

Poznań, 23.01.2023 r.

dr hab. Miłosz Ruszkowski
Zakład Biologii Strukturalnej Eukariontów
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
e-mail: mruszkowski@ibch.poznan.pl

Recenzja dorobku naukowego w postępowaniu habilitacyjnym **dra Przemysława Grudnika**

Przedmiotem oceny jest dorobek naukowy uwzględniony w osiągnięciu habilitacyjnym, pozostały dorobek naukowy oraz działalność organizacyjna, dydaktyczna i popularyzatorska.

I. Sylwetka habilitanta

Dr Przemysław Grudnik jest absolwentem Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, gdzie w 2005 roku otrzymał tytuł magistra biologii. W latach 2007-2012 był doktorantem na Uniwersytecie w Heidelbergu w grupie prof. Irmgard Sinning. Habilitant stopień doktora uzyskał w 2012 roku, a tytuł jego rozprawy brzmiał „Structural and functional characterization of prokaryotic SRP systems”. Od 2012 roku dr Grudnik pracuje na Uniwersytecie Jagiellońskim na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, gdzie najpierw odbył staż podoktorski w grupie badawczej prof. Grzegorza Dubina jako asystent, a od 2015 roku został zatrudniony jako adiunkt. Od 2018 roku habilitant pracuje również w Małopolskim Centrum Biotechnologii, piastując funkcje kierownicze. Chociaż dr Grudnik nie odbył stażu podoktorskiego za granicą Polski, należy podkreślić, że jest doktorem Uniwersytetu w Heidelbergu, więc staż został zrealizowany w innym kraju niż ten, w którym nadano Mu stopień doktora. Dr Przemysław Grudnik jest autorem trzydziestu artykułów naukowych, z których 28 ukazało się po uzyskaniu stopnia doktora.

II. Osiągnięcie naukowe w postępowaniu habilitacyjnym

Dr Przemysław Grudnik ubiega się o nadanie stopnia doktora habilitowanego na podstawie cyklu czterech artykułów naukowych. Osiągnięcie zatytułowane jest „Badania strukturalne i biochemiczne fosfotransferaz: ADP i ATP-zależnych glukokinaz oraz kinazy glicerolu”, a przedstawione artykuły to:

1. Tokarz P., Wiśniewska M., Kamiński M.M., Dubin G., Grudnik P. Crystal structure of ADP-dependent glucokinase from *Methanocaldococcus jannaschii* in complex with 5-iodotubercidin reveals phosphoryl transfer mechanism. *Protein Sci.* 2018 Mar;27(3):790-797. doi: 10.1002/pro.3377.
2. Grudnik P., Kamiński M.M., Rembacz K.P., Kuśka K., Madej M., Potempa J., Dawidowski M., Dubin G. Structural basis for ADP-dependent glucokinase inhibition by 8-bromo-substituted adenosine nucleotide. *J Biol Chem.* 2018 Jul 13;293(28):11088-11099. doi: 10.1074/jbc.RA117.001562.
3. Zak K.M., Kalińska M., Wątor E., Kuśka K., Krutyhołowa R., Dubin G., Popowicz G.M., Grudnik P. Crystal Structure of *Kluyveromyces lactis* Glucokinase (K/Glk1). *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 28;20(19):4821. doi: 10.3390/ijms20194821.
4. Wilk P., Kuśka K., Wątor E., MałECKI P.H., Woś K., Tokarz P., Dubin G., Grudnik P. Structural Characterization of Glycerol Kinase from the Thermophilic Fungus *Chaetomium thermophilum*. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 16;21(24):9570. doi: 10.3390/ijms21249570.

W przedstawionym autoreferacie omówienie osiągnięcia rozpoczyna sekcja zatytułowana „Ogólny zarys tematyki badawczej”. Habilitant zawarł w niej podstawowe informacje dot. metabolizmu glukozy w zdrowych i chorych komórkach, efektu Warburga, metabolizmu glicerolu a także przedstawił enzymy badane w ramach poszczególnych publikacji. Sekcja ta jednocześnie udowadnia, dlaczego zaprezentowane artykuły są „tematycznie powiązane”.

