

## OCENA

Rozprawy habilitacyjnej pt „**Strukturalne podstawy replikacji i naprawy ludzkiego mitochondrialnego DNA**” oraz dorobku naukowego dr Michała Szymańskiego.

### ***Ocena rozprawy habilitacyjnej***

Mutacje mitochondrialnego DNA (mtDNA), które najczęściej powstają jako wynik niekompletnej naprawy tej molekuly, prowadzą do zaburzeń procesów metabolicznych zachodzących w mitochondriach. Aberracje funkcji mitochondriów wiążą się z kolei z powstaniem szerokiej gamy chorób metabolicznych, o złożonej i często nie wyjaśnionej do końca etiologii, takich jak cukrzyca, choroby neurodegeneracyjne i nowotworowe. Zaburzenia funkcji tych organelli mogą być także jedną z przyczyn starzenia się organizmu/komórek. W związku z tym, podobnie jak w przypadku DNA jądrowego integralność mtDNA jest niezbędnym warunkiem prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Wiadomo, że w przypadku jądrowego DNA integralność genomu jest zapewniona przez obecność licznych i wyrafinowanych mechanizmów monitorowania i naprawy różnego rodzaju modyfikacji/uszkodzeń DNA. Swojego rodzaju niespodzianką jest stwierdzony ograniczony zestaw w/w mechanizmów w mitochondrium, co tylko częściowo można tłumaczyć obecnością bardzo wielu kopii DNA w mitochondrium. Badania procesów naprawy jądrowego DNA, którym poświęcono tysiące prac, doprowadziły do szczegółowego poznania tych mechanizmów. Analizy naprawy mtDNA traktowane są trochę po macoszemu, w związku z czym obecnych jest wiele białych plam, które powoli są wypełniane wiarygodnymi danymi.

Poznanie molekularnych zjawisk związanych z naprawą mtDNA ma z całą pewnością olbrzymie znaczenie zarówno w naukach podstawowych jak i praktyce lekarskiej. Dlatego

tematyka rozprawy habilitacyjnej dr Michała Szymańskiego, bezpośrednio związana z opisanymi zagadnieniami, jest niezwykle atrakcyjna, aktualna i w pełni uzasadniona. Wybór tematyki pracy dodatkowo usprawiedliwia stosunkowo niewielką ilość prac poświęconych badaniom mechanizmów naprawy DNA mitochondrialnego.

Podstawowe cele pracy Habilitanta związane były z badaniami dotyczącymi funkcjonowania i struktury białek Pol  $\gamma$  i EXOG. Oba w/w białka pełnią podstawową rolę zarówno w replikacji, jak i w naprawie mtDNA. Szczegółowy zestaw zadań, na których koncentrował się Habilitant dotyczył słabo poznanych lub niewyjaśnionych zjawisk związanych z poznaniem molekularnych mechanizmów reperacji i replikacji mtDNA, co wiąże się bezpośrednio z występowaniem mutacji tej molekuly, które z kolei leżą u podstaw omawianych powyżej mitochondrialnych chorób metabolicznych.

Wirus HIV jest bez wątpienia jednym z najbardziej istotnych i niebezpiecznych patogenów z jakim zetknęła się ludzkość w minionym stuleciu. Jeszcze kilka lat temu zakażenie HIV oznaczało prawdziwy koszmar, znaczyło bowiem w przeważających przypadkach postępującą śmiertelną chorobę. Od końca 90-tych lat postęp w badaniach zmienił w znacznym stopniu perspektywy chorych. Dzięki postępom w badaniach molekularnych zdobyto wiedzę dotyczącą zachowania wirusa w organizmie, co pozwoliło na wprowadzenie nowych bardzo skutecznych leków. Niestety dosyć często zastosowana terapia nie prowadzi do obniżenia poziomu HIV, a często przyczyną tego jest oporność wirusa na podawane leki.

