

Prof. dr hab. Marcin Nowotny

Warszawa, 21.06.2021

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej

Ul. Trojdena 4

02-109 Warszawa

OCENA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

p.t. „Struktura i molekularne mechanizmy wybranych enzymów roślinnych szlaków metabolicznych aminokwasów białkowych.”

ORAZ AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ, DYDAKTYCZNEJ I POPULARYZATORSKIEJ

DR MIŁOSZA RUSZKOWSKIEGO

W POSTĘPOWANIU HABILITACYJNYM

Do oceny przedstawiono następujące materiały: kopię dyplomu doktorskiego, autoreferat w języku polskim, autoreferat w języku angielskim, wykaz pozostałych osiągnięć w tym wykaz wszystkich opublikowanych prac, oświadczenia współautorów o ich wkładzie w publikacje oraz kopie prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Dr Ruszkowski uzyskał tytuł magistra w roku 2009 na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Pracę doktorską zatytułowaną „Badania strukturalne i biochemiczne białek zaangażowanych w regulację hormonalną u roślin” obronił z wyróżnieniem w roku 2014 w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. W latach 2014-2018 był zatrudniony jako stażysta podoktorski w Synchrotron Radiation Research Section, Macromolecular Crystallography Laboratory, National Cancer Institute, Argonne, Stany Zjednoczone. Od 2019 jest zatrudniony jako adiunkt w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

OCENA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

W skład ocenianego osiągnięcia wchodzi dziesięć prac:

1. Forlani, G., i wsp. *Frontiers in Plant Science* (2015) 6, 567.
2. Forlani, G., i wsp. *Frontiers in Plant Science* (2015) 6, 565.
3. Ruszkowski, M.* i wsp. *Frontiers in Plant Science* (2015) 6, 869.
4. Ruszkowski, M.* i Dauter, Z. *Journal of Biological Chemistry* (2016) 291(19), 9960.
5. Ruszkowski, M.* i Dauter, Z. *Protein Science* (2016) 25, 1734.
6. Ruszkowski, M.* i Dauter, Z. *Scientific Reports* (2017) 7, 10476.
7. Ruszkowski, M.,* i wsp. *Frontiers in Plant Science* (2018) 9, 584.
8. Sekula, B., i wsp. *Frontiers in Plant Science* (2018) 9, 876.
9. Ruszkowski, M.* *Biochemical Journal* (2018) 475, 2681.
10. Ruszkowski, M.,* i wsp. *Scientific Reports* (2019) 9, 19614.

Jest to duża liczba prac zgłoszonych, jako osiągnięcie habilitacyjne. W niniejszej recenzji skupię się na tych publikacjach, które w mojej opinii są najważniejsze wśród wskazanych powyżej i mogłyby samodzielnie stanowić podstawę wniosku o przyznanie stopnia doktora habilitowanego. Są to prace pierwszoautorskie dr Ruszkowskiego opublikowane w czasopismach o dobrym współczynniku oddziaływania i widzialności w nauce światowej (*Journal of Biological Chemistry* czy *Scientific Reports*). Warto podkreślić, że we wszystkich pracach pierwszoautorskich habilitant jest również autorem korespondującym, co świadczy o jego całkowitej samodzielności naukowej. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego stanowią spójny ciąg badań dotyczący strukturalnych i mechanistycznych badań roślinnych enzymów ze szlaków syntezy proliny, histydyny i seryny. Element wspólny dla przedstawionych prac to metodyka badawcza, w której specjalizuje się habilitant – krystalografia białkowa. Przetawione prace są na bardzo wysokim poziomie merytorycznym i technicznym. Prezentowane są struktury przestrzenne wysokiej jakości (wiele z nich zostało określone przy wysokiej rozdzielczości), a w większości projektów rozwiązano kilka struktur z różnymi ligandami, aby w pełni zrozumieć mechanizm działania danego enzymu. Co ważne, w pracach tych oprócz badań strukturalnych przeprowadzono badania kinetyki reakcji enzymatycznych, co jest kluczowe dla potwierdzenia hipotez formułowanych na podstawie modeli krystalograficznych. W publikacjach zwraca uwagę bardzo staranne przygotowanie rycin prezentujących struktury, które klarownie ilustrują ich najważniejsze elementy.

