



prof. dr hab. Michał Dadlez
Zakład Biofizyki, IBB PAN
Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa

Warszawa 10.06.2021

Ocena osiągnięcia naukowego i dorobku naukowego oraz działalności organizacyjnej i dydaktycznej p. doktora Miłozza Ruszkowskiego w związku z ubieganiem się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia

1. Sylwetka kandydata

Pan dr Miłozz Ruszkowski kończył w roku 2009 studia magisterskie na kierunku chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Pracę magisterską wykonał pod kierunkiem prof. Henryka Koroniaka. W 2014 roku uzyskał w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu stopień doktora nauk medycznych, na podstawie wyróżnionej pracy doktorskiej pt. „Badania strukturalne i biochemiczne białek zaangażowanych w regulację hormonalną u roślin”, której promotorem był dr hab. Michał Sikorski. Temat pracy określił pole zainteresowań kandydata na dłuższy czas, badania strukturalne białek roślinnych stanowią też temat pracy po doktoracie. Staż podoktorski pomyślany był tak, by ten kierunek wzmocnić. Kandydat spędził lata 2014-2018 w Synchrotron Radiation Research Section, Macromolecular Crystallography Laboratory, National Cancer Institute, Argonne, Stany Zjednoczone w grupie prof. Dautera. Kandydat odbył też dwa inne staże długoterminowe poza Polską. Po powrocie ze stażu podoktorskiego Kandydat utrzymał związek a IChB PAN w Poznaniu, otrzymując tam w 2019 roku stanowisko adiunkta, które piastuje do dziś.

2. Ocena osiągnięcia naukowego.

W skład osiągnięcia naukowego zatytułowanego „Struktura i molekularne mechanizmy wybranych enzymów roślinnych szlaków metabolicznych aminokwasów białkowych” włączono dziesięć prac z lat 2015-2019. Kandydat w większości z nich jest pierwszym

Autorem, tylko w trzech pracach nie. Co więcej w tych 7 pracach jest też Autorem korespondującym, zaś w jednej jest Autorem jedynym, co zdarza się dosyć rzadko. Prace publikowane były w czasopiśmie o wysokim IF, powyżej 4. W ich wyniku w bazie PDB zdeponowano 22 struktury. Jak dotąd prace te doczekały się 66 cytowań, co świadczy, że cieszą się one zainteresowaniem wąskiej grupy specjalistów. Kandydat szczegółowo opisuje swój wkład w powstanie każdej publikacji i jest on bez wątpienia kluczowy, obejmujący wszystkie etapy standardowo składające się na wykonanie projektu naukowego, od początkowej idei, pracy eksperymentalnej, do zakończenia publikacyjnego. Współautorzy prac H1, H2, H3 i H5 opisują swój wkład w zgodzie z deklarowanym wkładem Autora. Do publikacji H1, H2 wkład dr Bartazziniego został opisany przez dra Forloniego, pierwszego Autora tych prac. Oświadczeń współautorów pozostałych prac kilkautorских H4, H6, H7, H8, H10 brak (drs Dauter, Sekula, Ruszkowska, Contestabile, Nogues, Angelaccio, Szczepaniak). Prof. Dauter opisał swój wkład w pracy H5, ale w pozostałych już nie, nie było chyba ku temu przeszkód? Trudno zrozumieć przyczynę niedopełnienia tej istotnej formalności, nawet jeśli dr Ruszkowski jest w większości z tych prac autorem korespondującym.

Tematyka prac, z jednym wyjątkiem, spójnie skupia się na badaniu własności strukturalnych białek roślinnych związanych z metabolizmem aminokwasów, proliny, histydyny i seryny, w zgodzie z tytułem osiągnięcia. Tak też kandydat precyzuje swój cel rozszerzając pole widzenia o kompleksy badanych białek z ich niskocząsteczkowymi partnerami, substratami, kofaktorami, czy regulatorami aktywności. Autoreferat nie zawiera uzasadnienia szczególnego zainteresowania kandydata tą klasą białek.

