie cząsteczki składnika buforu 3-(N-morfolino) propansulfonianu (MOPS) przy centrum aktywnym *MtP5CR*. W związku z tym zbadaliśmy właściwości hamujące niektórych sulfonianów. Okazało się, że inny popularny składnik buforów 2-[4-(2-hydroksyetylo)piperazyn-1-ylo]etanosulfonian (HEPES) może być obiecującym kandydatem jako początkowy szkielet w projektowaniu nowych inhibitorów roślinnych reduktaz P5C.

Warto również wspomnieć, że miejsce wiązania koenzymu, które pokazałem dla *MtP5CR*, było inne niż pokazane wcześniej dla ludzkiej reduktazy P5C (Meng et al., 2006). Wiele jednak wskazuje na to, że wynik otrzymany przez Meng i wsp. oparty był na błędnej analizie map gęstości elektronowej. Późniejsza praca (Christensen et al., 2017) zweryfikowała strukturę ludzkiego enzymu i potwierdziła, że ludzka reduktaza P5C wiąże koenzym podobnie do *MtP5CR*.

#### 4.C.2. Określenie struktur przestrzennych pierwszego i dwóch ostatnich enzymów szlaku biosyntezy histydyny u roślin oraz oddziaływań tych białek z małymi cząsteczkami o aktywności biologicznej (publikacje H4, H5, H6, H9)



Wieloetapowy szlak biosyntezy L-histydyny (dalej: histydyny) jest częścią pierwszorzędowego anabolizmu archeonów, bakterii, niższych eukariontów i roślin. Szlak rozpoczyna się od 5-fosforybozylo-1-pirofosforanu (PRPP) i trójfosforanu adenozy (ATP), co jednocześnie łączy metabolizm aminokwasów i nukleotydów (Fink, 1964; Winkler, 1996). U roślin występuje osiem enzymów, dla uproszczenia nazywanych kolejno HISN1-8, przy pominięciu rzeczywistych funkcji katalitycznych (Rys. 2). Pierwszy enzym szlaku (HISN1) jest hamowany allosterycznie przez produkt końcowy (histydynę) która kontroluje wydajność szlaku na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego (Stepansky and Leustek, 2006). Kolejne enzymy szlaku (HISN2-8) katalizują dziesięć reakcji (Rys. 2), dzięki temu, że HISN2, HISN4 i HISN8 są dwufunkcyjne (Stepansky and Leustek, 2006).

W porównaniu do odpowiedników bakteryjnych nasza wiedza o roślinnych enzymach biosyntetyzujących histydynę jest znacznie ograniczona. Moje badania były skierowane na wypełnienie tej luki w wiedzy. Co ciekawe, enzymy z różnych królestw są często dość odległymi homologami albo nawet należą do niepowiązanych rodzin. Oznacza to, że pomimo podobnej ogólnej organizacji szlaków biosyntezy histydyny, istnieją znaczne różnice pomiędzy bakteryjnymi i roślinnymi enzymami. Idąc dalej, należy podkreślić, że zwierzęta (i ludzie) nie syntetyzują histydyny – jest ona aminokwasem egzogennym. Oznacza to, że szlak biosyntezy histydyny wydaje się obiecującym celem dla projektowania np. antybiotyków, herbicydów i środków

**Rysunek 2.** Roślinny szlak biosyntezy histydyny. Osiem enzymów (HISN1-8) katalizuje jednaście reakcji (HISN2,4,8 są dwufunkcyjne). HISN1 jest allosterycznie hamowany przez histydynę.

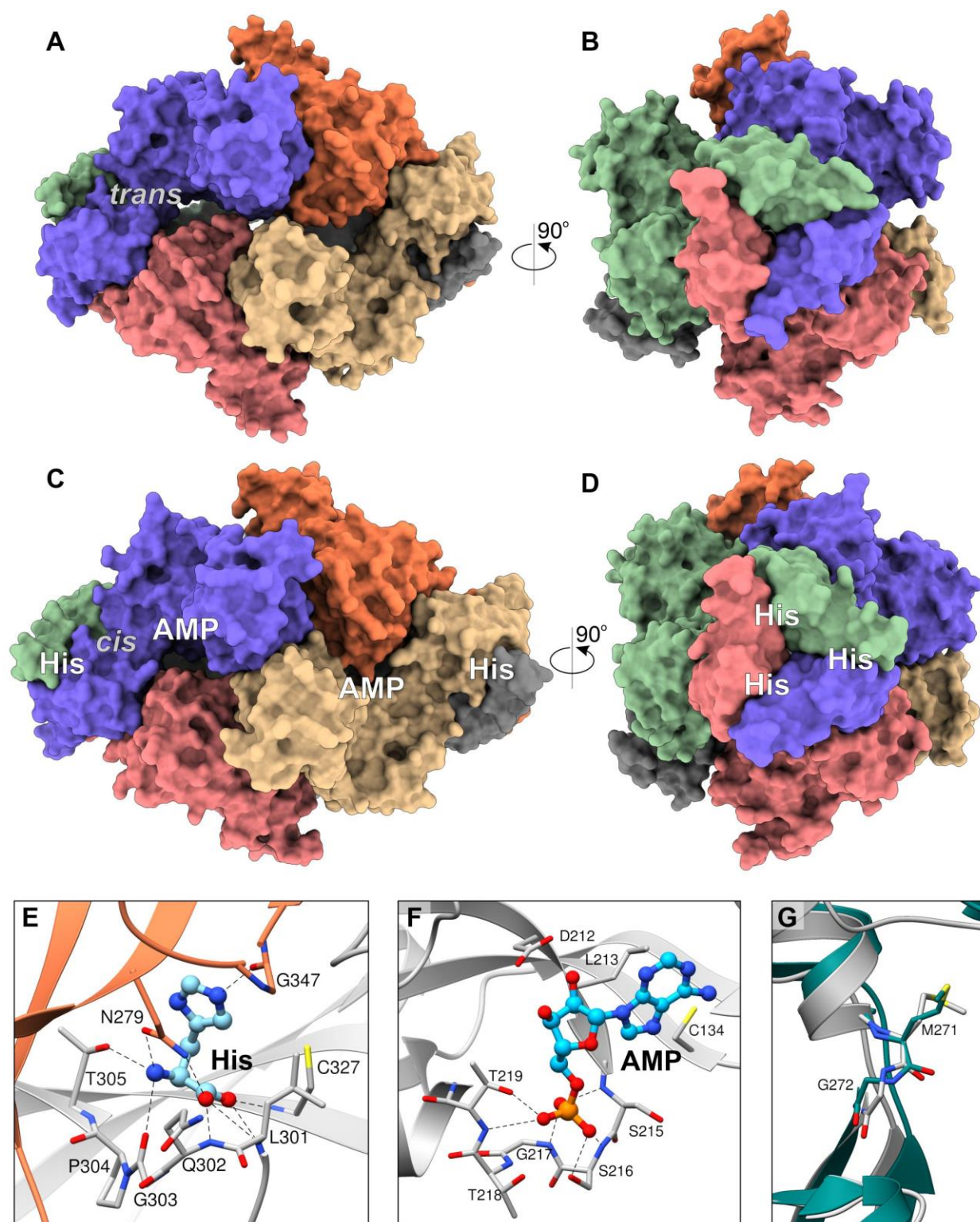
przeciwgrzybiczych (Gohda et al., 2001; Lunardi et al., 2013; Jastrzebowska and Gabriel, 2015). Bakterie są jednak zdolne pozyskiwać histydynę z otoczenia (Bender, 2012), co zmniejsza zainteresowanie tym szlakiem w kontekście projektowania antybiotyków. Pozyskiwanie histydyny przez rośliny jest jednak znacznie trudniejsze, więc rozwijanie herbicydów blokujących HSN1-8 można traktować jako obiecujące. Co więcej, u roślin enzymy szlaku biosyntezy histydyny zazwyczaj są kodowane przez pojedyncze geny (Stepansky and Leustek, 2006; Ingle, 2011). Warto tu również zauważyć, że blokowanie różnych etapów szlaku biosyntetycznego nie tylko wstrzymuje tworzenie produktu końcowego (tutaj histydyny), ale także powoduje nagromadzenie produktów pośrednich. Takie podejście może zwiększyć efekt toksyczny. Na przykład ortolog HSN8 w *Mycobacterium tuberculosis* został uznany za jeden z 50 najlepszych celów molekularnych u szczepów całkowicie lekoopornych (Aguero et al., 2008).

W swojej pracy opisałem struktury trzech enzymów szlaku biosyntezy histydyny z *M. truncatula* HSN1 (publikacja H9), HSN7 (publikacja H4) i HSN8 (publikacja H6). Poza moją pracą tylko struktury HSN5 z *Arabidopsis thaliana* zostały opublikowane przez inną grupę (Glynn et al., 2005; Bisson et al., 2015). Dzięki moim badaniom ukazano nowe cechy enzymów, nigdy nie obserwowane dla bakteryjnych homologów.

Enzymy biosyntetyzujące histydynę w roślinach są zlokalizowane w chloroplastach, jednak ich sekwencje kodowane są przez genomowe DNA, co zwiększa złożoność projektu. Jest to spowodowane koniecznością eliminowania peptydów sygnałnych, które są nieuporządkowane, a przez to utrudniałyby badania strukturalne. Znalezienie optymalnego punktu odcięcia musi z jednej strony wyeliminować nieuporządkowany N-koniec, a z drugiej pozostawić nienaruszoną strukturę enzymu dla zachowania funkcji biologicznej. *In vivo* peptydy sygnałne są również obcinane. Niestety, bioinformatyczne przewidywanie punktu odcięcia często zawodzi, przez co wiele konstruktów białkowych należy sprawdzić eksperymentalnie i zoptymalizować.

Na pierwszym etapie biosyntezy histydyny, ATP i PRPP w obecności enzymów HSN1 o aktywności transferazy fosforybozylo-ATP (ATP-PRT, EC 2.4.2.17), tworzą fosforybozo-ATP (PR-ATP, Rys. 2). Enzymy ATP-PRT podlegają hamowaniu zwrotnemu przez histydynę, która allosterycznie wiąże się między domenami regulatorowymi. Roślinne ATP-PRT są podobne do jednego z dwóch typów ich odpowiedników bakteryjnych, mianowicie do tzw. długich ATP-PRT. W wyniku swoich badań scharakteryzowałem biochemicznie i strukturalnie ATP-PRT z *Medicago truncatula* (*Medtr*ATP-PRT1, Rys. 3, publikacja H9). Co ważne, są to, jak dotychczas, jedyne struktury enzymu ATP-PRT z organizmu eukariotycznego, a rozwiązałem je eksperymentalnie za pomocą metody dyfrakcji anomalnej przy pojedynczej długości fali (*ang.* single-wavelength anomalous diffraction, SAD) (Hendrickson et al., 1989), wykorzystując kryształy białka znakowanej selenometioniną.

Otrzymane przeze mnie dwie struktury krystaliczne, prezentujące homoheksameryczny enzym w formie luźnej (*z ang.* relaxed, R-, Rys. 3A,B) i w formie zwartej



**Rysunek 3.** Struktura *MedtrATP-PRT1* (MthISN1). Forma luźna (panele A, B) i zwarta (C,D) tego homoheksamerycznego enzymu pokazana jest z prostopadłych ujęć z podjednostkami przedstawionymi jako różnokolorowe powierzchnie. Zaznaczono również miejsca wiązania histydyny (allosteryczne), AMP, oraz region „zawiasu”, gdzie dochodzi do zmiany konformacji głównego łańcucha peptydowego (*trans-cis*). Szczegóły oddziaływań His, AMP oraz zmianę *cis-trans* pokazano w odpowiednich panelach E-G.

(z *ang. tense*, T-, Rys. 3C,D), czyli związanej z histydyną i AMP (Rys. 3E,F), pozwoliły zaobserwować kluczowe cechy *Medtr*ATP-PRT1. Przejściu pomiędzy stanem R- i T-towarzyszą wyraźne zmiany konformacyjne, które obejmują ruchy całych domen i swego rodzaju „zamykanie” enzymu (Rys. 3A-D). Ta zmiana konformacji jest również związana z odwróceniem wiązania peptydowego z konformacji *trans* na *cis* (pomiędzy Met271 i Gly272, Rys. 3G) w regionie „zawiasu” *Medtr*ATP-PRT1. C-końcowa  $\alpha$ -helisa, nieobecna w bakteriach, wzmacnia „zawias”, który tworzą dwa fragmenty łańcucha polipeptydowego. W rezultacie konformacje stanów R i T znacznie różnią się od odpowiadających im stanów bakteryjnych enzymów ATP-PRT o znanych strukturach trójwymiarowych. Ma to bardzo duże znaczenie przy projektowaniu małych cząsteczek mających stymulować bądź hamować aktywność roślinnych HSN1 w sposób specyficzny. Opcja stymulowania HSN1 jest bardzo ciekawa, ponieważ pokazano, że podniesione stężenie komórkowe wolnej histydyny, która może chelatować metale ciężkie, zwiększa np. tolerancję na nikiel u *A. thaliana* (Wycisk et al., 2004). Dzięki temu rośliny o wysokiej zawartości wolnej histydyny mogłyby być stosowane do fitoremediacji, tj. do usuwania zanieczyszczeń z gleby.

