

Dr hab. Przemysław Grudnik
Team Leader and Core Facility Leader
Structural Biology Core Facility
Malopolska Centre of Biotechnology (MCB)
Jagiellonian University in Krakow
Gronostajowa 7a st.
30-387 Krakow, Poland
Ph: +48 12 664 6106
przemyslaw.grudnik@uj.edu.pl
www.structuralbiology.pl



Kraków, 16.10.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Wojciecha Witka pt. „*Structural Biology of the Histidine Biosynthetic Pathway in Plants*”

Wykonanej w Zakładzie Biologii Strukturalnej Eukariontów, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem dr. hab. Miłosza Ruszkowskiego prof. ICHB PAN

Rozprawa doktorska pod tytułem „*Structural Biology of the histidine biosynthetic pathway in plants*” przygotowana przez mgr. Wojciecha Witka porusza istotny temat szlaku biosyntezy histydyny w roślinach, ze szczególnym uwzględnieniem badań wykorzystujących modelową roślinę należącą do rodziny bobowatych z gatunku lucerny *Medicago truncatula*.

Struktura przedstawionej pracy doktorskiej opiera się na wprowadzeniu do tematyki biosyntezy histydyny oraz omówieniu wyników badań przedstawionych w czterech artykułach naukowych. Praca jest dobrze skonstruowana, składa się z 13 rozdziałów, obejmujących obszerny wstęp, szczegółową metodologię, rozdział z wynikami oraz końcową dyskusję. Podział pracy na takie sekcje jak wprowadzenie, omówienie znaczenia badań, cele pracy oraz opis metodologii ułatwia zrozumienie złożoności prowadzonych badań. Najważniejszym elementem pracy są jednak załączone publikacje naukowe, które stanowią trzon dorobku naukowego Doktoranta. W Rozdziale 10 Autor skupia się na syntetycznym omówieniu wyników stanowiących podstawę załączonych publikacji. Całość dopełnia rozdział z wnioskami oraz perspektywami przyszłych badań, co w mojej opinii wzmacnia wartość pracy.

Warto podkreślić, że Doktorant w umiejętny sposób wprowadził w tematykę swoich badań w wyczerpującym przeglądzie literatury, który przybliżył tematykę biosyntezy histydyny w roślinach, nakreślił kontekst ewolucyjny, przedstawia argumenty za podjęciem wybranej tematyki badawczej oraz wprowadza gatunek *M. truncatula* jako badawczy organizm modelowy.

W rozdziale opisującym cele badawcze pracy doktorskiej, Autor słusznie zauważa, że prace wykorzystujące metodologię biologii strukturalnej, często odchodzą od typowego schematu formułowania hipotezy badawczej i późniejszej jej weryfikacji a mają raczej charakter eksploracyjny. Zgadzam się z nim w tej kwestii. Jednocześnie, warto podkreślić, że Kandydat dobrze nakreślił pytania badawcze, a także przedstawił specyficzne cele pracy. Dzięki temu, nie odnoszę wrażenia, że praca jest rezultatem chaotycznego błędzenia pośród tematów i próbą spięcia ich w mniej lub bardziej sensowną całość, lecz przeciwnie, jest spójną tematycznie i metodologicznie pracą nad

rozwikłaniem konkretnego problemu badawczego. Za to należy się duże uznanie, zarówno dla Autora jak i nadzorującego postęp prac Promotora.

Szczególnie bliska jest mi metodologia badań przedstawionych w pracy doktorskiej, zarówno ta oparta na badaniach strukturalnych z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej czy kriomikroskopii elektronowej, jak i ta bazująca na metodach biofizycznych np. kalorymetrii. Uważam, że Doktorant zastosował zaawansowane techniki badawcze co świadczy o jego wysokich kompetencjach jako badacza.