Opis osiągnięcia podzielono na cztery sekcje, omawiające wyniki dla każdego z badanych obiektów: reduktazy δ 1-pirolino-5-karboksylianowej, pierwszego i dwóch ostatnich enzymów szlaku biosyntezy histydyny, cytozolowej i mitochondrialnej izoformy hydroksymetylotransferazy serynowej oraz aminotransferazy fosfoserynowej. Na niemal 20 stronach szczegółowo opisano uzyskane rezultaty, ilustrując je w bardzo czytelny sposób. Pierwszy obiekt, reduktaza P5C uczestniczy w ostatnim etapie obu szlaków biosyntezy proliny. Przedmiotem zainteresowania kandydata były molekularne podstawy potranslacyjnej regulacji jej aktywności, badane na poziomie struktur atomowych. Pracę poprzedziła dogłębna analiza filogenetyczna, pozwalająca wskazać elementy białka, które determinują dimeryczną lub dekameryczną formę oligomeryczną oraz opracować model minimalistycznej struktury reduktazy oparty na znanych wcześniej strukturach ortologów bakteryjnych i ludzkich. Autoreferat wskazuje

wkład kandydata jako określenie struktury P5C z ryżu z rozdzielczością 3,4 Å. Tę samą strukturę opisano też w drugiej publikacji (H2), opublikowanej w tym samym tomie, co publikacja H1, trudno więc rozdzielić wkład Autora do publikacjach H1 i H2. Prace te dały też impuls do określenia struktury reduktazy z *Medicago truncatula*, oraz kompleksów tego enzymu z NAD⁺, NADP⁺ i proliną z dokładnością lepszą niż 2 Å, co opisano w publikacji H3. Autoreferat uzasadnia podjęcie tych badań brakiem struktur krystalicznych roślinnych reduktaz P5C, przy dostępności kilkunastu modeli strukturalnych reduktaz bakteryjnych i ludzkich, a szczególnie brakiem wiedzy o molekularnych podstawach potranslacyjnej regulacji aktywności tych białek, czy roli kofaktorów w tym procesie. Oryginalną obserwacją okazało się stwierdzenie preferencji roślinnych reduktaz P5C do wiązania koenzymu NADPH, uzasadnione detalami określonych przez Autora struktur białek i nieoczekiwana zależność aktywności enzymu od obecności kationów i anionów i użytego koenzymu.

Podobnie motywowany, brakiem specyficznej dla roślinnych enzymów szlaku syntezy histydyny, był drugi blok tematyczny (publikacje H4-H9). Dodatkowym argumentem była konieczność syntezy histydyny w świecie roślin, czyniąca szlak jej syntezy potencjalnym celem projektowania herbicydów. Praca Kandydata poszerzyła spektrum dostępnych struktur roślinnych enzymów szlaku histydyny o trzy pozycje, opisane w trzech publikacjach (H4,H6,H9). Pozwoliło to na określenie cech szczególnych enzymów roślinnych i ich odrębności w stosunku do enzymów bakteryjnych. Badania ujawniły też ważne aspekty regulacji tych enzymów.

Pierwszy z badanych enzymów o aktywności transferazy fosforybozylo-ATP (ATP-PRT) reprezentuje pierwszy etap szlaku biosyntezy histydyny i jest przez jej poziom regulowany. Badania Autora pozwoliły na rozwiązanie struktury pierwszego enzymu ATP-PRT z organizmu eukariotycznego z użyciem kryształów białka znakowanego selenometioniną. Badania pozwoliły też na zmapowanie miejsca wiązania histydyny i rozpoznanie zakresu zmian allosterycznych towarzyszących temu wiązaniu, które okazały się bardzo silne, obejmujące ruchy całych domen i zmianę topologii całego homooligomerycznego kompleksu, powodującą „zamykanie” całej jego struktury. Pokazano również synergistyczny efekt obecności AMP i histydyny w miejscu aktywnym, wskazując na mechanizm regulacyjny, uzależniający poziom produkcji histydyny w od zmiany stosunku ATP/AMP. Badania ujawniły silne odmienności strukturalne enzymu roślinnego, w porównaniu do bakteryjnych enzymów ATP-PRT o znanych strukturach trójwymiarowych.