Ważną obserwacją na bazie T-*Medtr*ATP-PRT1 było zlokalizowanie 5'-monofosforanu adenozyliny (AMP) w miejscu aktywnym (Rys 3F). Sposób wiązania jest dość podobny do pokazanego dla białek bakteryjnych i jest zgodny z kompetycyjnym modelem inhibicji przez AMP. Choć sam AMP nie powodował inhibicji w moich badaniach kinetycznych, to obecność AMP nawet pięciokrotnie zwiększała czułość na histydynę. Innymi słowy, AMP wywoływało jedynie efekt synergistyczny w obecności histydyny. Regulacja aktywności w zależności od AMP pozwala komórkom kontrolować kosztowną metabolicznie produkcję histydyny w odpowiedzi na zmiany stosunku ATP/AMP, który z kolei odzwierciedla ich stan metaboliczny.

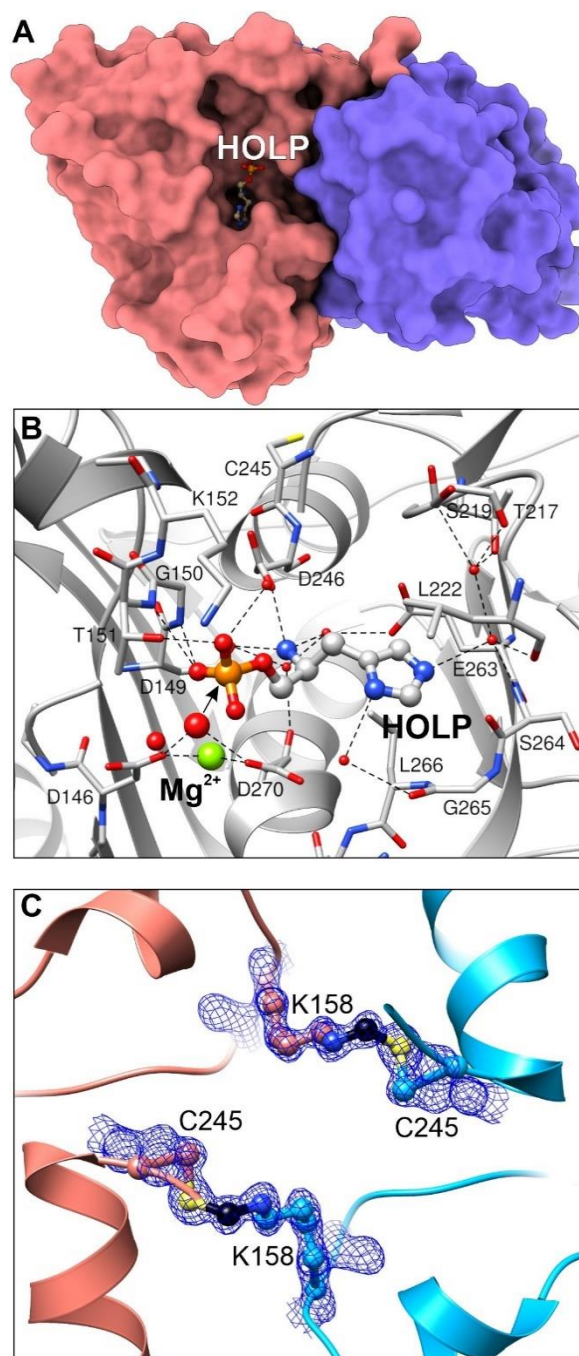
Kolejne scharakteryzowane przeze mnie białko z roślinnego szlaku biosyntezy histydyny (publikacja H4), HSN7 to fosfataza fosforanu histydynolu (z *ang. histidinol phosphate phosphatase*, HPP, EC 3.1.3.15). HPP to przedostatni enzym w tym szlaku metabolicznym (Rys. 2). Katalizuje on defosforylację fosforanu L-histydynolu (HOLP) do L-histydynolu. HPP zostały w roślinach odkryte stosunkowo niedawno. Bardzo ciekawy jest fakt, że roślinne HPP wyewoluowały z zupełnie innej rodziny białek niż większość bakteryjnych HPP (Petersen et al., 2010; Ruszkowski and Dauter, 2016). Roślinne HPP są spokrewnione z fosfatazami monofosforanu inozytolu (IMPazami). W swojej pracy zidentyfikowałem HPP z *M. truncatula* (*Mt*HPP), bazując na najwyższej identyczności sekwencji z enzymem *A. thaliana*. Aktywność enzymatyczną zweryfikowałem poprzez testy biochemiczne, które pozwoliły na wyznaczenie parametrów kinetycznych. *Mt*HPP jest zdolny do hydrolizy nieorganicznego fosforanu z HOLP, ale nie z fosforanu D-*myo*-inozytolu, głównego substratu klasycznych IMPaz.

Bazując na strukturach krystalicznych, odniosłem mechanizm katalizy enzymatycznej, zaprezentowany wcześniej dla IMPaz i dopasowałem do roślinnego HPP

(Rys. 4A,B). Domena N-terminalna, odpowiedzialna za katalizę, jest bardziej zbliżona do katalitycznego fragmentu IMPaz. Z kolei C-terminalna domena, znacznie różniąca się od IMPaz, odpowiada za specyficzną rozpoznawania substratu, tj. pozwala enzymom rozróżnić HOLP od fosforanu *D-myo*-inozytolu. W swojej pracy zaproponowałem, iż obecność zachowanego u roślin asparaginianu (Asp246 w *MtHPP*) pozwala *MtHPP* na specyficzne wiązanie HOLP (Rys. 4B).

*MtHPP* w roztworze tworzy homodimery (Rys. 4A), co stwierdziłem na podstawie filtracji żelowej i analizy kontaktów w sieci krystalicznej z zastosowaniem serwera PISA (Krissinel and Henrick, 2007). W strukturze *MtHPP* zaobserwowałem niezwykle międzycząsteczkowe wiązanie pomiędzy resztami cysteiny jednej podjednostki dimeru i lizyny z drugiej podjednostki (Rys. 4C). Poddanie kryształów HISN7 kontaktowi z parami formaldehydu, który jest znany z sieciowania pierwszorzędowych amin i tioli, posłużyło jako walidacja natury chemicznej tych „mostków”. Wyniki wskazują, że łańcuchy boczne lizyny i cysteiny łączy grupa metylenowa. Funkcja tego kowalencyjnego mostka jest trudna do interpretacji. Natomiast ich obecność w *MtHPP* zainspirowała mnie do poszukania podobnych wiązań w innych białkach. W PDB zidentyfikowaliśmy liczne przykłady podobnych mostków w białkach, które są ze sobą niespokrewnione (publikacja H5). Co warto podkreślić, w każdym przypadku mostki te zostały pominięte, zarówno w zdeponowanych modelach jak i publikacjach.

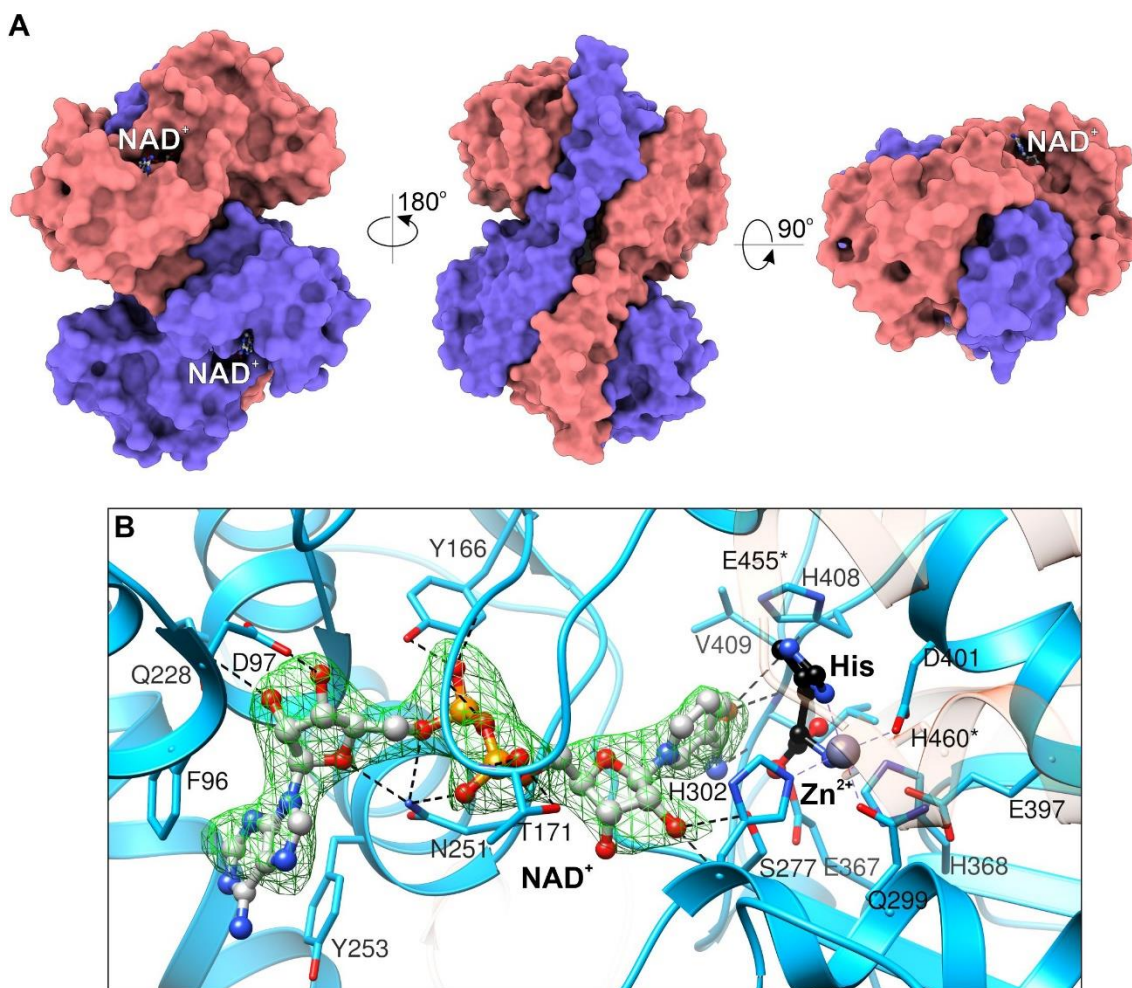
Należy tutaj zwrócić uwagę, iż niedawno ukazała się publikacja krytykująca nasze badania na temat mostków Lys-CH<sub>2</sub>-Cys (Wang, 2019). Dr Wang, używając metod



**Rysunek 4.** Struktura *MtHPP* (*MtHISN7*). W panelu A pokazano dimer *MtHPP*, z miejscem aktywnym zaznaczonym przez pozycję substratu, fosforanu L-histydynolu (HOLP). Szczegółowe wiązanie HOLP, z zaznaczeniem oddziałujących reszt aminokwasowych, pokazano w panelu B. Panel C ilustruje mostki Lys-CH<sub>2</sub>-Cys na interfejsie pomiędzy podjednostkami *MtHPP*; pokazano mapę gęstości elektronowej  $2mF_o-DF_c$  na poziomie  $2\sigma$ .

obliczeniowych, zaproponował, że to atomy tlenu wiążą lizyny i cysteiny, tzn. wiązanie Lys-O-Cys. Krótco po jej ukazaniu wydaliśmy odpowiedź na łamach czasopisma Protein Science (Ruszkowski and Dauter, 2019). Wskazaliśmy w niej kluczowe przeoczenie ze strony dra Wang, który swoich analiz dokonał na naszej strukturze z kryształu traktowanego formaldehydem, co sugeruje niepoprawność zastosowanej metody. Ważne jest również, iż jak dotychczas nie zostały pokazane układy wiązań C-N-O-S-C w żadnych trwałych związkach chemicznych, podczas gdy układów C-N-CH<sub>2</sub>-S-C jest bardzo wiele.