Jak wspomniałem powyżej najważniejszym elementem każdej rozprawy doktorskiej są wyniki prac badawczych. W przedstawionej pracy są one przedstawione na dwójnasób. Najpierw, Autor, streszcza rezultaty swoich badań w rozdziale 9 pracy, równocześnie je dyskutując, a następnie całość wyników przedstawiona jest w załączonych 4 pracach eksperymentalnych jego współautorstwa. Następnie omawia zaprezentowane w poszczególnych pracach wyniki. Chciałbym jednak już teraz podkreślić wysoką ich wartość merytoryczną oraz fakt, że zostały już poddane rygorystycznej ocenie przez recenzentów zewnętrznych w procesie tzw. *peer review*.

1. WITEK W, SLIWIAK J, RUSZKOWSKI M. STRUCTURAL AND MECHANISTIC INSIGHTS INTO THE BIFUNCTIONAL HISN2 ENZYME CATALYZING THE SECOND AND THIRD STEPS OF HISTIDINE BIOSYNTHESIS IN PLANTS. SCI REP. 2021 MAY 6;11(1):9647. DOI: 10.1038/s41598-021-88920-2. PMID: 33958623; PMCID: PMC8102479.

W powyższej publikacji autorzy przedstawili badania nad strukturą i funkcją enzymu HISN2 w *Medicago truncatula*, który bierze udział w biosyntezie histydyny. Autorzy opisują, w jaki sposób HISN2, będący enzymem bifunkcyjnym, katalizuje dwa etapy szlaku biosyntezy histydyny poprzez dwie odrębne domeny: fosforybozylo-ATP pirofosfohydrolazy (PRA-PH) oraz fosforybozylo-AMP cyklohydrolazy (PRA-CH). Ich badania opierają się na analizie strukturalnej z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej, której wyniki ukazują m.in. interakcję enzymu z cząsteczką AMP, potencjalnym regulatorem biosyntezy histydyny. Badanie dostarcza szczegółowych informacji molekularnych na temat wiązania AMP z obiema domenami katalitycznymi enzymu, sugerując mechanizm regulacyjny, który mógłby modulować aktywność enzymu.

Struktura krystaliczna *MtHISN2* pokazuje, że enzym ten tworzy ścisły dimer. Autorzy podkreślają również znaczące różnice strukturalne między homologami roślinnymi i bakteryjnymi, podkreślając ewolucyjne różnice w architekturze tego enzymu. W mojej ocenie głównym wkładem pracy jest odkrycie, że cząsteczka AMP działa jako inhibitor enzymu HISN2, co zostało zademonstrowane za pomocą testów inhibicji i metod mikrokalorymetrycznych.

Ogólnie praca pozostawia bardzo dobre wrażenie, w szczególności dzięki dbałości o często pomijalne detale. Można to na przykład zauważyć w opisie metod badawczych, gdzie przedstawiono dokładny skład roztworów krystalizacyjnych z zestawu *Morpheus*, co często jest przez autorów prac krystalograficznych opisywane zdawkowo, jedynie numerem konkretnego roztworu. W tym miejscu zwraca także uwagę użycie glikolu etylenowego do krioprotekcji kryształów, co poniekąd zastanawia, gdyż wartością dodaną roztworów *Morpheus* jest obecność składników krioprotekcyjnych. W związku z tym, chciałbym aby Autor skomentował czy kryształy niepoddane dodatkowej krioprotekcji nie rozpraszały promieniowania rentgenowskiego?

Czytając dalej pracę, zastanawia mnie dlaczego Autorzy nie pokusili się o bardziej kontrastową wizualizację wyników badań strukturalnych? Użycie kolorystyki zielono-seledynowej znacząco utrudnia odbiór wyników, w szczególności na rysunkach przedstawiających mapy gęstości elektronowej również w kolorze zielonym. Mam nadzieję, że to pytanie zasugeruje zmianę kolorystyki użytej podczas obrony doktoratu. Ponadto, zadziwia dosyć konserwatywne podejście do określenia rozdzielczości rozwiązywanych struktur. Analizując Tabelę nr 1, a w szczególności współczynniki I/σ oraz $CC1/2$ mam nieodparte wrażenie, że Autorzy mogliby się pokusić o rozwiązanie struktury przy wyższej rozdzielczości. Tutaj nasuwa się pytanie, jakie kryteria odcięcia zostały przyjęte? Czy wykonywany został tzw. *pair refinement*? Dodatkowo, dla struktury enzymu ze związaną cząsteczką AMP wartości R_{work}/R_{free} sugerują tzw. *over-refinement*. Liczę na komentarz podczas obrony.