Z kolei, przedostatni w cyklu enzym, fosfataza fosforanu histydynolu (HPP), stanowi przykład molekularnej konwergencji ewolucyjnej, z odmiennymi źródłowymi rodzinami białkowymi w przypadku bakterii i roślin, dodatkowo zwiększając wartość uzyskanych rezultatów. Efekt

konwergencji pozwolił Autorowi na zaproponowanie przeniesienia mechanizmu katalitycznego, zaprezentowanego wcześniej dla enzymów bakteryjnych na własną strukturę. W toku analizy dimerycznej formy enzymu badania Autora ujawniły istnienie nietypowego kowalencyjnego mostka łączącego lizyny 158 jednego z monomerów z cysteinami 245 drugiego. Obserwacja ta naprowadziła Autora na poszukiwanie podobnego mostka Lys-Cys w innych białkach i podsumowanie tych poszukiwań w odrębnej publikacji H5.

Rozwiązanie struktury trzeciego enzymu tego szlaku, dehydrogenazy L-histydynolu zamyka cykl prac dotyczących szlaku syntezy histydyny. Enzym ten zamyka też szlak syntezy ostatnim krokiem utleniania aldehydu histydynowego do histydyny. Określono struktury tego enzymu w trzech wariantach kompleksu z imidazolem, histydynolem oraz w kompleksie z NAD^+ i histydyną. Ujawniono podobieństwo z bakteryjnymi ortologami.

W ostatnim bloku tematycznym badano struktury przestrzenne hydroksymetylotransferazy serynowej SHMT oraz aminotransferazy fosfoserynowej. Badania te mają szerszy wymiar ze względu na potencjalnie kluczową rolę aktywności SHMT dla szybko proliferujących komórek, co powoduje zainteresowanie tymi enzymami jako ewentualnymi celami terapii. Strukturę SHMT z chloroplastów *M. truncatula* rozwiązano stosując nasączenie kryształu selenomocznikiem. Analiza serii wariantów kompleksu białko-ligand ujawniła skorelowaną z etapem reakcji zmianę konformacyjną tyrozyn 143,144, która powinna być uwzględniana przy projektowaniu inhibitorów tego enzymu. Autor podjął działania przybliżające stworzenie nowych antyfolianów skierowanych na SHMT rozwiązując struktury SHMT z *M. truncatula* ze związanymi dwoma związkami kandydackimi, analogami kwasu foliowego: metotreksatem i pemetreksedem wskazując ten drugi związek jako lepiej rokujący. Także rozwiązanie trzech struktur aminotransferazy fosfoserynowej (PSAT) z *A. thaliana* na różnych etapach katalizy rozszerzyło wiedzę o fosforylowanej ścieżce biosyntezy seryny.

Rozprawa dokumentuje sukces kandydata w określaniu struktur serii nowych enzymów roślinnych w wielu wariantach ich kompleksów z niskocząsteczkowymi partnerami (w efekcie zdeponowano w PDB 22 nowe struktury), co w świetle znanych problemów z uzyskiwaniem dobrej jakości kryształów świadczy o tym, że Autor umie planować i prowadzić badania tak, by zminimalizować ryzyko porażki. Rozwija swój warsztat metodyczny sięgając po nowoczesne podejścia krystalograficzne i oznaczenia biochemiczne. Znaczenie badań Autora wykracza poza skatalogowanie serii następných białek roślinnych o poznanej strukturze, przyczyniły się do lepszego zrozumienia mechaniki molekularnej procesów enzymatycznych podstawowego metabolizmu roślin, ważnych nie tylko ze względu na ich rolę w syntezie aminokwasów, jak również o znaczeniu wybiegającym poza nauki podstawowe. Badania opisane w rozprawie ujawniły bowiem informacje, które mogą się przyczynić do tworzenia nowych terapeutyków.