Ostatni enzym szlaku biosyntezy histydyny, czyli HISN8 katalizuje dwie reakcje utleniania L-histydynolu do aldehydu histydynowego i dalej do histydyny (Rys. 2). Jest więc dehydrogenazą L-histydynolu (z ang. histidinol dehydrogenase, HDH, EC 1.1.1.23). HDH do



**Rysunek 5.** Struktura MthDH (MthISN8). Trzy orientacje homodimeru MthDH zaprezentowano w panelu A, z zaznaczeniem miejsc wiązania koenzymu (NAD<sup>+</sup>). Szczegóły oddziaływania z NAD<sup>+</sup> (szary) i histydyną (His, czarny model kulkowo-pręcikowy) pokazano w panelu B. Pokazane położenie histydyny odpowiada położeniu substratu, L-histydynolu (HOL, nie pokazano), zidentyfikowanemu w kolejnej strukturze. Zielona siatka wokół koenzymu to mapa gęstości elektronowej typu OMIT (mFo-DFc) na poziomie 4  $\sigma$ .

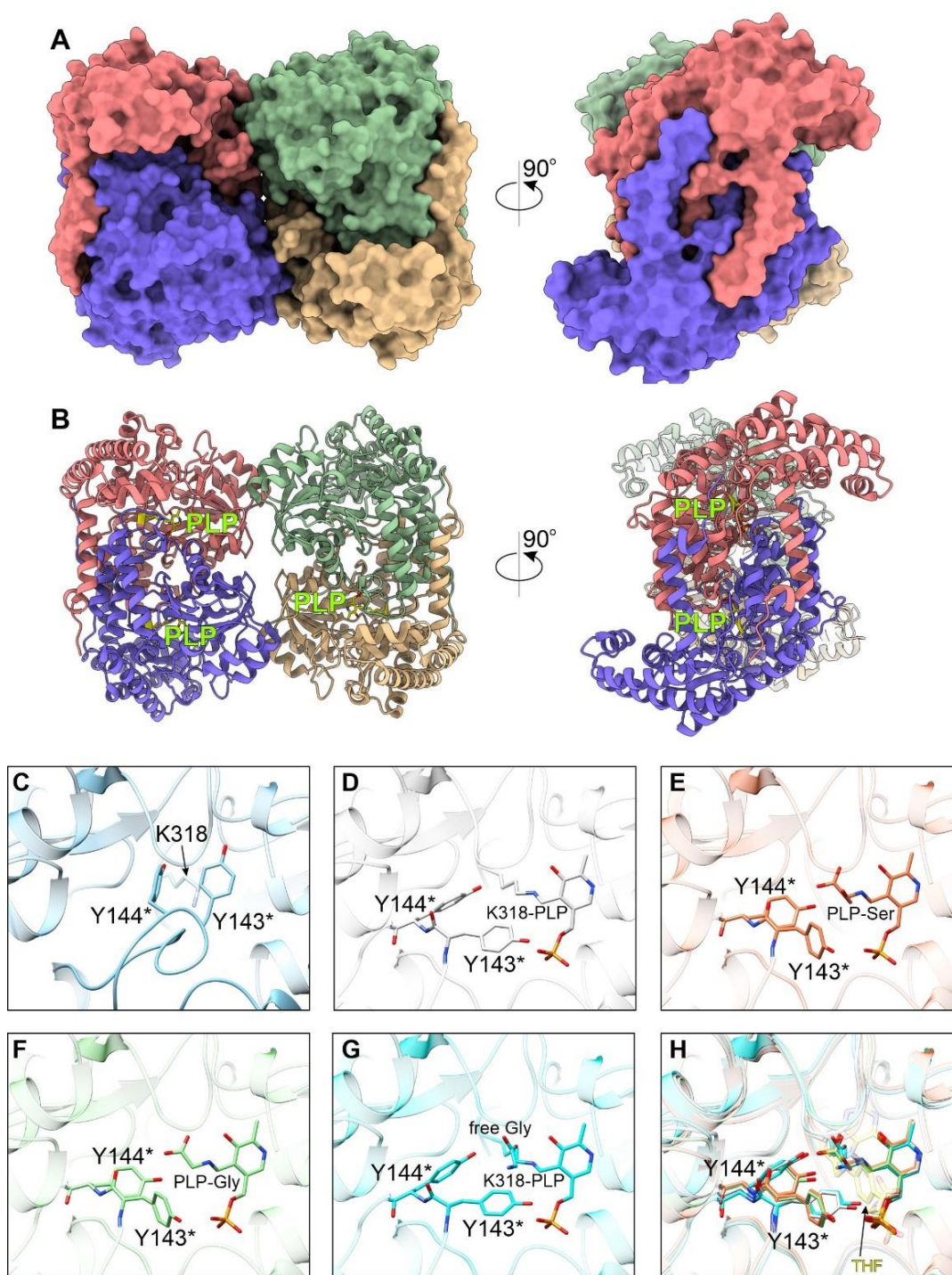
katalizy zużywa dwie cząsteczki  $\text{NAD}^+$  na każdy cykl. Jako reprezentanta roślinnych HDH wybrałem enzym z *M. truncatula* (*MtHDH*), który wykryłem w trzech kompleksach: (i) z imidazolem, (ii) z histydynolem oraz (iii) w kompleksie z  $\text{NAD}^+$  i histydyną (publikacja H6). Już na podstawie sekwencji można było zauważyć, że podobieństwo pomiędzy roślinnymi i bakteryjnymi ortologami HSN8 jest znacznie wyższe niż np. w przypadku enzymów HSN7. Struktury *MtHDH* (Rys. 5A) potwierdziły podobieństwo do bakteryjnych HDH. Niemniej jednak, oprócz pierwszej roślinnej struktury HDH, po raz pierwszy udało mi się pokazać reorganizację enzymu towarzyszącą wiązaniu koenzymu  $\text{NAD}^+$ . Co więcej, zademonstrowałem niejasne wcześniej, katalitycznie istotne umiejscowienie koenzymu, tzn. takie, które umożliwiłoby przekazanie anionu wodorkowego z histydynolu na  $\text{NAD}^+$  (Rys. 5B). Ma to bardzo duże znaczenie, ponieważ jak dotychczas najbardziej skuteczne inhibitory bakteryjnych HDH miały wiązać się częściowo w miejscu histydynolu a częściowo koenzymu.

#### **4.C.3. Określenie struktur przestrzennych hydroksymetylotransferazy serynowej oraz aminotransferazy fosfoserynowej (publikacje H7 i H8)**

Również L-seryna (dalej: seryna) ma znacznie szersze funkcje metaboliczne niż jako składnik budulcowy białek. Spośród nich, szczególnie interesujące jest wytwarzanie fragmentów jednowęglowych (Kalhan and Hanson, 2012; Ros et al., 2014). Fragmenty jednowęglowe są wymagane do syntezy kluczowych metabolitów, takich jak np. tymidylan czy metionina. Większość fragmentów jednowęglowych w komórce powstaje wskutek aktywności hydroksymetylotransferaz serynowych (SHMT, EC 2.1.2.1). SHMT odwracalnie przekształca serynę w glicynę podczas przeniesienia grupy metylenowej na tetrahydrofolian (THF), w wyniku czego powstaje 5,10-metylenotetrahydrofolian (5,10-meTHF). 5,10-meTHF jest bezpośrednim przenośnikiem fragmentów jednowęglowych, wykorzystywanym przez enzymy wielu szlaków metabolicznych. Istnieje ścisły związek pomiędzy metabolizmem seryny a regulacją proliferacji komórek i nowotworzeniem (Amelio et al., 2014a; Amelio et al., 2014b; Antonov et al., 2014; Labuschagne et al., 2014). Co więcej, wiele dowodów zgodnie wskazuje, że właśnie aktywność SHMT jest kluczowa dla szybko proliferujących komórek (Girgis et al., 1997; Townsend et al., 2004; Wu et al., 2017). Wysokie znaczenie tych enzymów odzwierciedla fakt, że na enzymy SHMT nakierowane jest projektowanie środków przeciwnowotworowych, antybiotyków i herbicydów. Stawia to wyniki moich badań w szerszym świetle niż metabolizm roślin.

Rośliny zawierają izoformy SHMT w cytozolu, mitochondriach, chloroplastach i jądrach (Zhang et al., 2010). Dla porównania, u ludzi występują tylko formy cytozolowe i mitochondrialne. Takie zróżnicowanie jest interesujące ze względu na potencjalną możliwość projektowania małowcząsteczkowych inhibitorów, specyficznym nakierowanych na konkretne izoformy SHMT.





**Rysunek 6.** Struktura MtSHMT3. Homotetramery MtSHMT3 pokazano jako powierzchnie w panelu A oraz z zaznaczeniem elementów struktury drugorzędowej (wstążki) w panelu B. Położenie grupy prostetycznej, fosforanu pyridoksalu (PLP) wskazuje lokalizację miejsc aktywnych. Panele C-H przedstawiają zmiany konformacyjne (ze szczególnym naciskiem na Tyr143\* i Tyr144\*) podczas poszczególnych etapów reakcji: (C) nieaktywna forma bez PLP; (D) aktywna podjednostka – wewnętrzna aldimina PLP-Lys; (E) zewnętrzna aldimina PLP-Ser; (F) zewnętrzna aldimina PLP-Gly; (G) wewnętrzna aldimina PLP-Lys z wolną glicyną. Panel H pokazuje nałożenie etapów, a żółty, półprzezroczysty model THF pochodzi z nałożenia struktury mysiego SHMT (PDB ID: 1eji, (Szebenyi et al., 2000)).

W publikacji H7 zaprezentowałem strukturę *MtSHMT3* z chloroplastów *M. truncatula*. Rozwiązałem ją, stosując nowatorskie podejście do rozwiązywania problemu fazowego poprzez nasączenie kryształów selenomocznikiem (Luo, 2016), a następnie stosując protokół SAD (Hendrickson et al., 1989). *MtSHMT3* w roztworze tworzy tetramer. Tak jak inne białka SHMT należy do klasy  $\alpha$  enzymów zależnych od PLP (Rys. 6A,B). *MtSHMT3* wiąże grupę prostetyczną PLP w centrum dużej domeny, czemu towarzyszą wyłącznie lokalne zmiany konformacyjne (Rys. 6C). Dla porównania, w ludzkim izoenzymie mitochondrialnym (hmSHMT) zaobserwowano znaczne reorganizacje domen i zmianę formy oligomerycznej podczas wiązania PLP, podczas gdy dla ludzkiej izoformy cytozolowej (hcSHMT) zauważono jedynie lokalne zmiany (Giardina et al., 2015).

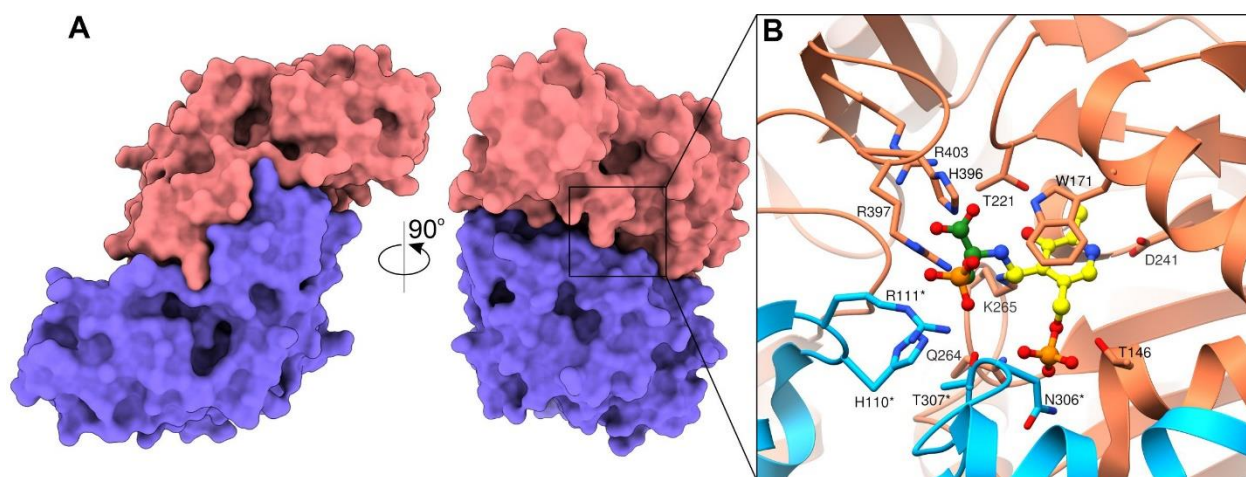
Następnie, na podstawie struktur krystalicznych, otrzymanych w wyniku nasączenia kryształów *MtSHMT3* seryną (pod nieobecność THF), pokazałem stany pośrednie reakcji niezależnej od THF (Rys. 6D-H). Przebieg reakcji stanowił dowód, że enzym zachował aktywność w kryształach. Kompleks z zewnętrzną aldiminą PLP-seryna ujawnił unikalną konformację, gdzie grupa hydroksylowa PLP-seryny tworzy wiązanie wodorowe z Tyr144\* (\* oznacza resztę aminokwasową z symetrycznej podjednostki) i jest w konformacji synperiplanarnej do karboksylowego atomu węgla PLP-seryny. Taka konformacja sugeruje, że Tyr144\*, aktywowana przez grupę karboksylową PLP-seryny (deprotonacja  $O\eta$ ), może być zasadą odrywającą proton w niezależnej od THF reakcji.

Bardzo ciekawa nowa cecha zaobserwowana na podstawie szeregu struktur *MtSHMT3* to jednoczesny ruch Tyr143\* i Tyr144\* skorelowany z etapem reakcji enzymatycznej. Udało mi się pokazać, że Tyr143\* przyjmuje konformację gotową do związania THF w stanach, w których ten kosubstrat jest wymagany w miejscu aktywnym (zewnętrzne aldiminy PLP-seryna i PLP-glicyna). Z drugiej strony, w kompleksach wewnętrznej aldiminy PLP (i z wolną glicyną) łańcuch boczny Tyr143\* jest obrócony o około  $90^\circ$ , co zapobiegałoby wiązaniu THF. Ta skoordynowana zmiana konformacyjna tyrozyn powinna zostać uwzględniona przy projektowaniu inhibitorów SHMT. Co więcej, roślinne SHMT są bardziej podobne do ssaczy izoform niż do homologów bakteryjnych. Pozwala to przypuszczać, że uzyskane wyniki, w tym funkcja odpowiedników konserwatywnych Tyr143-144, mogą również odnosić się np. do ludzkich enzymów.

W temacie enzymów zaangażowanych w metabolizm seryny zbadaliśmy i opisaliśmy także kolejny enzym, mianowicie aminotransferazę fosfoserynową (PSAT) z *A. thaliana* (publikacja H8). Zaprezentowane przez nas struktury krystaliczne *AtPSAT1* dostarczają szczegółowych informacji na temat konwersji 3-fosfohydroksypirogronianu w fosfoserynę. Poszerzają one więc naszą wiedzę na temat tzw. fosforylowanej ścieżki biosyntezy seryny w roślinach.

*AtPSAT1* jest dimerycznym enzymem zależnym od PLP. Podobnie jak inne aminotransferazy typu  $\alpha$ , *AtPSAT1* wiąże grupę prostetyczną (PLP) wewnątrz dużej domeny (Rys. 7). Otrzymane w ramach projektu trzy struktury krystaliczne *AtPSAT1* na różnych etapach katalizy pokazały kolejno wewnętrzną aldiminę PLP, kompleks z fosforanem

pirydoksaminy (PMP) oraz pośredni stan geminalnej diaminy PLP-fosfoseryna (Rys. 7B). Dzięki tym strukturom mogliśmy precyzyjnie prześledzić zmiany konformacyjne w sąsiedztwie katalitycznej lizyny, które towarzyszą transformacji z wewnętrznej aldiminy do kompleksu PMP. Pokazaliśmy także zamkniętą konformację pętli, niezbędną do stabilizacji geminalnej diaminy. Przejście od otwartej do zamkniętej konformacji pętli najprawdopodobniej stabilizuje związaną 3-fosfohydroksypirogonianu, a po reakcji ułatwia dysocjację fosfoseryny.



**Rysunek 7.** Struktura AtPSAT. Dwie orientacje homodimeru zaprezentowano w panelu A; pozycja miejsca aktywnego (ukrytego pod powierzchnią) jest zaznaczona przez czarny prostokąt w prawej części panelu. Szczegółowe oddziaływanie pokazano w panelu B dla formy geminalnej diaminy PLP-fosfoseryna (model pręcikowo-kulkowy; atomy węgla są żółte dla PLP a zielone dla fosfoseryny).

#### 4.C.4. Określenie sposobu wiązania chemioterapeutyków antyfolianowych przez cytozolową i mitochondrialną izofর্মę hydroksymetylotransferazy serynowej (publikacja H10)

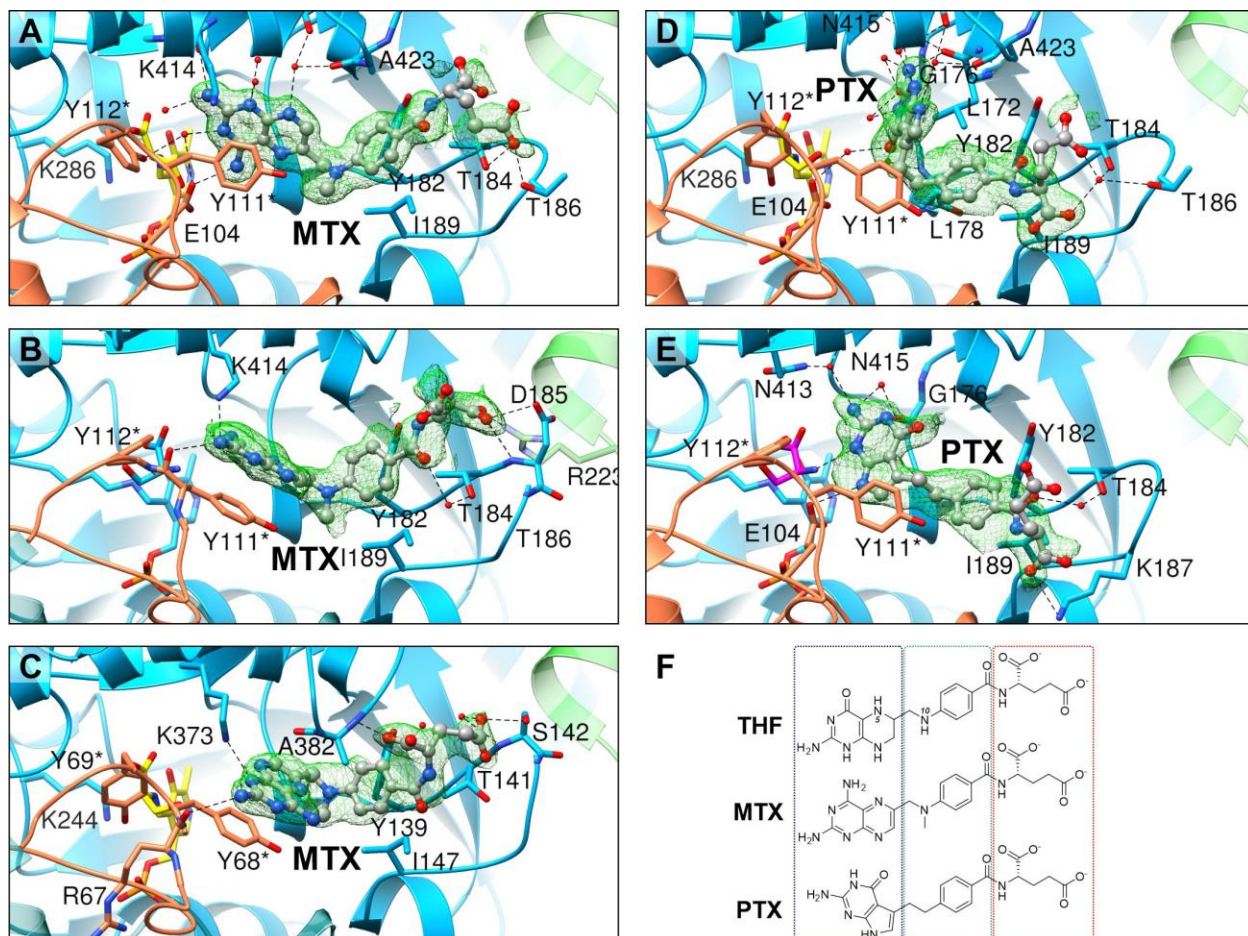
Jak powyżej wspomniano, hydroksymetylotransferazy serynowe (SHMT) odwracalnie przekształcają serynę w glicynę w reakcji, której towarzyszy konwersja THF w 5,10-meTHF. *In vivo* 5,10-meTHF jest głównym nośnikiem jednostek jednowęglowych, które komórki wykorzystują do biosyntezy nukleotydów jak i do innych kluczowych procesów. Powiązane szlaki biosyntetyczne są hiperaktywowane w komórkach nadmiernie proliferujących (np. w tkankach rakowych). Dlatego SHMT są celem dla rozwoju nowych chemioterapeutyków, ponieważ bardzo prawdopodobne jest zahamowanie wzrostu komórek rakowych poprzez ograniczenie puli dostępnego 5,10-meTHF.

Metotreksat (MTX) i pemetreksed (PTX) to dwa przykłady antyfolianów, które stosowane są jako chemioterapeutyki w leczeniu wielu rodzajów nowotworów. Ich celem molekularnym są inne enzymy związane z cyklem folianowym, przede wszystkim reduktaza dihydrofolianowa i syntaza tymidylanowa. W swojej pracy zaprezentowałem struktury

krystaliczne roślinnych białek SHMT z cytozolu i mitochondriów w kompleksach z MTX i PTX (publikacja H10, Rys. 8). Ludzkie izozymy istnieją w tych samych przedziałach komórkowych, jednak trudniej krystalizują, a ich kryształy rozpraszają wiązkę promieniowania rentgenowskiego do niższych rozdzielczości, co utrudnia interpretację map gęstości elektronowej. Dzięki współpracy z grupą dra Roberto Contestabile (Uniwersytet Sapienza, Rzym) udało się nam pokazać hamowanie badanych SHMT przez MTX i PTX poprzez analizę kinetyczną. Warto podkreślić, że roślinne izozymy cytozolowy i mitochondrialny wykazywały się podobnymi cechami do ludzkich SHMT z tych samych przedziałów komórkowych. Otrzymane struktury krystaliczne pokazały natomiast w sumie trzy sposoby wiązania MTX (Rys. 8A-C) oraz dwa dla PTX (Rys. 8D,E). Bardzo ciekawą obserwacją była kluczowa rola pary tyrozyn odpowiadających przedstawionym powyżej (publikacja H7, Rys. 6H) w wiązaniu antyfolianów. Na podstawie struktur udało się stwierdzić, że PTX tworzy więcej oddziaływań z enzymem, co potwierdzają silniejsze właściwości inhibicyjne. Można więc stwierdzić, że PTX jest lepszym kandydatem początkowym w rozwoju nowych antyfolianów nakierowanych na SHMT.

W komórce foliany i antyfoliany ulegają poliglutamylacji, która powoduje zatrzymanie ich w przedziałach komórkowych, równocześnie zwiększając ich powinowactwo do enzymów. W związku z tym jest wysoce prawdopodobne, że *in vivo* poliglutamylowany PTX hamuje SHMT. Co więcej, rozwój leków zaczynający się od uznanych leków daje dużą szansę na powodzenie. Takie podejście jest poparte cytatem Sir James Whyte Black'a, odkrywcy propranololu i cymetydyny, który powiedział, że najbardziej owocną podstawą do odkrycia nowego leku jest rozpoczęcie od starego leku (z *ang.* „the most fruitful basis for the discovery of new drug is to start with an old drug”).

Pragnę tutaj zaznaczyć, że po zakończeniu prac nad manuskryptem opisującym powyższe wyniki, już w trakcie recenzji ukazała się publikacja pokazująca kompleksy ludzkiego białka hmSHMT z PTX i lometrexolem (Scaletti et al., 2019). Obrazuje to dużą konkurencję oraz dynamiczny postęp na froncie poszukiwania i projektowania chemioterapeutyków nakierowanych na enzymy SHMT.



**Rysunek 8.** Wiązanie metotreksatu (MTX) i pemetreksedu (PTX) przez roślinne izoformy hydroksymetylotransferazy serynowej (SHMT). Panele A, B, D oraz E przedstawiają izoformę mitochondrialną (*AtSHMT2*); izoforma cytozolowa (*AtSHMT4*) jest pokazana na panelu C. Zielone siatki pokazują mapy gęstości elektronowej typu polder na poziomie  $4.5 \sigma$ , policzone w objętości  $5 \text{ \AA}$  od ligandów. Wolna seryna (panele B i E) jest zaznaczona na fioletowo. Wzory strukturalne naturalnego substratu (tetrahydrofolianu, THF) oraz MTX i PTX zaprezentowano w panelu F.

#### **4.D. Podsumowanie najważniejszych osiągnięć habilitanta w przedstawionym cyklu publikacji**

1. Otrzymałem pierwsze struktury krystaliczne roślinnych reduktaz P5C. Na ich podstawie możliwe było:
  - a) Pokazanie oligomeryzacji.
  - b) Wyjaśnienie preferencji używanego koenzymu (NADPH vs. NADH).
  - c) Pokazanie miejsca wiązania anionu chlorkowego który, w zależności od stężenia, może stymulować lub hamować enzym.
  - d) Zaproponowanie związków sulfonowych jako potencjalnych inhibitorów roślinnych reduktaz P5C.
2. Otrzymałem pierwsze struktury krystaliczne roślinnej transferazy fosforybozylu-ATP. Pokazały one szereg zmian konformacyjnych towarzyszących transformacji z formy „luźnej” do „napiętej”, w szczególności odwrócenie konformacji szkieletu peptydowego z *trans* na *cis*. Wiązanie histydyny w miejscu allosterycznym i AMP w centrum aktywnym wyjaśniają molekularne podstawy regulacji aktywności enzymu.
3. Po raz pierwszy otrzymane struktury krystaliczne fosfatazy fosforanu histydynolu typu roślinnego pokazały architekturę miejsca aktywnego i wyjaśniły podstawy specyficzności enzymów z tej rodziny.
4. Zaobserwowane tworzenie się kowalencyjnego mostka pomiędzy łańcuchami bocznym lizyny i cysteiny okazało się występować w innych strukturach dostępnych w PDB.
5. Struktury dehydrogenazy L-histydynolu, również pokazane po raz pierwszy dla roślinnego enzymu, pozwoliły zobaczyć koenzym związany w miejscu, które umożliwia przebieg reakcji. Ponadto, dzięki wyznaczonym przeze mnie strukturom, możliwe było prześledzenie zmian konformacyjnych, które towarzyszą wiązaniu koenzymu.
6. Pierwsze struktury krystaliczne hydroksymetylotransferazy serynowej z roślinnego źródła pokazały architekturę enzymu i przebieg reakcji niezależnej of THF. Skoordynowana zmiana konformacji dwóch reszt tyrozyłowych najwyraźniej precyzyjnie kontroluje wiązanie THF tak, by ten ostatni nie blokował dostępu do centrum aktywnego.
7. Struktury aminotransferazy fosfoserynowej, także nieznanie wcześniej dla żadnej rośliny, pokazały dynamiczne fragmenty strukturalne enzymu oraz ich stabilizację spowodowaną wiązaniem ligandu.
8. Pokazałem sposób wiązania chemioterapeutyków antyfolianowych do cytozolowej i mitochondrialnej izoformy SHMT. Dane strukturalne, poparte eksperymentami kinetycznymi, pozwalają stwierdzić, że pemetreksed (PTX) jest obiecującą cząsteczką początkową dla rozwoju inhibitorów SHMT.

Opisane osiągnięcie naukowe jest bazowane na łącznie 22 depozytach w PDB (patrz punkt 5.4.) oraz szeregu innych eksperymentów.

#### **4.E. Omówienie ewentualnego wykorzystania osiągniętych wyników**

Przedstawione w cyklu publikacji wyniki pogłębiają nasze zrozumienie roślinnego metabolizmu. Aktywność badanych w prezentowanym osiągnięciu naukowym enzymów, zaangażowanych w metabolizm aminokwasów, jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórki roślinnej. Z tego powodu enzymy te są obiecujące dla projektowania specyficznych inhibitorów. Takie małowcząsteczkowe związki, specyficznie nakierowane na konkretne enzymy, mogą stać się skutecznymi herbicydami. Warto zauważyć, że odporność na glifosat (RoundUp), który jest najczęściej stosowanym herbicydem, staje się alarmującym zagrożeniem dla światowej produkcji żywności. W związku z tym konieczne jest poszukiwanie lub projektowanie nowych herbicydów.

Bazując na przedstawionych przeze mnie strukturach, możliwe będzie racjonalne projektowanie nowych małowcząsteczkowych związków, nakierowanych na konkretne enzymy. Warto zauważyć, że metody opracowane dla projektowania leków, które pozwalają znacznie usprawnić ten proces, bazują właśnie na strukturach krystalicznych. Dzięki temu zwiększa się szansę na odkrycie skutecznych związków, a droga od idei do wdrożenia jest krótsza i tańsza.

Otrzymane struktury enzymów SHMT z chemioterapeutykami antyfolianowymi charakteryzują się wyższą rozdzielczością niż warianty ludzkie. Przewaga wyższej rozdzielczości umożliwi m.in. zlokalizowanie cząsteczek wody, pośredniczących w sieci wiązań wodorowych pomiędzy białkiem a antyfolianami. Dlatego wyniki mogą posłużyć do selekcji i projektowania zarówno herbicydów nakierowanych na SHMT jak i nowych leków antynowotworowych.

Badania nad roślinnym szlakiem biosyntezy histydyny, a szczególnie nad jego pierwszym etapem, mają dodatkowe potencjalne zastosowanie. Mianowicie wykazano, że podniesione stężenie komórkowe wolnej histydyny, uzyskane w wyniku nadaktywności ATP-PRT zwiększa np. tolerancję na nikiel w *A. thaliana* (Wycisk et al., 2004). Dzięki temu rośliny o wysokiej zawartości histydyny mogą być stosowane do fitoremediacji, tj. usuwania zanieczyszczeń z gleby. Przedstawione w niniejszym osiągnięciu naukowym struktury *Medtr*ATP-PRT1 są z pewnością koniecznym krokiem w kierunku tego zastosowania, ponieważ pozwalają np. na racjonalne projektowanie mutantów i małowcząsteczkowych aktywatorów roślinnych ATP-PRT.

## 5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

### 5.1. Wykaz publikacji nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

(nazwisko habilitanta jest wytłuszczone; \* oznacza autora korespondencyjnego)

#### 5.1.1. Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora:

**N15.** Mao, S., Sekula, B., **Ruszkowski, M.**, Ranganathan, S. V, Haruehanroengra, P., Wu, Y., Shen, F., & Sheng, J.\* (2020). Base pairing, structural and functional insights into N4-methylcytidine (m4C) and N4,N4-dimethylcytidine (m42C) modified RNA. *Nucleic Acids Research*, 1–14.

**N14.** Grzechowiak, M., Sliwiak, J., Jaskolski, M., & **Ruszkowski, M\***. (2020). Structural Studies of Glutamate Dehydrogenase (Isoform 1) From *Arabidopsis thaliana*, an Important Enzyme at the Branch-Point Between Carbon and Nitrogen Metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–17.

**N13.** Sekula, B.\*, **Ruszkowski, M.**, & Dauter, Z. (2020). S-adenosylmethionine synthases in plants: Structural characterization of type I and II isoenzymes from *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 554–565.

**N12.** Nogués, I., Tramonti, A., Angelaccio, S., **Ruszkowski, M.**, Sekula, B., & Contestabile, R.\* (2020). Structural and kinetic properties of serine hydroxymethyltransferase from the halophytic cyanobacterium *Aphanothece halophytica* provide a rationale for salt tolerance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 517–529.

**N11.** **Ruszkowski, M\***. (2020). Structural studies of *Medicago truncatula* proteins participating in cytokinin signal transduction and nodulation. Rozdział w książce: “*The model legume Medicago truncatula*”, edytor: Frans deBruijn, wydawnictwo: John Wiley & Sons, Inc.

**N10.** Ruszkowska, A., **Ruszkowski, M.**, Hulewicz, J. P., Dauter, Z. & Brown J. A.\* (2020). Molecular structure of a U•A-U-rich RNA triple helix with 11 consecutive base triples. *Nucleic Acids Research*, 48, 3304-3314.

**N9.** Grzechowiak, M., **Ruszkowski, M.**, Szpotkowski, K., Sliwiak, J, Sikorski, M. & Jaskolski, M.\* (2019). Crystal structures of plant inorganic pyrophosphatase, a moonlighting enzyme with autoproteolytic activity. *Biochemical Journal*, 476, 2297-2319.

**N8.** Nocek, B., Khusnutdinova, A., **Ruszkowski, M.**, Flick, R., Burda, M., Batyrova, K., Brown, G., Mucha, A., Joachimiak, A., Berlicki, L., & Yakunin, A.\* (2018). Structural insights into substrate selectivity and activity of bacterial polyphosphate kinases. *ACS Catalysis*, 8, 10746-10760.

**N7.** Ruszkowska, A., **Ruszkowski, M.**, Dauter, Z., & Brown, J. A.\* (2018). Structural insights into the RNA methyltransferase domain of METTL16. *Scientific Reports*, 8, 5311.

**N6.** Sekula, B., **Ruszkowski, M\***, Malinska, M., & Dauter, Z. (2016). Structural Investigations of N-carbamoylputrescine Amidohydrolase from *Medicago truncatula*:



Insights into the Ultimate Step of Putrescine Biosynthesis in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 350.

**N5. Ruszkowski, M.**, Sliwiak, J., Ciesielska, A., Barciszewski, J., Sikorski, M., & Jaskolski, M.\* (2014). Specific binding of gibberellic acid by Cytokinin-Specific Binding Proteins: a new aspect of plant hormone-binding proteins with the PR-10 fold. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 70, 2032–41.

### 5.1.2 Publikacje opublikowane podczas wykonywania pracy doktorskiej:

**N4. Ruszkowski, M.**, Szpotkowski, K., Sikorski, M., & Jaskolski, M.\* (2013). The landscape of cytokinin binding by a plant nodulin. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 69, 2365–2380.

**N3. Ruszkowski, M.**, Brzezinski, K., Jedrzejczak, R., Dauter, M., Dauter, Z., Sikorski, M., & Jaskolski, M.\* (2013). *M. truncatula* histidine-containing phosphotransfer protein: structural and biochemical insights into cytokinin transduction pathway in plants. *The FEBS Journal*, 280, 3709–3720.

**N2. Ciesielska, A., Ruszkowski, M.**, Kasperska, A., Femiak, I., Michalski, Z., & Sikorski, M.\* (2012). New insights into the signaling and function of cytokinins in higher plants. *Biotechnologia*, 93, 400–413.

### 5.1.3 Publikacje opublikowane podczas studiów magisterskich:

**N1. Coutouli-Argyropoulou, E.\***, Kyritsis, C., & **Ruszkowski, M.** (2009). Diastereoselective cycloaddition of bromonitrile oxide to sugar derived chiral alkenes. A possible route for the synthesis of higher deoxysugars. *Arkivoc*, 12, 181–192.

## 5.2. Badania realizowane po uzyskaniu stopnia doktora

(przedstawiono wybrane projekty)

Ludzka metylotransferaza 16 (METTL16) jest niedawno potwierdzoną metylotransferazą RNA. Odpowiada za ~20% epitranskryptomu N6-metyloadenozyny (m6A). W ramach współpracy z laboratorium dr J. Brown (University of Notre Dame, USA) prowadziliśmy badania strukturalne METTL16. Wcześniej, w tym laboratorium odkryto, że METTL16 rozpoznaje specyficznie potrójną helisę RNA obecną w długim niekodującym RNA MALAT1. MALAT1 jest związany z onkogenezą, dlatego badania strukturalne METTL16 i MALAT1 są bardzo istotne. Ponieważ jak dotąd nie udało się uzyskać kryształów METTL16 o pełnej długości, podzieliliśmy białko na domeny. Dzięki temu wraz z dr A. Ruszkowską i dr J. Brown, udało nam się opisać struktury N-końcowej domeny metylotransferazy METTL16 i jej kompleksu z S-adenozylhomocysteiną (publikacja N7). W ramach współpracy pokazaliśmy także po raz pierwszy strukturę prawie kompletnego zwoju potrójnej helisy

RNA (publikacja N10). Otrzymana struktura na bazie zmodyfikowanego fragmentu MALAT1 pozwoliła opisać parametry geometryczne takiej helisy.