Na koniec zastanowił mnie zadeklarowany wkład w powstanie tejże pracy. W Rozprawie doktorskiej Autor oświadcza:

My contributions were to: refine and analyze crystal structures, design mutants and conduct kinetic experiments, conduct in silico analyses, prepare figures, and write the manuscript.

Natomiast w artykule znajdziemy następujące stwierdzenie:

W.W. refined the structures, analyzed them, and drafted the manuscript.

Nasuwa się więc pytanie o wkład Autora w powstanie tej pracy. Skąd biorą się powyższe różnice w oświadczeniach?

2. WITEK W, IMIOLCZYK B, RUSZKOWSKI M. STRUCTURAL, KINETIC, AND EVOLUTIONARY PECULIARITIES OF HISN3, A PLANT 5'-PROFAR ISOMERASE. PLANT PHYSIOL BIOCHEM. 2024 OCT;215:109065. DOI: 10.1016/j.plaphy.2024.109065. EPUB 2024 AUG 22. PMID: 39186852.

W powyższej pracy Autorzy badają strukturę i funkcję enzymu HISN3 z rośliny *Medicago truncatula*, który katalizuje czwarty etap biosyntezy histydyliny. HISN3, jako izomeraza 5'-ProFAR, katalizuje reakcję izomeryzacji ProFAR do PrFAR. W pracy przedstawiono struktury krystaliczne HISN3 związane z substratem (ProFAR) oraz produktem (PrFAR). Szczególną cechą HISN3 u roślin, w porównaniu do homologicznych enzymów z bakterii czy grzybów, jest obecność kationu sodu w miejscu aktywnym. Badania kinetyczne wykazały, że roślinna wersja HISN3 ma wyższy współczynnik k_{cat} niż jego homologi bakteryjne, co może przyczyniać się do większej efektywności katalitycznej tego enzymu u roślin. Dodatkowo, sekwencje HISN3 u roślin zawierają wydłużony fragment, który, jak sugerują symulacje dynamiki molekularnej, wspomaga uwalnianie produktu z miejsca aktywnego enzymu. Na koniec, w ramach tzw. wirtualnego screeningu, autorzy zidentyfikowali pięć związków, które mogą stanowić potencjalne szkielety do dalszego rozwoju herbicydów.

Praca jest w mojej opinii bardzo wartościowa jednakże, podobnie jak w pracy dotyczącej struktury HISN2, Autorzy wykazują się dużym konserwyzmem w określaniu końcowej rozdzielczości struktury. Przede wszystkim widoczne jest to dla struktury enzymu w kompleksie ze związanym ProFAR. Ponadto, ostatni rozdział pracy opisuje wirtualne badanie przesiewowe w poszukiwaniu potencjalnych inhibitorów HISN3. Czy podjęto próbę eksperymentalnego poszukiwania takich cząsteczek np. przy użyciu krystalograficznego screeningu fragmentów

chemicznych? Czy otrzymane kryształy białka w ogóle pozwalają na takie podejście? Czy planowane jest też wykorzystanie innych metod przesiewowych?

3. WITEK W, SLIWIAK J, RAWSKI M, RUSZKOWSKI M. TARGETING IMIDAZOLE-GLYCEROL PHOSPHATE DEHYDRATASE IN PLANTS: NOVEL APPROACH FOR STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES, AND INHIBITOR BLUEPRINTING. FRONT PLANT SCI. 2024 MAR 15;15:1343980. DOI: 10.3389/fpls.2024.1343980. PMID: 38559763; PMCID: PMC10978614.