W pracy Ruszkowski, M. i wsp. *Frontiers in Plant Science* z roku 2015 habilitant jest pierwszym z czterech autorów. Praca opisuje struktury krystaliczne reduktazy δ^1 -pirolino-5-karboksylationu (P5C),

która katalizuje ostatni wspólny etap dwóch ścieżek biosyntezy proliny u roślin. Enzym tworzy dekamery, a w pracy prezentowane są struktury w formie apo oraz kompleksów z NAD^+ , NADP^+ i L-proliną. Jedną z najważniejszych konkluzji pracy jest identyfikacja mechanizmu preferencji fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) jako kofaktora reduktazy P5C. Mechanizm ten polega na specyficznym wiązaniu grupy fosforanowej w pozycji 2' rybozy przez zachowaną w ewolucji pętlę białka. Co ciekawe, struktury roślinnej reduktazy P5C pozwoliły skorygować błędnie określony sposób wiązania kofaktora w enzymie ludzkim. Habilitant miał wiodący wkład do tej pracy. Sformułował problem badawczy, zaplanował i wykonał prace i oraz przygotował manuskrypt. Jest autorem korespondującym.

W pracy Ruszkowski, M. i Dauter, Z. z roku 2016 opisano struktury nowoodkrytego enzymu katalizującego przedostatni etap syntezy histydyny u roślin - fosfatazy fosforanu histydynolu (HISN7 wg. terminologii enzymów z tej ścieżki). Struktura pokazała, że ten dimeryczny enzym nie jest spokrewniony z tego typu enzymami z prokariotów i jest bardziej podobny do fosfataz monofosforanu inozytolu. Podobnie jak w poprzedniej pracy, określono serię struktur kompleksów białka z substratem, produktem (L-histidynolem) i jonem fosforanowym (produktem ubocznym), co pozwoliło ustalić szczegóły mechanizmu katalizowanej przez enzym reakcji. Bardzo ciekawa jest opisana w tej pracy obserwacja obecności kowalencyjnego połączenia (mostka) między łańcuchami bocznymi lizyny i cysteiny pochodzącymi z różnych podjednostek dimeru białka. Według mojej wiedzy jest to pierwszy przykład tego typu mostka w białkach i stanowi fundamentalne odkrycie w strukturze i biochemii białek. Autorzy zinterpretowali to połączenie, jako połączenie grupą metylenową. Alternatywną interpretację przedstawił Jimin Wang, który na podstawie analizy gęstości elektronowej dla struktur HISN7 zaproponował, że połączenie zachodzi przez atom tlenu (Wang J, Protein Science, 2019). W odpowiedzi habilitant wraz z dr Dauterem opublikowali analizę dostępnych struktur, która potwierdza występowanie mostka metylenowego w innych białkach (praca Ruszkowski, M. i Dauter, Z. Protein Science, 2016 wchodząca w skład osiągnięcia habilitacyjnego). Ciekawym wkładem do tej dyskusji jest ostanía praca dotycząca struktur tansladolazy rozwiązanych przy rozdzielczości ok. 1 Å, w której mediowany przez atom tlenu mostek między lizyną a cysteiną opisany jest jako sensor potencjału redoks (Wensien, Nature, 2021; 593, 460). Jest możliwe, że w różnych białkach są obecne mostki NCS lub NOS. Ostateczne rozwiązanie tej fascynującej kwestii będzie możliwe, kiedy zostaną rozwiązane struktury, których zostaną zwizualizowane atomy wodoru mostka (obecne w grupie metylenowej, ale nie na atomie tlenu). Można to osiągnąć przez określenie struktur metodami dyfrakcji promieniowania rentgena przy rozdzielczościach poniżej 1 Å lub rozpraszania neutronów.

W pracy Ruszkowski, M. i Dauter, Z. *Scientific Reports* (2017) opisano struktury dehydrogenazy L-histydynolu (HISN8), ostatniego enzymu ścieżki syntezy histydyny, który katalizuje dwie reakcje utleniania. Przedstawiono struktury w kompleksie z imidazolem, histydynolem, oraz histydyną i NAD^+ . Określenie serii struktur pozwoliło na kompletny opis wiązania substratów oraz (po raz pierwszy) kofaktora. Co ważne struktura z NAD^+ pozwoliła zwizualizować katalityczne usytuowanie kofaktora. Habilitant odpowiadał za wszystkie etapy przygotowania tej pracy i jest autorem korespondującym.

W publikacji Ruszkowski, M., i wsp. *Frontiers in Plant Science* (2018) opisano badania struktury hydroksymetylasy seryny, która prowadzi przemianę seryny do glicyny w sposób zależny lub niezależny od tetrahydrofolianu. Enzym ten jest zaangażowany w kluczowy proces tworzenia tak zwanych fragmentów jednowęglowych, elementów składowych ważnych metabolitów. Praca opisuje struktury chloroplastowej formy tego enzymu. Tworzy on dimer dimerów. Określono struktury ze związaną grupą prostetyczną fosforanem pirydoksalu, a także po nasączeniu seryną, które pozwoliły szczegółowo zwizualizować przebieg reakcji enzymatycznej, w tym zmiany konformacji reszt centrum aktywnego. Habilitant odpowiadał za wszystkie etapy przygotowania tej pracy i jest autorem korespondującym.