Innym wartym wymienienia projektem, którym zajmowałem się podczas stażu podoktorskiego były badania kinaz polifosforanowych z rodziny PPK2, które są szeroko rozpowszechnionymi u bakterii enzymami mającymi znaczenie w podstawowym metabolizmie. PPK2 są odpowiedzialne za regenerację ATP (lub GTP) z ich mono- i difosforanowych pochodnych. Mechanizmy molekularne specyficzności substratowej trzech klas PPK2 i katalizy pozostawały jednak nieznane. Wspólnie z dr. B. Nockiem (MCSG, Chicago, USA), prof. A. Yakuninem (Univ. of Toronto, Kanada) przedstawiliśmy wyniki kompleksowych badań biochemicznych i strukturalnych trzech PPK2 klasy III z różnych bakterii. Oczyszczone białka PPK2 katalizowały zależną od polifosforanu fosforylację AMP, ADP, GMP i GDP do odpowiednich difosforanów i trifosforanów nukleozydów. Struktury krystaliczne tych białek w kompleksach z substratami, produktami,  $Mg^{2+}$  i inhibitorami ujawniły miejsca i sposoby wiązania nukleotydów. Struktury krystaliczne PPK2 w kompleksach z trzema inhibitorami arylofosfonianowymi wskazują na obecność co najmniej dwóch kieszeni, które mogą potencjalnie być wykorzystane w projektowaniu inhibitorów. Nasze odkrycia dostarczają molekularnych podstaw do zrozumienia mechanizmów działania kinaz PPK2. Mogą przez to nakierować projektowanie antybiotyków oraz znaleźć zastosowanie w biokatalizie. Wyniki zostały opublikowane w bardzo prestiżowym czasopiśmie *ACS Catalysis* (publikacja N8).

### 5.3. Badania realizowane przed uzyskaniem stopnia doktora

Moja rozprawa doktorska dotyczyła hormonów roślinnych (fitohormonów), które odgrywają kluczową rolę w regulacji wzrostu i rozwoju roślin. Do hormonów roślinnych zaliczamy między innymi auksyny, gibereliny, cytokininy, etylen i kwas abscysynowy. O ile szlaki odpowiedzialne za transdukcję sygnałów hormonalnych zostały już dla wielu z nich zidentyfikowane, to nadal mało wiadomo na temat struktur niektórych białek w nie zaangażowanych.

Najważniejszym odkryciem przedstawionym w mojej pracy doktorskiej było pokazanie struktur krystalicznych noduliny 13 z *M. truncatula* (*MtN13*) w kompleksach z czterema cytokininami. *MtN13* zostało zidentyfikowane w korze zewnętrznej brodawek korzeniowych po nawiązaniu symbiozy rośliny z bakterią wiążącą azot (Gamas et al., 1998). Brodawkowanie roślin bobowatych jest bardzo ważnym procesem biologicznym. Pozwala ono roślinom takim jak groch czy fasola pozyskiwać azot atmosferyczny na drodze symbiozy z bakteriami. Wiadomo również, że hormony roślinne z grupy cytokinin biorą udział w brodawkowaniu (Frugier et al., 2008). Powstała więc hipoteza, że białko *MtN13* może oddziaływać z cytokininami. *MtN13* należy do klasy białek związanych z patogenezą (Pathogenesis-related Class 10, PR-10). Pokazałem, że *MtN13* w kompleksach z *trans*-zeatyną, 2-izopentyloadeniną, kinetyną oraz 6-benzyloaminopuryną cytokininy związane są głęboko w kieszeni wiążącej białka, a oddziaływanie obu partnerów jest specyficzne.

*MtN13* to pierwsze w historii białko klasy PR-10 występujące w roztworze jako dimer. Potwierdziły to badania z zastosowaniem dynamicznego rozpraszania światła (Dynamic Light Scattering, DLS) oraz rozpraszania niskokątowego (Small-angle X-ray scattering, SAXS). Dimeryzacja *MtN13* ma ważne znaczenie również dla wiązania hormonów, ponieważ po połączeniu dwóch cząsteczek białka, związana cytokinina zostaje uwięziona we wnęce, którą zamyka druga podjednostka białka. Publikacja na temat kompleksów białka *MtN13* z cytokininami (N4) została wyróżniona na okładce wydania *Acta Cryst. D*.

W swoim doktoracie uwagę skupiłem również na białkach uczestniczących w transdukcji sygnału pochodzącego od cytokinin. W kaskadzie sygnału uczestniczą: (i) zakotwiczony w błonie komórkowej receptor (Cytokinin Receptor, CRE1), (ii) rodzina białek zawierających histydynę przenoszących fosforan (Histidine-containing Phosphotransfer Protein, HPT) oraz (iii) białka regulacji odpowiedzi (Response Regulator, RR). Gdy receptor zwiąże cytokininę, zyskuje aktywność kinazy białkowej i fosforyluje jedno z białek HPT. To ostatnie przenosi fosforan na białko typu RR, występujące w jądrze. Rozwiązanie struktur krystalicznych białek należących do tego szlaku było jednym z celów mojej pracy doktorskiej.

Udało mi się rozwiązać struktury krystaliczne dwóch białek z rodziny HPT. Ich źródłem była modelowa roślina bobowata, *M. truncatula*. Jedno z tych białek (MtHPT1) zostało rozwiązane z rozdzielczością 1,45 Å. Przeprowadziłem także badania biochemiczne białka MtHPT1 w celu potwierdzenia jego aktywności w reakcji fosforylacji przez rekombinowaną domenę CRE1. Autoradiografia z wykorzystaniem radioaktywnie znakowanego trójfosforanu adenozy (ATP) wskazała na fosforylację przez wyprodukowaną również przez mnie domenę wewnątrzkomórkową receptora CRE1. Testy z wykorzystaniem techniki termoforezy (Microscale Thermophoresis, MST) pozwoliły z kolei wyznaczyć stałą dysocjacji kompleksu CRE1-HPT1 na poziomie 14 μM. Wyniki dotyczące białka MtHPT1 zostały opublikowane w *FEBS Journal* (N3).

Kolejna struktura białka (MtHPT2) została rozwiązana z subatomową rozdzielczością 0,92 Å i opisana w rozdziale w książce (N11). W momencie depozytu w PDB była to najwyższa rozdzielczość, do której udokładniona została struktura roślinnego białka, pomijając strukturę modelowej krabiny, która jest jednak trzykrotnie mniejsza od MtHPT2. Białka MtHPT1 i MtHPT2 mają helikalne zwoje, składające się z sześciu α-helis. Aktywny łańcuch boczny histydyny fosforylowany przez kinazę receptorową jest wyeksponowany na zewnątrz rdzenia białka. W roślinach występuje zawsze kilka homologów HPT. W *M. truncatula* występuje aż siedem białek tego typu. Niektóre z nich to inhibitory szlaku transdukcji, które łączą się w podobny sposób do kinazy receptora, lecz nie posiadają aktywnej histydyny. Struktury przybliżyły nas do zrozumienia roli istnienia wielu form HPT i sposobu ich rozpoznawania przez różne kinazy receptorowe.

## 5.4 Lista struktur zdeponowanych w Protein Data Bank

(wpisy, na których bazuje przedstawione osiągnięcie naukowe są wytłuszczone)

PDB ID	Tytuł	Data
<a href="#">6ZTX</a>	Crystal Structure of catalase HP11 from Escherichia coli (serendipitously crystallized)	07.10.2020
<a href="#">6ZTW</a>	Crystal Structure of catalase HP11 from Escherichia coli (serendipitously crystallized)	07.10.2020
<a href="#">6ZTV</a>	Crystal Structure of catalase HP11 from Escherichia coli (serendipitously crystallized)	07.10.2020
<a href="#">6WY3</a>	Crystal structure of RNA-10mer: CCGG(N4,N4-dimethyl-C)GCCGG; P212121 form	02.09.2020
<a href="#">6WY2</a>	Crystal structure of RNA-10mer: CCGG(N4-methyl-C)GCCGG	02.09.2020
<a href="#">6Z18</a>	Crystal structure of RNA-10mer: CCGG(N4,N4-dimethyl-C)GCCGG; R32 form	02.09.2020
<a href="#">6YME</a>	Crystal structure of serine hydroxymethyltransferase from Aphanothece halophytica in the PLP-internal aldimine state	03.06.2020
<a href="#">6YMD</a>	Crystal structure of serine hydroxymethyltransferase from Aphanothece halophytica in the covalent complex with malonate	03.06.2020
<a href="#">6YMF</a>	Crystal structure of serine hydroxymethyltransferase from Aphanothece halophytica in the PLP-Serine external aldimine state	03.06.2020
<a href="#">6YEI</a>	Arabidopsis thaliana glutamate dehydrogenase isoform 1 in complex with NAD	20.05.2020
<a href="#">6YEH</a>	Arabidopsis thaliana glutamate dehydrogenase isoform 1 in apo form	20.05.2020
<a href="#">6VCX</a>	Crystal structure of Arabidopsis thaliana S-adenosylmethionine Synthase 1 (AtMAT1)	26.02.2020
<a href="#">6VCW</a>	Crystal structure of Medicago truncatula S-adenosylmethionine Synthase 3A (MtMAT3A)	26.02.2020
<a href="#">6VCZ</a>	Crystal structure of Arabidopsis thaliana S-adenosylmethionine Synthase 2 (AtMAT2)	26.02.2020
<a href="#">6VCY</a>	Crystal structure of Arabidopsis thaliana S-adenosylmethionine Synthase 1 (AtMAT1) in complex with 5'-methylthioadenosine	26.02.2020
<a href="#">6VD1</a>	Crystal structure of Arabidopsis thaliana S-adenosylmethionine Synthase 2 (AtMAT2) in complex with S-adenosylmethionine and PPNP	26.02.2020
<a href="#">6VD0</a>	Crystal structure of Arabidopsis thaliana S-adenosylmethionine Synthase 2 (AtMAT2) in complex with free Methionine and AMPCPP	26.02.2020
<a href="#">6VD2</a>	Crystal structure of Arabidopsis thaliana S-adenosylmethionine Synthase 2 (AtMAT2) in complex with S-adenosylmethionine	26.02.2020
<a href="#">6SMN</a>	<b>A. thaliana serine hydroxymethyltransferase isoform 2 (AtSHMT2) in complex with methotrexate</b>	<b>08.01.2020</b>
<a href="#">6SMR</a>	<b>A. thaliana serine hydroxymethyltransferase isoform 4 (AtSHMT4) in complex with methotrexate</b>	<b>08.01.2020</b>
<a href="#">6SMW</a>	<b>A. thaliana serine hydroxymethyltransferase isoform 2 (AtSHMT2) in complex with pemetrexed</b>	<b>08.01.2020</b>
<a href="#">6SVS</a>	Crystal Structure of U:A-U-rich RNA triple helix with 11 consecutive base triples	01.01.2020
<a href="#">6MT2</a>	Crystal structure of Inorganic Pyrophosphatase from Medicago truncatula (I23 crystal form)	14.08.2019
<a href="#">6MT1</a>	Crystal structure of Inorganic Pyrophosphatase from Medicago truncatula (R3 crystal form)	14.08.2019

<a href="#">6DZG</a>	Crystal structure of polyphosphate kinase 2 class I (SMc02148) in complex with ADP	10.07.2019
<a href="#">6B18</a>	Crystal structure of PPK3 Class III in complex with inhibitor	16.01.2019
<a href="#">6AU0</a>	Crystal structure of PPK2 (Class III) in complex with bisphosphonate inhibitor (2-((3,5-dichlorophenyl)amino)ethane-1,1-diyl)diphosphonic acid	16.01.2019
<a href="#">6CZL</a>	<b>Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> ATP-phosphoribosyltransferase in relaxed form</b>	<b>15.08.2018</b>
<a href="#">6CZM</a>	<b>Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> ATP-phosphoribosyltransferase in tense form</b>	<b>15.08.2018</b>
<a href="#">6CZX</a>	<b>Crystal structure of <i>Arabidopsis thaliana</i> phosphoserine aminotransferase isoform 1 (AtPSAT1) in complex with PLP internal aldimine</b>	<b>23.05.2018</b>
<a href="#">6CZZ</a>	<b>Crystal structure of <i>Arabidopsis thaliana</i> phosphoserine aminotransferase isoform 1 (AtPSAT1) in complex with PLP-phosphoserine geminal diamine intermediate</b>	<b>23.05.2018</b>
<a href="#">6CZY</a>	<b>Crystal structure of <i>Arabidopsis thaliana</i> phosphoserine aminotransferase isoform 1 (AtPSAT1) in complex with Pyridoxamine-5'-phosphate (PMP)</b>	<b>23.05.2018</b>
<a href="#">6CCZ</a>	<b>Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> serine hydroxymethyltransferase 3 (MtSHMT3) soaked with selenourea</b>	<b>23.05.2018</b>
<a href="#">6CDO</a>	<b>Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> serine hydroxymethyltransferase 3 (MtSHMT3), PLP-internal aldimine and apo form</b>	<b>23.05.2018</b>
<a href="#">6CD1</a>	<b>Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> serine hydroxymethyltransferase 3 (MtSHMT3), complexes with reaction intermediates</b>	<b>23.05.2018</b>
<a href="#">6B92</a>	Crystal Structure of the N-terminal domain of human METTL16 in complex with SAH	04.04.2018
<a href="#">6B91</a>	Crystal structure of the N-terminal domain of human METTL16	04.04.2018
<a href="#">5VLD</a>	<b>Crystal Structure of <i>Medicago truncatula</i> L-Histidinol Dehydrogenase in Complex with L-Histidine and NAD+</b>	<b>20.09.2017</b>
<a href="#">5VLC</a>	<b>Crystal Structure of <i>Medicago truncatula</i> L-Histidinol Dehydrogenase in Complex with L-Histidinol</b>	<b>20.09.2017</b>
<a href="#">5VLB</a>	<b>Crystal Structure of <i>Medicago truncatula</i> L-Histidinol Dehydrogenase in Complex with Imidazole</b>	<b>20.09.2017</b>
<a href="#">5H8J</a>	Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> N-carbamoylputrescine amidohydrolase (MtCPA) in complex with cadaverine	20.04.2016
<a href="#">5H8I</a>	Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> N-carbamoylputrescine amidohydrolase (MtCPA) in complex with N-(dihydroxymethyl)putrescine	20.04.2016
<a href="#">5H8L</a>	Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> N-carbamoylputrescine amidohydrolase (MtCPA) C158S mutant in complex with putrescine	20.04.2016
<a href="#">5H8K</a>	Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> N-carbamoylputrescine amidohydrolase (MtCPA) C158S mutant	20.04.2016
<a href="#">5EQ9</a>	<b>Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> Histidinol-Phosphate Phosphatase (MtHPP) in complex with L-histidinol phosphate and Mg<sup>2+</sup></b>	<b>30.03.2016</b>
<a href="#">5EQ8</a>	<b>Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> Histidinol-Phosphate Phosphatase (MtHPP) in complex with L-histidinol</b>	<b>30.03.2016</b>
<a href="#">5EQ7</a>	<b>Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> Histidinol-Phosphate Phosphatase (MtHPP) in complex with free phosphate</b>	<b>30.03.2016</b>
<a href="#">5EQA</a>	<b>Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> Histidinol-Phosphate Phosphatase (MtHPP) with intermolecular cross-link between Lys158 and Cys245</b>	<b>30.03.2016</b>