W mojej ocenie artykuł przedstawia nowatorskie podejście do badań strukturalnych i funkcjonalnych HISN5, a autorom udało się zastosować zarówno krystalografię rentgenowską, jak i kriomikroskopię elektronową (cryo-EM), w celu uzyskania struktur wysokiej rozdzielczości. Praca ta może mieć również duże znaczenie dla przyszłych badań nad projektowaniem selektywnych herbicydów. Doceniam przede wszystkim zastosowanie cryo-EM do zbadania struktury enzymu, w kompleksie z ligandem, szczególnie, że uzyskana rozdzielczość pozwoliła na rozróżnienie stereoizomerii ligandów. Natomiast badania krystalograficzne pozwoliły na identyfikację tzw. "hot-spotów" predysponowanych do wiązania specyficznych grup chemicznych. Dodatkowo, autorzy wykorzystali screening wirtualny związków chemicznych z bazy ZINC, a zidentyfikowane cząsteczki mogą posłużyć do projektowania specyficznych inhibitorów.

Podsumowując, uważam, że artykuł jest dobrze napisany i opiera się na solidnych fundamentach eksperymentalnych. W mojej opinii wnosi znaczący wkład w badania nad biosyntezą histydyny oraz potencjalnym rozwojem nowych herbicydów. Ponadto dodatkowym atutem jest użycie komplementarnych metod biologii strukturalnej do odpowiedzi na ciekawe pytania badawcze. W tym kontekście zastanawiające jest jedynie opublikowanie artykułu w periodyku specjalistycznym, a w mojej ocenie można było się pokusić o publikację w czasopiśmie o szerszym kręgu odbiorców z zakresu nauk biologicznych, także spoza szeroko pojętej botaniki. Zastanawia mnie także, czy Autorzy będą próbowali wyjść zastosować metody eksperymentalne (nie wirtualne) do poszukiwań inhibitorów?

4. RUTKIEWICZ M, NOGUES I, WITEK W, ANGELACCIO S, CONTESTABILE R, RUSZKOWSKI M. INSIGHTS INTO THE SUBSTRATE SPECIFICITY, STRUCTURE, AND DYNAMICS OF PLANT HISTIDINOL-PHOSPHATE AMINOTRANSFERASE (HISN6). PLANT PHYSIOL BIOCHEM. 2023 MAR;196:759-773. DOI: 10.1016/j.plaphy.2023.02.017. EPUB 2023 FEB 10. PMID: 36842242.

Czwarty artykuł z serii jest jedynym w którym Kandydat nie jest autorem wiodącym, jednakże spójnie wpisuje się w tematykę przedstawionej pracy doktorskiej, doskonale uzupełniając poprzednie artykuły. Artykuł przedstawia badania dotyczące enzymu HISN6. W mojej ocenie, autorzy wykonali wyjątkowo precyzyjną pracę, badając strukturę krystaliczną *MtHISN6*. Badania te, ukazały różnice strukturalne między roślinnymi a bakteryjnymi homologami tego enzymu, co otwiera nowe perspektywy dla rozwoju selektywnych herbicydów.

Zgodnie z zamieszczonym oświadczeniem, doktorant uzyskał (org. *obtain*) strukturę apo*MtHISN6* i przeanalizował ewolucję enzymu, napisał wstęp artykułu oraz rozdział o ewolucji enzymu. W związku z powyższym proszę o uściślenie tego stwierdzenia, w szczególności co określa wspomniane „otrzymanie” struktury? Ponadto, analiza tej struktury również wskazuje na potencjalny problem tzw. *over-refinementu*, który wymaga komentarza.

Podsumowując, Rozprawa zaprezentowana przez Pana mgr. Wojciecha Witka stanowi wartościowy wkład w badania biosyntezy histydyny u roślin, a szerzej, w dziedzinę biologii strukturalnej. Jestem pod wrażeniem warsztatu metodologicznego doktoranta, umiejętności zebrania

i opisanie wyników swoich prac oraz przedstawionych publikacji. Zawarta w pracy dyskusja a także przedstawienie kierunków przyszłych badań w połączeniu ze znakomitą wstępem doskonale łączą kłama całą pracę. W moim przekonaniu Doktorant w pełni udowodnił swoją dojrzałość badawczą.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 28/2024/Internet z dnia 20 marca 2024 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Wojciecha Witka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Ponadto, biorąc pod uwagę wartość naukową przedstawionej rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

dr hab. Przemysław Grudnik