3. Inne osiągnięcia naukowe kandydata.

Autor legitymuje się łącznie 24 publikacjami w recenzowanych czasopismach. Poza 9 wchodzącymi w skład rozprawy, dokumenty wymieniają 11 prac z okresu po uzyskaniu doktoratu, 3 prace opublikowane w toku doktoratu i jedną z okresu studiów magisterskich. Prace te było ogółem cytowane 148 razy (126 bez autocytowań), w tym prace zaliczone do osiągnięcia naukowego 66 razy. Daje to indeks Hirscha 9. Dorobek bibliometryczny Autora jest adekwatny do etapu kariery naukowej, co wspiera 61 zdeponowanych w PDB struktur. Należy też podkreślić liczne kontakty i wspólne działania z innymi grupami badawczymi, głównie spoza Polski (USA, Chin, Norwegii, Włoch, Kanady). Kandydat regularnie prezentuje wyniki swoich badań w formie posterów na znaczących konferencjach, jest też dwukrotnym laureatem stypendium naukowego a jego praca doktorska została wyróżniona. Bierze też udział w specjalistycznych szkoleniach i warsztatach naukowych.

Prace powstałe w toku doktoratu odzwierciedlają jego temat. Dotyczą roli i funkcjonowania hormonów roślinnych regulujących wzrost i rozwój roślin. Autor zajął się badaniami strukturalnymi białek pośredniczących w transdukcji sygnału pochodzącego od cytokinin. Określił stan oligomeryczny noduliny z grupy białek związanych z patogenezą (Pathogenesis-related Class 10, PR-10) i wskazał miejsce wiązania cytokinin we wnęce, tworzonej przez dwa monomery białka. Oprócz krytalografii wykorzystywał też inne techniki takie jak SAXS, czy DLS. Zainteresowanie kaskadą cytokininową naprowadziło Autora na rodzinę białek zawierających histydyne i przenoszących fosforan (Histidine-containing Phosphotransfer Protein, HPt). Udało mu się rozwiązać z bardzo wysoką rozdzielczością struktury krystaliczne dwóch białek z rodziny HPt pochodzących z modelowej rośliny, *M. truncatula*. Produkty białkowe badał też innymi metodami biofizycznymi i biochemicznymi. Badania ujawniły cechy strukturalne białek z rodziny HPt rozpoznawanych przez różne kinazy receptorowe.

4. Aktywność dydaktyczna i popularyzatorska.

Działalność dydaktyczna Kandydata ogranicza się do indywidualnego prowadzenia młodszych naukowców z misją przekazywania im bogatego doświadczenia eksperymentatora. Kandydat sprawował opiekę nad kilkoma stażystami, prowadził pracę magisterską, obecnie sprawuje opiekę nad dwójką doktorantów, po nabyciu uprawnień może zostać ich promotorem. Miejsce zatrudnienia Kandydata nie obliguje do szerszej działalności edukacyjnej. Działalność organizacyjna z kolei sprowadza się do pełnienia funkcji kierownika w trzech projektach

grantowych. Kandydat był też członkiem komitetów organizacyjnych trzech polskich konferencji. Szersza działalność edukacyjna i organizacyjna nie są na liście priorytetów Kandydata. Recenzuje publikacje dla takich czasopism, jak: Acta Crystallographica, Biochemical Journal, Biochemistry, Biochimie, FEBS Letters, etc.

5. Wniosek końcowy

W podsumowaniu, zdaniem recenzenta dorobek przedstawiony jako osiągnięcie naukowe p. doktora Miłosza Ruszkowskiego wypełnia z nawiązką wymagania stawiane w postępowaniach w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Recenzent wnioskuje zatem o nadanie p. doktorowi Miłoszowi Ruszkowskiemu stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne, oraz o wyróżnienie tej rozprawy habilitacyjnej.



prof. dr hab. Michał Dadlez