<a href="#">5BSG</a>	Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> ( $\delta$ )1-Pyrroline-5-Carboxylate Reductase (MtP5CR) in complex with NADP+	11.11.2015
<a href="#">5BSF</a>	Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> ( $\delta$ )1-Pyrroline-5-Carboxylate Reductase (MtP5CR) in complex with NAD+	11.11.2015
<a href="#">5BSH</a>	Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> ( $\delta$ )1-Pyrroline-5-Carboxylate Reductase (MtP5CR) in complex with L-Proline	11.11.2015
<a href="#">5BSE</a>	Crystal structure of <i>Medicago truncatula</i> ( $\delta$ )1-Pyrroline-5-Carboxylate Reductase (MtP5CR)	11.11.2015
<a href="#">4LUG</a>	Crystal structure of Inorganic Pyrophosphatase PPA1 from <i>Arabidopsis thaliana</i>	30.07.2014
<a href="#">4PSB</a>	Crystal Structure of Phytohormone Binding Protein from <i>Vigna radiata</i> in complex with gibberellic acid (GA3)	23.07.2014
<a href="#">4QOK</a>	Crystal Structure of Phytohormone Binding Protein from <i>Medicago truncatula</i> in complex with gibberellic acid (GA3)	23.04.2014
<a href="#">4JHH</a>	Crystal Structure of <i>Medicago truncatula</i> Nodulin 13 (MtN13) in complex with kinetin	04.12.2013
<a href="#">4JHI</a>	Crystal Structure of <i>Medicago truncatula</i> Nodulin 13 (MtN13) in complex with N6-benzyladenine	04.12.2013
<a href="#">4GY9</a>	Crystal Structure of <i>Medicago truncatula</i> Nodulin 13 (MtN13) in complex with N6-isopentenyladenine (2iP)	04.09.2013
<a href="#">4G78</a>	Subatomic Resolution Crystal Structure of Histidine-containing Phosphotransfer Protein MtHpt2 from <i>Medicago truncatula</i>	24.07.2013
<a href="#">4JHG</a>	Crystal Structure of <i>Medicago truncatula</i> Nodulin 13 (MtN13) in complex with trans-zeatin	20.03.2013
<a href="#">3US6</a>	Crystal Structure of Histidine-containing Phosphotransfer Protein MtHpt1 from <i>Medicago truncatula</i>	18.01.2012

## **6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ**

### **6.1. Osiągnięcia dydaktyczne**

*(sprawowana opieka naukowa nad studentami, lekarzami w toku specjalizacji lub doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego wraz z wykazem przewodów doktorskich).*

W trakcie wykonywania pracy doktorskiej miałem zaszczyt trafić na doskonałych mentorów, którym bez wątpienia zawdzięczam swoją późniejszą karierę. Dlatego po uzyskaniu tytułu doktora działalność dydaktyczną skupiłem na indywidualnym kształceniu młodszych naukowców. Przekazywałem im własne doświadczenie w klonowaniu molekularnym, produkcji i oczyszczaniu białek, ich krystalizacji, rozwiązywaniu struktur krystalicznych oraz stosowaniu metod biofizycznych, biochemicznych i bioinformatycznych. W każdym z czterech poniżej wymienionych przypadków efektem wspólnej pracy jest lub będzie przynajmniej jedna publikacja naukowa.

a) Funkcja opiekuna naukowego nad (wówczas) mgr. Bartoszem Sekułą w trakcie jego stażu w Synchrotron Radiation Research Section, Argonne, USA (marzec-wrzesień 2015). Efektem współpracy była wspólna publikacja N6.

b) Funkcja opiekuna naukowego nad Ha Linh Tran w trakcie jej stażu w Zakładzie Krystalografii, IChB PAN w Poznaniu (lipiec-sierpień 2019). Efektem współpracy było rozwiązanie struktury krystalicznej fragmentu receptora cytokinin. Ha Linh Tran od lutego 2020 r. wykonywała pracę magisterską pod moim nadzorem. Wraz z prof. Mariuszem Jaskólskim byłem również promotorem pracy magisterskiej Ha Linh Tran. Ha Linh od października 2020 rozpoczęła studia doktorskie w IChB PAN i będzie kontynuować swoją karierę pod moją opieką. Po uzyskaniu stopnia doktora habilitowanego chciałbym zostać promotorem Ha Linh Tran.

c) Funkcja opiekuna naukowego nad Nataszą Paulish w trakcie jej stażu w Zakładzie Krystalografii, IChB PAN w Poznaniu (sierpień-wrzesień 2019). Efektem współpracy było rozwiązanie struktury krystalicznej syntazy metylcysteiny pochodzenia roślinnego.

d) Funkcja opiekuna naukowego nad Wojciechem Witkiem, który od września 2019 jest doktorantem IChB PAN w Poznaniu, przyjętym w ramach kierowanego przeze mnie projektu SONATA. Po uzyskaniu stopnia doktora habilitowanego chciałbym zostać promotorem Wojciecha Witka.

## 6.2. Działalność organizacyjna

### Kierowanie projektami finansowanymi ze źródeł zewnętrznych po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Kierownik projektu SONATA 14 nr 2018/31/D/NZ1/03630, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.  
Budżet projektu: 1 442 800 zł
2. Kierownik projektu „Welcome to Poland” finansowanego przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej.  
Budżet projektu: 225 643 zł
3. Kierownik projektu bilateralnego finansowanego wspólnie przez Polską Akademię Nauk (PAN) i Narodową Radę Badań Naukowych Włoch (CNR).  
Budżet projektu: 12 000 €

### Członkostwo w komisjach

1. Komisja ds. wprowadzania języka angielskiego w ICHB PAN.
2. Komisja sprzętowa w ICHB PAN.

## 7. INNE INFORMACJE

### 7.1. Współpraca z instytucjami lub organizacjami, działającymi w kraju i za granicą

*(podano tematykę współpracy)*

1. Dr hab. Zbigniew Dauter, National Cancer Institute, Argonne, Stany Zjednoczone:  
Współpraca skupia się na aspektach metodologicznych w biologii strukturalnej.
2. Dr Bartosz Sekuła, National Cancer Institute, Frederick, Stany Zjednoczone:  
Metabolizm seryny oraz jednostek jednowęglowych.
3. Dr Zhipu Luo, Uniwersytet Soochow, Chiny:  
Strukturalne badania białek zaangażowanych w mechanizmy obrony przeciwwirusowej 2'-5'A.
4. Dr Jia Sheng, Uniwersytet w Albany, Stany Zjednoczone:  
Strukturalne aspekty modyfikowanych kwasów nukleinowych.
5. Dr Amr Kataya, Uniwersytet w Stavanger, Norwegia:



Molekularne aspekty fosforegulacji w roślinnych peroksysomach.

6. Dr Robert Jedrzejczak, Midwest Center for Structural Genomics, Argonne, Stany Zjednoczone:

Projektowanie wektorów do ekspresji białek w różnych systemach i do różnych zastosowań.

7. Dr Jessica A. Brown, Uniwersytet Notre Dame, Stany Zjednoczone:

Aspekty związane z modyfikacją m<sup>6</sup>A w RNA.

8. Prof. Giuseppe Forlani, Uniwersytet w Ferrarze, Włochy:

Enzymologia roślin ze szczególnym naciskiem na enzymy metabolizmu proliny.

9. Prof. Alexander Yakunin, Uniwersytet w Toronto, Kanada; Uniwersytet Bangor, Walia:

Enzymologia stosowana, badania enzymów o potencjalnym zastosowaniu technologicznym.

10. Dr. Roberto Contestabile, Uniwersytet Sapienza, Rzym, Włochy

Badania enzymów wykorzystujących fosforan pirydoksalu.

11. Współpraca z synchrotronami i centrami mikroskopii elektronowej (Cryo-EM)

- BESSY Berlin, Niemcy
- EMBL Petra III, Hamburg, Niemcy
- Solaris, Kraków (cryo-EM)

## **7.2. Odbyte staże zagraniczne w ośrodkach naukowych lub akademickich,**

*(po otrzymaniu stopnia doktora)*

06.2014 – 12.2018

Staż podoktorski (PostDoc) w: National Institutes of Health, National Cancer Institute, Macromolecular Crystallography Laboratory, Synchrotron Radiation Research Section, Argonne, Stany Zjednoczone. Nadzorujący: dr hab. Zbigniew Dauter

*(podczas wykonywania pracy doktorskiej)*

09.2010-03.2011

Argonne National Laboratory, Synchrotron Radiation Research Section, Argonne, Stany Zjednoczone, nadzorujący: Dr. hab. Zbigniew Dauter

*(podczas wykonywania pracy magisterskiej)*

09.2007-07.2008

Uniwersytet Arystotelesa, Saloniki, Grecja, Wydział Chemii, projekt LLP Erasmus, nadzorujący: Prof. Evdoxia Coutouli-Argyropoulou

### 7.3. Inna działalność naukowa

Byłem recenzentem jedenastu prac w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

*Acta Crystallographica section D*; liczba recenzowanych manuskryptów: 3

*Acta Crystallographica section F*; liczba recenzowanych manuskryptów: 2

*Biochemical Journal*; liczba recenzowanych manuskryptów: 1

*Biochemistry*; liczba recenzowanych manuskryptów: 1

*Biochimie*; liczba recenzowanych manuskryptów: 1

*Communications Biology*; liczba recenzowanych manuskryptów: 1

*Emerging Topics in Life Sciences*; liczba recenzowanych manuskryptów: 1

*FEBS Letters*; liczba recenzowanych manuskryptów: 1

### 7.4. Wystąpienia na konferencjach naukowych

(po otrzymaniu tytułu doktora)

- Fascinating World of Bioorganic Chemistry, Poznań, 2019, wykład na zaproszenie.
- Gordon Research Conference: Enzymes, coenzymes and metabolic pathways, Waterville Valley, NH, USA; 2018, poster.
- Gordon Research Seminar: Enzymes, coenzymes and metabolic pathways, Waterville Valley, NH, USA; 2018, poster.
- CBB Symposium, Notre Dame, IN, USA; 2018, poster.
- Gordon Research Conference: Enzymes, coenzymes and metabolic pathways, Waterville Valley, NH, USA; 2017, poster.
- Gordon Research Seminar: Enzymes, coenzymes and metabolic pathways, Waterville Valley, NH, USA; 2017, poster.
- Gordon Research Conference: Enzymes, coenzymes and metabolic pathways, Waterville Valley, NH, USA; 2016, poster.
- Plant Biotic Stresses & Resistance Mechanisms II; Wiedeń, Austria; 2015, poster.
- Mid-Atlantic Protein Crystallography Meeting; Baltimore, MD, USA; 2015, poster.

### 7.5. Udział w specjalistycznych szkoleniach i warsztatach naukowych

(po otrzymaniu tytułu doktora)

- Training in Computational Drug Design and Discovery, National Institutes of Health Bethesda, USA, 5-8 listopada 2018.
- Cryo-EM Instructional Workshop (dostęp zdalny), National Cancer Institute Frederick, USA, 10 maja - 28 czerwca 2018.
- Beyond Rg: BioSAXS (small-angle X-ray scattering), Argonne, USA, czerwiec 2017.

## 7.6. Wybrane nagrody i wyróżnienia

(po otrzymaniu tytułu doktora)

- Nominacja do Nagrody AgroBioTop, powołanej przez Komitet Biotechnologii Polskiej Akademii Nauk ze wsparciem Bayer Sp z o. o., 2020.
- Publikacja N10 wyróżniona okładką w *Nucleic Acids Research*, 2020.
- Stypendium w Narodowym Instytucie Raka, Narodowe Instytuty Zdrowia, (National Cancer Institute, National Institutes of Health) Stany Zjednoczone, 2014-2018.
- Stypendium dla młodych badaczy z poznańskiego środowiska naukowego, Poznań 2014.
- Praca doktorska obroniona z wyróżnieniem, Poznań 2014.

Mikołaj Ruszkowski  
(podpis wnioskodawcy)

## 8. LITERATURA

- Aguero, F., Al-Lazikani, B., Aslett, M., Berriman, M., Buckner, F.S., Campbell, R.K., Carmona, S., Carruthers, I.M., Chan, A.W., Chen, F., Crowther, G.J., Doyle, M.A., Hertz-Fowler, C., Hopkins, A.L., Mcallister, G., Nwaka, S., Overington, J.P., Pain, A., Paolini, G.V., Pieper, U., Ralph, S.A., Riechers, A., Roos, D.S., Sali, A., Shanmugam, D., Suzuki, T., Van Voorhis, W.C., and Verlinde, C.L. (2008). Genomic-scale prioritization of drug targets: the TDR Targets database. *Nat Rev Drug Discov* 7, 900-907.
- Amelio, I., Cutruzzola, F., Antonov, A., Agostini, M., and Melino, G. (2014a). Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends in Biochemical Sciences* 39, 191-198.
- Amelio, I., Markert, E.K., Rufini, A., Antonov, A.V., Sayan, B.S., Tucci, P., Agostini, M., Mineo, T.C., Levine, A.J., and Melino, G. (2014b). p73 regulates serine biosynthesis in cancer. *Oncogene* 33, 5039-5046.
- Antonov, A., Agostini, M., Morello, M., Minieri, M., Melino, G., and Amelio, I. (2014). Bioinformatics analysis of the serine and glycine pathway in cancer cells. *Oncotarget* 5, 11004-11013.
- Bender, R.A. (2012). Regulation of the histidine utilization (hut) system in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 565-584.
- Bisson, C., Britton, K.L., Sedelnikova, S.E., Rodgers, H.F., Eadsforth, T.C., Viner, R.C., Hawkes, T.R., Baker, P.J., and Rice, D.W. (2015). Crystal Structures Reveal that the Reaction Mechanism of Imidazoleglycerol-Phosphate Dehydratase Is Controlled by Switching Mn(II) Coordination. *Structure* 23, 1236-1245.
- Christensen, E.M., Patel, S.M., Korasick, D.A., Campbell, A.C., Krause, K.L., Becker, D.F., and Tanner, J.J. (2017). Resolving the cofactor-binding site in the proline biosynthetic enzyme human pyrroline-5-carboxylate reductase 1. *Journal of Biological Chemistry* 292, 7233-7243.
- Da Rocha, I.M.A., Vitorello, V.A., Silva, J.S., Ferreira-Silva, S.L., Viegas, R.A., Silva, E.N., and Silveira, J.a.G. (2012). Exogenous ornithine is an effective precursor and the delta-ornithine amino transferase pathway contributes to proline accumulation under high N recycling in salt-stressed cashew leaves. *Journal of Plant Physiology* 169, 41-49.
- Fink, G.R. (1964). Gene-Enzyme Relations in Histidine Biosynthesis in Yeast. *Science* 146, 525-527.
- Forlani, G., Giberti, S., Berlicki, L., Petrollino, D., and Kafarski, P. (2007). Plant P5C reductase as a new target for aminomethylenebisphosphonates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4340-4347.
- Forlani, G., Occhipinti, A., Berlicki, L., Dziedziola, G., Wieczorek, A., and Kafarski, P. (2008). Tailoring the structure of aminobisphosphonates to target plant P5C reductase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 3193-3199.
- Frugier, F., Kosuta, S., Murray, J.D., Crespi, M., and Szczyglowski, K. (2008). Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends Plant Sci* 13, 115-120.
- Funck, D., Winter, G., Baumgarten, L., and Forlani, G. (2012). Requirement of proline synthesis during Arabidopsis reproductive development. *BMC Plant Biol* 12, 191.
- Gamas, P., De Billy, F., and Truchet, G. (1998). Symbiosis-specific expression of two Medicago truncatula nodulin genes, MtN1 and MtN13, encoding products homologous to plant defense proteins. *Mol Plant Microbe Interact* 11, 393-403.

- Ge, M., and Pan, X.M. (2009). The contribution of proline residues to protein stability is associated with isomerization equilibrium in both unfolded and folded states. *Extremophiles* 13, 481-489.
- Giardina, G., Brunotti, P., Fiascarelli, A., Cicalini, A., Costa, M.G., Buckle, A.M., Di Salvo, M.L., Giorgi, A., Marani, M., Paone, A., Rinaldo, S., Paiardini, A., Contestabile, R., and Cutruzzola, F. (2015). How pyridoxal 5'-phosphate differentially regulates human cytosolic and mitochondrial serine hydroxymethyltransferase oligomeric state. *FEBS J* 282, 1225-1241.
- Giberti, S., Funck, D., and Forlani, G. (2014). Delta1-Pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. *New Phytol* 202, 911-919.
- Girgis, S., Suh, J.R., Jolivet, J., and Stover, P.J. (1997). 5-formyltetrahydrofolate regulates homocysteine remethylation in human neuroblastoma. *Journal of Biological Chemistry* 272, 4729-4734.
- Glynn, S.E., Baker, P.J., Sedelnikova, S.E., Davies, C.L., Eadsforth, T.C., Levy, C.W., Rodgers, H.F., Blackburn, G.M., Hawkes, T.R., Viner, R., and Rice, D.W. (2005). Structure and mechanism of imidazoleglycerol-phosphate dehydratase. *Structure* 13, 1809-1817.
- Gohda, K., Ohta, D., Iwasaki, G., Ertl, P., and Jacob, O. (2001). Computational modeling of a binding conformation of the intermediate L-histidinal to histidinol dehydrogenase. *J Chem Inf Comput Sci* 41, 196-201.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., and Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signal Behav* 7, 1456-1466.
- Hendrickson, W.A., Pahler, A., Smith, J.L., Satow, Y., Merritt, E.A., and Phizackerley, R.P. (1989). Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2190-2194.
- Hua, X.J., Van De Cotte, B., Van Montagu, M., and Verbruggen, N. (2001). The 5' untranslated region of the *At-P5R* gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation. *Plant Journal* 26, 157-169.
- Hua, X.J., Vandecotte, B., Vanmontagu, M., and Verbruggen, N. (1997). Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 114, 1215-1224.
- Ingle, R.A. (2011). Histidine biosynthesis. *Arabidopsis Book* 9, e0141.
- Jastrzebowska, K., and Gabriel, I. (2015). Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. *Amino Acids* 47, 227-249.
- Kalhan, S.C., and Hanson, R.W. (2012). Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino acid. *J Biol Chem* 287, 19786-19791.
- Kishor, P.B.K., Hong, Z.L., Miao, G.H., Hu, C.a.A., and Verma, D.P.S. (1995). Overexpression of Delta-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. *Plant Physiology* 108, 1387-1394.
- Krissinel, E., and Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372, 774-797.
- Labuschagne, C.F., Van Den Broek, N.J., Mackay, G.M., Vousden, K.H., and Maddocks, O.D. (2014). Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell Rep* 7, 1248-1258.
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., and Rentsch, D. (2010). Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* 39, 949-962.

- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K., and Becker, D.F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid Redox Signal* 19, 998-1011.
- Lunardi, J., Nunes, J.E., Bizarro, C.V., Basso, L.A., Santos, D.S., and Machado, P. (2013). Targeting the histidine pathway in Mycobacterium tuberculosis. *Curr Top Med Chem* 13, 2866-2884.
- Luo, Z. (2016). Selenourea: a convenient phasing vehicle for macromolecular X-ray crystal structures. *Sci Rep* 6, 37123.
- Mattioli, R., Costantino, P., and Trovato, M. (2009). Proline accumulation in plants: not only stress. *Plant Signal Behav* 4, 1016-1018.
- Meng, Z.H., Lou, Z.Y., Liu, Z., Li, M., Zhao, X.D., Bartlam, M., and Rao, Z.H. (2006). Crystal structure of human pyrroline-5-carboxylate reductase. *Journal of Molecular Biology* 359, 1364-1377.
- Nocek, B., Chang, C., Li, H., Lezondra, L., Holzle, D., Collart, F., and Joachimiak, A. (2005). Crystal structures of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate reductase from human pathogens Neisseria meningitidis and Streptococcus pyogenes. *Journal of Molecular Biology* 354, 91-106.
- Petersen, L.N., Marineo, S., Mandala, S., Davids, F., Sewell, B.T., and Ingle, R.A. (2010). The missing link in plant histidine biosynthesis: Arabidopsis myoinositol monophosphatase-like2 encodes a functional histidinol-phosphate phosphatase. *Plant Physiol* 152, 1186-1196.
- Ros, R., Munoz-Bertomeu, J., and Krueger, S. (2014). Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends Plant Sci* 19, 564-569.
- Ruszkowski, M., and Dauter, Z. (2016). Structural Studies of Medicago truncatula Histidinol Phosphate Phosphatase from Inositol Monophosphatase Superfamily Reveal Details of Penultimate Step of Histidine Biosynthesis in Plants. *J Biol Chem* 291, 9960-9973.
- Ruszkowski, M., and Dauter, Z. (2019). Comment on Wang's paper on the covalent Cys-X-Lys bridges. *Protein Sci* 28, 470-471.
- Scaletti, E., Jemth, A.S., Helleday, T., and Stenmark, P. (2019). Structural basis of inhibition of the human serine hydroxymethyltransferase SHMT2 by antifolate drugs. *FEBS Lett* 593, 1863-1873.
- Stepansky, A., and Leustek, T. (2006). Histidine biosynthesis in plants. *Amino Acids* 30, 127-142.
- Szabados, L., and Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15, 89-97.
- Szebenyi, D.M., Liu, X., Kriksunov, I.A., Stover, P.J., and Thiel, D.J. (2000). Structure of a murine cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase quinonoid ternary complex: evidence for asymmetric obligate dimers. *Biochemistry* 39, 13313-13323.
- Townsend, J.H., Davis, S.R., Mackey, A.D., and Gregory, J.F. (2004). Folate deprivation reduces homocysteine remethylation in a human intestinal epithelial cell culture model: role of serine in one-carbon donation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 286, G588-G595.
- Turchetto-Zolet, A.C., Margis-Pinheiro, M., and Margis, R. (2009). The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. *Molecular Genetics and Genomics* 281, 87-97.
- Verbruggen, N., and Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753-759.
- Verslues, P.E., and Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book* 8, e0140.

- Wang, J.M. (2019). Crystallographic identification of spontaneous oxidation intermediates and products of protein sulfhydryl groups. *Protein Science* 28, 472-477.
- Winkler, M.E. (1996). "Histidine Biosynthesis," in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, ed. F.C. Neidhardt. (Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.).
- Wu, M., Wanggou, S.Y., Li, X.J., Liu, Q., and Xie, Y.Y. (2017). Overexpression of mitochondrial serine hydroxyl-methyltransferase 2 is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion in gliomas. *Oncotargets and Therapy* 10, 3781-3788.
- Wycisk, K., Kim, E.J., Schroeder, J.I., and Kramer, U. (2004). Enhancing the first enzymatic step in the histidine biosynthesis pathway increases the free histidine pool and nickel tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 578, 128-134.
- Zhang, Y., Sun, K., Sandoval, F.J., Santiago, K., and Roje, S. (2010). One-carbon metabolism in plants: characterization of a plastid serine hydroxymethyltransferase. *Biochem J* 430, 97-105.