Artykuł #1 został wydany w *Protein Science*, które jest prestiżowym czasopismem o rosnącym ostatnio wskaźniku cytowań (impact factor, IF). Zaprezentowano w nim pierwszą strukturę krystaliczną dwufunkcyjnej i ADP-zależnej glukokinazy/fosfofruktokinazy (mjADPGK) z termofilnego archeona. Enzym mjADPGK jest zdolny do fosforylacji glukozy, używając ADP, tj. inaczej niż zdecydowana większość kinaz, które wykorzystują ATP. Strukturę rozwiązano w kompleksie z 5-jodotubercydyną (nieselektywny inhibitor kinaz), która wiąże się kompetencyjnie do ADP. Co więcej, związana cząsteczka glukozy, fosforan oraz kation magnezowy dały dobry pogląd na centrum aktywne mjADPGK i reszty aminokwasowe kluczowe dla katalizy. Ponieważ ludzki homolog ADPGK reguluje aktywację limfocytów T, wyniki uzyskane dla ADPGK mogą potencjalnie zostać wykorzystane do racjonalnego projektowania cząsteczek biologicznie aktywnych, mogących znaleźć zastosowanie np. w badaniach immunologicznych. Na podstawie Web of Science (WoS) artykuł #1 był cytowany sześć razy.

Artykułowi #2 przyświecało poszukiwanie inhibitorów ludzkiej ADPGK (hADPGK). Zaprezentowano w nim badanie aktywności hADPGK i jej inhibicji przez szereg pochodnych adeniny. Najsilniejszym inhibitorem (spośród przebadanych) okazał się 5'-fosforan 8-bromoadenozyny (8-Br-AMP). Ponieważ jednak nie otrzymano dostatecznej jakości kryształów hADPGK, jako modelu użyto homologa z *Pyrococcus horikoshii*, który łatwiej krystalizował i pozwolił na rozszyfrowanie sposobu wiązania 8-Br-AMP. Co ciekawe, oprócz miejsca, które odpowiada za kompetencyjny (do ADP) mechanizm inhibicji, zidentyfikowano również dodatkowe miejsce wiązania 8-Br-AMP. Eksperymenty kinetyczne z zastosowaniem punktowych mutein wykluczyły jednak rolę drugiego miejsca w inhibicji. Szkoda, że te dwa miejsca wiązania znajdują się daleko (~17 Å) od siebie, co raczej wyklucza sens projektowania cząsteczek zawierających elementy dwóch 8-Br-AMP połączonych łącznikiem. W pracy pokazano również, że 8-Br-AMP jest aktywne *in cellulo* dzięki zastosowaniu modelu aktywowanych ludzkich limfocytów T. Artykuł #2 został wydany w prestiżowym czasopiśmie *Journal of Biological Chemistry*. Uważam, że jest to najbardziej wartościowa praca przedstawionego osiągnięcia dra Grudnika, pomimo tego, że cytowana była zaledwie 4 razy (WoS).

Artykuł #3 opisuje właściwości kinetyczne i strukturę krystaliczną glukokinazy KIGlk1 z *Kluyveromyces lactis*, który jest gatunkiem wykorzystywanym biotechnologicznie. Ponieważ *K. lactis* wykorzystuje się m.in. do produkcji rekombinowanej laktazy i podpuszczki, badania pierwszorzędowego metabolizmu tego gatunku mogą potencjalnie poprawić wydajność procesów biotechnologicznych. Przedstawione w artykule badania dot. KIGlk1 pokazały, że jest on zdolny do fosforylacji glukozy, ale nie fruktozy. Zauważono także wysoką czułość na ATP, które powoduje inhibicję substratową w fizjologicznym zakresie stężeń. Prawdopodobnie KIGlk1 jest swego rodzaju sensorem metabolicznym, którego aktywność jest regulowana, by zapobiegać zbyt szybkiej produkcji energii. Regulację aktywności powiązano z dimeryzacją białka. Moim zdaniem nie można tego jednoznacznie potwierdzić na podstawie zaprezentowanych wyników, ponieważ analizy RALS/LALS przeprowadzono wyłącznie bez obecności ATP. Analiza struktury KIGlk1 pokazała podobieństwa i różnice z heksokinazą z tego samego organizmu (Klhk1), której struktura była znana. Ten wydany w *International Journal of Molecular Sciences* (MDPI)

artykuł był cytowany tylko jeden raz (WoS).

Enzymem badanym w artykule #4 jest kinaza glicerolowa z termofilnego grzyba *Chaetomium thermophilum* (CtGK). CtGK jest elementem szlaku metabolicznego, który pozwala niektórym organizmom wykorzystywać glicerol jako alternatywne źródło węgla. Struktury CtGK rozwiązane w formie apo oraz związanej z glicerolem pozwoliły na charakterystykę dynamiki białka, szczególnie w kontekście zmian konformacyjnych towarzyszących wiązaniu substratu. Na podstawie badania stabilności termicznej pokazano, że wiązanie obu substratów (ATP i glicerolu) stabilizuje białko, czego można się było spodziewać. Ciekawe jest natomiast, że wiązanie tylko jednego z substratów, pod nieobecność drugiego ma wpływ destabilizujący na CtGK. W pracy zaprezentowano także nowy test wykorzystujący układ sprzężony z ADPGK do pomiaru aktywności CtGK. Metoda ta może znaleźć zastosowanie w pomiarach aktywności innych enzymów zależnych od ATP. Niedosyt powoduje fakt, że artykuł został wydany w *International Journal of Molecular Sciences* (MDPI) i zebrał jedynie trzy cytowania.

Przedstawione publikacje bardzo dobrze spełniają założenia dla cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Tytuł osiągnięcia jest bardzo ścisły, a artykuły 1-4 wpisują się w niego bardzo dobrze. Liczba artykułów, ich poziom naukowy, liczba cytowań, a także renoma czasopism, w których zostały wydane, są satysfakcjonujące. Wkłady autorów są wyszczególnione w treści publikacji (1-4). Potwierdzają one wiodący udział dra Grudnika w powstaniu tych prac, co jest jednocześnie zgodne z załączonymi oświadczeniami współautorów. Ostatecznym dowodem wiodącej roli habilitanta jest fakt, iż we wszystkich ww. publikacjach jest on autorem korespondencyjnym. Podsumowując, osiągnięcie naukowe dra Grudnika oceniam jako dobre i spełniające wymogi do nadania stopnia doktora habilitowanego.

III. Inne osiągnięcia naukowe

Oprócz omówionych powyżej artykułów wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, po uzyskaniu stopnia doktora, Przemysław Grudnik przyczynił się do powstania aż 24 publikacji. Wśród nich znajdują się prace opublikowane w bardzo prestiżowych czasopismach, takich jak: *EMBO Journal*, *Angewandte*, *Nanoscale*, czy *Journal of Medicinal Chemistry*. Wśród tych (24) publikacji, dr Grudnik jest wymieniony zazwyczaj w środku listy autorów, raz jest pierwszym autorem, a raz ostatnim. Większość z prac dotyczy biologii strukturalnej, potwierdzając tym samym naukową dojrzałość habilitanta w obranym dla siebie obszarze badawczym. Kolejnym na to dowodem jest szeroka sieć międzynarodowych współpracowników. Na szczególną uwagę zwraca jednak imponująca liczba cytowań opublikowanych prac (poza tymi wchodzącymi w skład osiągnięcia habilitacyjnego) wynosząca około 1000. Habilitant pełnił także rolę recenzenta w ośmiu czasopismach, lecz liczba zrecenzowanych artykułów nie została podana.

Dr Grudnik przedstawiał swoje wyniki na wielu konferencjach naukowych, raz na zaproszenie komitetu organizacyjnego. Oprócz tego, po uzyskaniu stopnia doktora habilitant wygłosił dwa wykłady, a sześć razy prezentował postery. Również przed uzyskaniem stopnia doktora habilitant aktywnie uczestniczył w konferencjach naukowych, zarówno jako prezynter posterów jak i wykładów ustnych. Habilitant jest laureatem czterech nagród. Podsumowując, wysoko oceniam inne osiągnięcia naukowe habilitanta, które z nawiązką spełniają wymogi do nadania stopnia doktora habilitowanego.

IV. Aktywność organizacyjna

Dr Przemysław Grudnik może poszczycić się imponującym dorobkiem organizacyjnym. Był lub jest kierownikiem aż siedmiu projektów naukowych. Na uwagę zasługują tutaj przede wszystkim projekty

finansowane z Narodowego Centrum Nauki przyznane w ramach konkursów Sonata oraz Opus. Pierwszy z nich, realizowany w latach 2016-2020 bezpośrednio pozwolił na uzyskanie wyników będących podstawą publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego. Projekt Opus, w którym dr Grudnik bada molekularne podstawy procesu hypuzynacji, jest niezwykle interesujący. Jestem przekonany, że finansowanie pozyskane przez habilitanta pozwoli na wspaniałe odkrycia.

Nie sposób pominąć wpływu dra Grudnika na rozwój dostępności biologii strukturalnej o wyjątku ogólnopolskim a nawet międzynarodowym. Habilitant współtworzy „Structural Biology Core Facility” w Małopolskim Centrum Biotechnologii UJ. Dr Grudnik jest odpowiedzialny za część krystalograficzną, nie tylko w zakresie organizacji laboratorium, lecz również aplikowania o czas pomiarowy na europejskich synchrotronach. Co więcej, habilitant pełni funkcję zastępcy kierownika projektu Team Tech Core Facility finansowanego ze środków Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, którego był współautorem. Dodatkowo, dr Grudnik był członkiem trzech komitetów organizacyjnych jako główny organizator lub współorganizator.

Podsumowując, dzięki imponującym dokonaniom w zakresie organizacji nauki, habilitant umożliwia odkrycia wykorzystujące trudne i drogie metody biokrytalografii zarówno sobie i bezpośrednim współpracownikom (pozyskane finansowanie), ale także innym naukowcom w Polsce i Europie (organizacja „Core Facility”). W tym aspekcie działalność dra Grudnika przekracza wymagania, jakich oczekuje się od habilitantów.

V. Działalność dydaktyczna i popularyzatorska

Habilitant przez całą swoją karierę był zatrudniony na etatach naukowych a nie dydaktycznych. Mimo to prowadził zajęcia dydaktyczne dla studentów i doktorantów. Większość swojej aktywności dydaktycznej związał jednak z indywidualnym kształceniem, będąc m.in. promotorem trzech prac magisterskich. Poza tym, dr Grudnik pełnił rolę opiekuna naukowego dla kolejnej trójki młodych naukowców, prowadzących badania w kierowanych przez habilitanta projektach. Fakt, że wielu spośród kształconych przez habilitanta młodych ludzi z powodzeniem kontynuuje karierę naukową, zarówno w polskich jak i zagranicznych ośrodkach, jest najlepszym dowodem na skuteczność działalności dydaktycznej. Habilitant rozumie również potrzebę popularyzacji nauki, co udowadnia, biorąc udział w Nocny Naukowców, czy też wygłaszając popularnonaukowe wykłady. Działalność dydaktyczna i popularyzatorska dra Grudnika jest więc na poziomie, jakiego oczekuje się od habilitantów niezatrudnionych na etacie dydaktycznym.

VI. Wniosek końcowy

Osiągnięcia dra Przemysława Grudnika, przedstawione w ocenianych dokumentach, spełniają wymagania ustawowe stawiane w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego. Dlatego też wnioskuję o nadanie habilitantowi stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

dr hab. Miłosz Ruszkowski