Poznanie molekularnych zjawisk leżących u podstaw opisanych powyżej powikłań towarzyszących zakażeniom HIV, czy też rozwoju lekooporności, ma z całą pewnością olbrzymie znaczenie zarówno w naukach podstawowych jak i praktyce lekarskiej.

Warto więc podkreślić, że ważnym celem prac związanych z rozprawą habilitacyjną dr M. Szymańskiego i z jej podstawowymi zamierzeniami była także analiza przyczyn toksyczności podstawowych leków antywirusowych skutecznie hamujących replikację HIV. Podstawowym

składnikiem „koktajlu” HAART, najczęściej stosowanego w terapii, w walce z HIV, są nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NRTI). NIRT hamują jednak nie tylko odwrotną transkryptazę HIV (HIV RT), także jądrowe polimerazy  $\alpha$  i  $\beta$ , ale bardziej wrażliwa jest mitochondrialna polimeraza  $\gamma$ . Konstruując mapy gęstości elektronowej pozwoliło Habilitantowi na budowę modeli przestrzennych regionów Pol  $\gamma$ , które zmieniały strukturę po związaniu Zalcytabiny, leku pierwszej generacji, inhibitora HIV RT (*EMBO J.*) Pozwoliło to na pokazanie, że Pol  $\gamma$  wiąże Zalcytabinę i natywny substrat w niemal identyczny sposób, co oryginalnie tłumaczy mechanizm molekularny inhibicji tej polimerazy przez leki antywirusowe – NRTI.

Jednym z celów pracy Habilitanta opublikowanej w *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* było udowodnienie atrakcyjnej hipotezy badawczej zakładającej, że „identyfikacja różnic strukturalnych pomiędzy zamierzonym celem terapii, czyli HIV-RT, a niepożądanym celem czyli Pol  $\gamma$ , może dostarczyć istotnych informacji przydatnych do projektowania bardziej specyficznych leków o niższej toksyczności”. Używając wyrafinowanych metod strukturalnych, badań kinetycznych i ukierunkowanej mutagenyzy Habilitant (wspólnie z współautorami publikacji) wykazał, że w oddziaływaniu NRTI z Pol  $\gamma$  i HIV RT występuje zasadnicze mechanistyczne zróżnicowanie selektywności. Autorzy postulują, że otrzymane wyniki mogą służyć do opracowania nowych leków z grupy NRTI o wyższej selektywności i obniżonej toksyczności.

Opublikowane wcześniej dane eksperymentalne sugerują, że toksyczność leków z grupy HAART może być związana z polimorfizmem genu kodującego Pol  $\gamma$  (POLG). Aby wyjaśnić to nie do końca zrozumiałe zjawisko Habilitant, i wsp. zainicjowali badania 45 pacjentów zainfekowanych HIV (*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*). Opracowanie modelowe i struktury krystalicznej mutantu Pol  $\gamma$  w kompleksie z DNA/nukleotydami pozwoliło stwierdzić znaczące różnice w powinowactwie między mutantem, a polimerazą „dziką”. Wyniki te pozwoliły na sformułowanie hipotezy, że określone/zdefiniowane mutacje

POLG mają bezpośredni związek z predyspozycją pacjentów do indukowanej HAART toksyczności mitochondrialnej, co z kolei sugeruje możliwość przełożenia tych wyników do spersonalizowanej terapii i zminimalizowania skutków ubocznych działania NRTI.

Główny nurt wszystkich prac wymienionych przez Habilitanta jako „osiągnięcie naukowe”, również tych omawianych w powyższym podrozdziale, jest poświęcony badaniom procesu replikacji i naprawy mtDNA, a dokładniej omawianiu struktury i funkcjonowania białek Pol  $\gamma$  i EXOG.

We wspomnianej już publikacji w *EMBO J* Autor postawił ambitne i oryginalne zadanie złapanie Pol  $\gamma$  „ gorącym uczynku”, w trakcie procesu replikacji mtDNA. Do wykonania zadania niezbędna była krystalizacja kompleksu replikującego. Krystalizacja, szczególnie tak złożonych układów jak kompleks replikacyjny, wymaga olbrzymiej wiedzy, intensywnej pracy i odrobiny szczęścia. Wszystko to zostało spełnione i Habilitant i wsp. po znakowaniu podjednostek białek Pol  $\gamma$  selenometioniną uzyskał mapę gęstości elektronowej pozwalających na budowę modeli przestrzennych najbardziej istotnych regionów Pol  $\gamma$ . To, z kolei, pozwoliło na ilustrację procesu koordynacji funkcji holoenzymu polimerazy, pozwalającą na osiągnięcie wysokiej procesywności i koordynacji pomiędzy domeną polimerazową i egzonukleazową. Był to pierwszy tego typu eksperyment na świecie.

Wszystkie przedstawione powyżej wyniki badań Habilitanta są w pełni oryginalnymi osiągnięciami naukowymi. Sądzę jednak, że na największe wyróżnienie zasługuje część, elegancko zaplanowanych i przeprowadzonych, badań opublikowanych w „topowym” czasopiśmie *Nature Communication*. Badania dotyczyły strukturalnych i biochemicznych właściwości ludzkiej, mitochondrialnej eksonukleazy EXOG. Stosując wyrafinowane techniki takie jak: krystalizacja, klonowanie, spektroskopowy dichroizm kołowy, rozpraszanie promieni rentgenowskich pod małym kontem, izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne, Autor (wraz ze współautorami publikacji) pokazał, że ;

i/ EXOG wycina dinukleotydy z końca 5', a więc w sposób odmienny od typowych egzonukleaz; ii/ dimer EXOG może wiązać dwie cząsteczki DNA z różnym powinowactwem. Do potwierdzenia tego zjawiska Habilitant użył mutanta z nieaktywną nukleazą; iii/ po związaniu z DNA dwa aktywne miejsca EXOG różnią się konformacyjnie, co może mieć podstawowe znaczenie dla oddziaływania białka enzymatycznego z innymi białkami kompleksu biorącego udział w ścieżce naprawy typu Base Excision Repair (BER) w mitochondrium. Powyższe wyniki pozwoliły na zaproponowanie nowego modelu funkcjonowania ścieżki naprawy typu BER w mitochondrium. Model ten w bardzo elegancki i sugestywny sposób został zaprezentowany na rysunkach w powyżej omawianej publikacji (w *Nature Comm.*).

Podsumowując wyniki badań przedstawionych jako „osiągnięcie naukowe”; są to oryginalne odkrycia naukowe, które wniosły nowe dane do nauki światowej i dzięki opublikowaniu w renomowanych czasopismach międzynarodowych, z wysokim współczynnikiem oddziaływania (IF), weszły do międzynarodowego obiegu informacji naukowej. Z tego względu w pełni pozytywnie i bardzo wysoko oceniam rozprawę habilitacyjną. W moim przekonaniu spełnia ona wymogi stawiane rozprawom habilitacyjnym.

Warto dodać, że Habilitant jest 1-szym autorem w trzech z czterech w/w prac.

Jedna uwaga polemiczna/redakcyjna; Od kilku lat wiadomo, że w mitochondriach zlokalizowana jest także polimeraza  $\beta$ . Interesująca byłaby dyskusja uwzględniająca udział tego białka w naprawie mitochondrialnego DNA w kontekście omawianych w habilitacji właściwości Pol  $\gamma$  i EXOG.

### ***Ocena dorobku naukowego/aktywności naukowej***

Na dorobek naukowy, poza Osiągnięciem dr Michała Szymańskiego, składa się 18 oryginalnych prac doświadczalnych. Prace te opublikowane zostały w znakomitej większości w dobrych i bardzo dobrych czasopismach naukowych o zasięgu światowym. Tak jak zaznaczyłem powyżej, większość prac Habilitanta została opublikowanych w

specjalistycznych czasopismach, recenzowanych najczęściej przez wybitnych specjalistów z danej dziedziny. W ten sposób dorobek naukowy Habilitanta został więc wstępnie już raz pozytywnie zweryfikowany.

Chciałbym zwrócić szczególną uwagę na wyróżniającą się jakość czasopism, w których publikowano wszystkie, bez wyjątku prace dr M. Szymańskiego. Łączny IF prac opublikowanych po doktoracie wynosi 100 pkt. Jest to dorobek niezbyt często spotykany nawet wśród liderów dużych grup badawczych. Warto podkreślić, że w 9 publikacjach (na 18 prace doświadczalnych opublikowanych, poza Osiągnięciem, w czasopismach z listy filadelfijskiej) Habilitant jest pierwszym autorem, co jednoznacznie uwypukla Jego dominujący wkład w pracę.

Przebieg aktywności dydaktycznej Habilitanta odbiega od zwyczajowo przyjętej na uczelniach krajowych. Doświadczenie dydaktyczne dr M. Szymański zdobywał na uczelniach amerykańskich, jako wykładowca kursu Biochemii na University of Houston, College of Natural Sciences and Mathematics, oraz University of Texas Medical Branch at Galveston, Graduate School of Biomedical Sciences. Habilitant uczestniczy/uczestniczył także w opiece naukowej nad dwoma doktorantami Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, jako promotor pomocniczy. Wszystko to upoważnia do stwierdzenia, że kwalifikacje dydaktyczne spełniają wymogi stawiane przed osobą ubiegającą się o stopień doktora habilitowanego.

Aktywność naukowa to nie tylko publikacje, ale umiejętność pozyskiwania środków na uprawianie nauki. Bez cienia przesady działalność Habilitanta jest tutaj wyjątkowa. Dr Szymański jest kierownikiem trzech projektów finansowanych przez: i/Europejską Organizację Biologii Molekularnej (EMBO); ii/ Fundację na rzecz Nauki Polskiej (FNP); iii/ Narodowe Centrum Nauki (NCN). Do tego trzeba dodać 8 projektów finansowanych przez znamienite instytucje amerykańskie, w których Habilitant był wykonawcą.

Omawiana aktywność była dostrzeżona i wielokrotnie nagradzana przez takie gremia jak; Jeane B. Kempner Postdoctoral Fellowship; The Biophysical Society Education Travel Award; Marianne Blum, Ph.D. Endowed Scholarship; Irma Mendoza Scholarship; Biological Chemistry Student Organization (BCSO) Award; Robert A. Welch Award for Excellence in Graduate Research in Chemistry; Barbara Bowman Memorial Award for Research Excellence.

To nie koniec wydarzeń, które podkreślają wyjątkową aktywność naukową ponieważ Habilitant brał aktywny udział w kilkudziesięciu(!) konferencjach międzynarodowych i krajowych najczęściej prezentując plakaty, ale również jako wykładowca. Jest także członkiem kilku międzynarodowych organizacjach naukowych, oraz jest zaangażowany w wiele projektów realizowanych we współpracy z naukowcami polskimi i zagranicznymi.

Podsumowując rozdział pt. „aktywność naukowa.”, nie mam najmniejszej wątpliwości, że na tym etapie rozwoju naukowego jest to działalność wyróżniająca.

Jestem przekonany, że rozprawa habilitacyjna dr M. Szymańskiego spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom habilitacyjnym. Wniosła ona do nauki światowej nowe stwierdzenia dotyczące molekularnych mechanizmów replikacji i naprawy mtDNA. Dorobek naukowy w pełni uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk biologicznych, w zakresie biochemia.

W oparciu o pozytywną ocenę rozprawy habilitacyjnej i dorobku naukowego wnoszę do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie dr Michała Szymańskiego do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

*Bydgoszcz 11 czerwiec 2019*