Habilitant jest jedynym autorem pracy Ruszkowski, M. *Biochemical Journal* z roku 2018. To obecnie dość rzadka sytuacja w pracach doświadczalnych i świadczy o całkowitej samodzielności naukowej habilitanta. W pracy tej opisane są struktury pierwszego enzymu ścieżki syntezy histydyny HISN1 (transferazy fosforybozylo-ATP), który wytwarza fosforybozo-ATP i jest allosterycznie hamowany przez histydynę. Są to obecnie jedyne struktury tego enzymu z eukariontów. Habilitant rozwiązał struktury dwóch stanów tego heksamerycznego enzymu, znacząco różniących się konformacją: tzw. luźnej i zwartej. Enzym przyjmuje formę zwartą po związaniu AMP i histydyny a struktury pozwoliły wyjaśnić szczegóły zmian konformacyjnych między dwoma formami. W badaniach kinetycznych AMP, który wiąże się do centrum aktywnego, zwiększał czułość enzymu na hamowanie przez histydynę. Dzięki temu mechanizmowi enzym może być regulowany przez stan energetyczny komórki.

Ostatnia omawiana praca to Ruszkowski, M., i wsp. *Scientific Reports* (2019). Opisuje badania mitochondrialnej izoformy hydroksymetylotransferazy serynowej, która przekształca serynę do glicyny wraz z przeniesieniem grupy metylenowej na tetrahydrofolian. Ludzki enzym jest obiecującym celem do tworzenia leków przeciwnowotworowych. Dwa z takich leków to Metotreksat (MTX) i pemetreksed (PTX). Praca opisuje struktury przestrzenne kompleksów roślinnej

hydroksymetylotransferazy serynowej w kompleksie z MTX i PTX. Biorąc pod uwagę duże podobieństwo kieszeni wiążącej inhibitor w białku roślinnym i ludzkim (Fig. 8 publikacji), białko roślinne może być dobrym modelem wiązania liganda. Habilitant odpowiadał za wszystkie etapy przygotowania tej pracy i jest autorem korespondującym.

Prace doświadczalne habilitanta są na bardzo wysokim poziomie technicznym i zawierają ogromną ilość danych strukturalnych wysokiej jakości. Wkład koncepcyjny w planowanie doświadczeń świadczy o naukowej samodzielności habilitanta. Osiągnięcie naukowe dr Ruszkowskiego oceniam bardzo wysoko i w mojej opinii spełnia ono wymogi do nadania stopnia doktora habilitowanego.

POZOSTAŁY DOROBEK NAUKOWY, DYDAKTYCZNY I ORGANIZACYJNY ORAZ POPULARYZACJA NAUKI

Oprócz prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, dr Ruszkowski wykazał 15 prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora. Wśród nich jest praca dotycząca struktury ludzkiej metylotransferazy 16 (METTL16), która ostatnio budzi wiele zainteresowania, jako jeden z głównych enzymów modyfikujących mRNA. Praca jest efektem współpracy z laboratorium dr J. Brown z University of Notre Dame. Habilitant wykazał 4 prace opublikowane podczas wykonywania pracy doktorskiej. Całkowity dorobek publikacyjny dr Ruszkowskiego oceniam wysoko.

Imponująca jest liczba struktur w bazie Protein Data Bank, których współautorem jest dr Ruszkowski. Według odpowiedniego wyszukiwania w bazie <https://www.rcsb.org/> jest to obecnie 66 struktur (odpowiednia tabela zamieszczona jest również w autoreferacie). Udział w rozwiązaniu tak dużej liczby struktur musiał się wiązać z dużym nakładem pracy. Dopracowanie każdej struktury do jakości wymaganej do zdeponowania w PDB jest żmudne i czasochłonne. Dr Ruszkowski kieruje obecnie projektem NCN SONATA, jest też laureatem grantu powrotowego NAWA. Osiągnięcia dydaktyczne habilitanta ograniczają się do opieki naukowej nad stażystami/magistrantami. Jest to typowe dla osób pracujących w instytucjach, które całkowicie koncentrują się na badaniach naukowych.


Podsumowując oceniam, że cały pozostały dorobek naukowy dr Ruszkowskiego spełnia wymogi do nadania stopnia doktora habilitowanego.

WNIOSKI KOŃCOWE

Biorąc pod uwagę osiągnięcia dr Miłosza Ruszkowskiego przedstawione w ocenianych dokumentach, z pełnym przekonaniem popieram jego wniosek do Rady naukowej Instytucji Chemii Bioorganicznej PAN o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk biologicznych w dyscyplinie biologia.

Biorąc pod uwagę, fakt, że habilitant opublikował serię wartościowych prac naukowych, w których pełni rolę autora korespondującego, wnioskuję nagrodzenie rozprawy stosowaną nagrodą.

Prof. dr hab. Marcin Nowotny



Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej