

Autoreferat

I. Imię i nazwisko: Karolina Anna Mikulska-Rumińska

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne:

2014 **Stopień doktora nauk fizycznych w zakresie biofizyki** (*top 5%, ranking uczelni*)
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska (UMK)

Rozprawa doktorska: *Badanie nanomechaniki adhezyjnych białek neuronalnych metodami sterowanej dynamiki molekularnej i spektroskopii sił pojedynczych cząsteczek* (**praca wyróżniona**)

Promotor: prof. dr hab. Wiesław Nowak

2009 **Tytuł magistra fizyki, spec. Fizyka Medyczna**

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki UMK

Praca magisterska: *Badanie własności mechanicznych białka adhezyjnego kontaktyny metodami AFM i SMD*

Promotor: prof. dr hab. Wiesław Nowak

2007 **Tytuł licencjata fizyki, spec. Fizyka Medyczna i zastosowanie komputerów**

III. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych:

XI 2019 - teraz Instytut Fizyki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (*adiunkt*)

I 2016 - VI 2018 School of Medicine, University of Pittsburgh, USA
(*postdoctoral associate* w grupie prof. Ivet Bahar)

X 2013 -X 2019 Instytut Fizyki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
(*asystent naukowo-dydaktyczny*)

IX 2013 - III 2014 Laboratory of Physics of Living Matter, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Szwajcaria
(*staż doktorski* w grupie prof. Giovanniego Dietlera)

IV. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

IV.1. Tytuł osiągnięcia:

Rozszyfrowanie maszynerii molekularnej, oddziaływań fizycznych, transdukcji sygnału oraz inhibicji procesu ferroptozy

Habilitantka, dr Karolina Mikulska-Rumińska (określana dalej jako "ja"), wskazuje jako osiągnięcie naukowe cykl publikacji, zgodnych z ustawą o stopniach i tytułach naukowych, dotyczących badań nad procesem regulowanej śmierci komórki zwanym ferroptozą.

IV. 2. Cele badawcze, motywacja, opis wyników i możliwe zastosowania badań

Moje osiągnięcie habilitacyjne obejmuje teoretyczne badania nowo odkrytej formy programowanej/regulowanej śmierci komórki zwanej ferroptozą. Ferroptoza charakteryzuje się akumulacją nadtlenu lipidów w obecności żelaza, prowadząc do ich zawyżonego poziomu w błonie lipidowej, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki [1]. Mimo iż najnowsze badania pokazały istotność ferroptozy dla zdrowia człowieka oraz jej korelację z różnymi typami chorób, wiele mechanizmów związanych z tym procesem jest nadal słabo poznanych. W szczególności, aktywacja lub inhibicja procesu ferroptozy powoduje osłabienie progresji skorelowanych z nią chorób, co stanowi obiecującą strategię terapeutyczną [2].

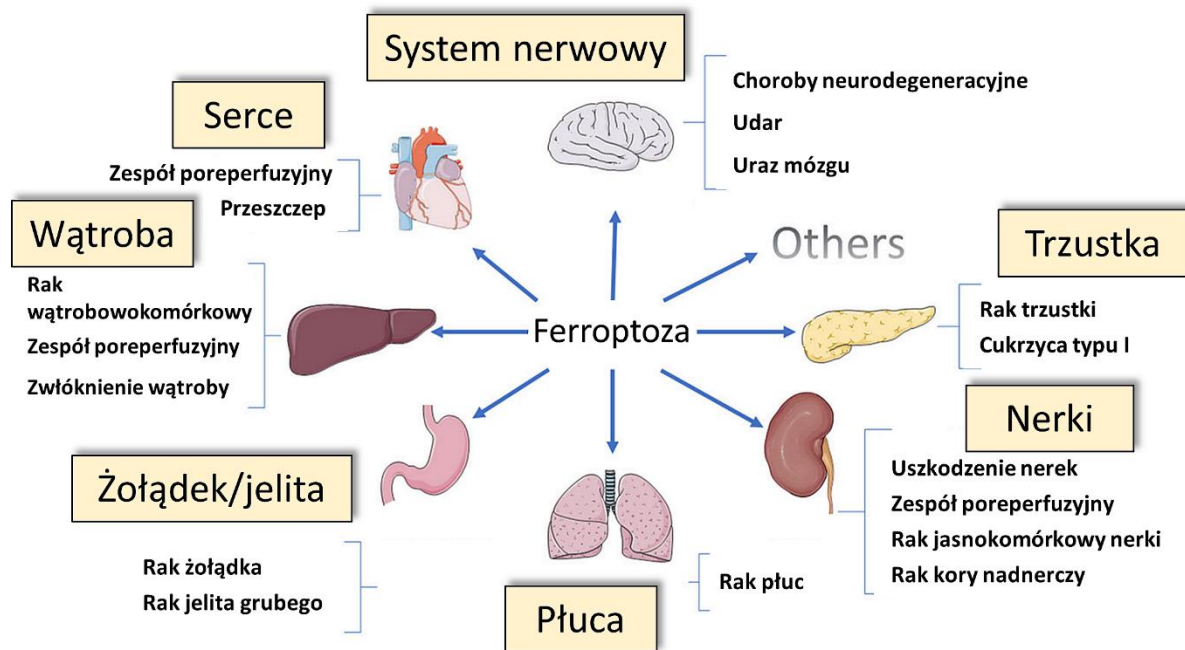
Badania przedstawione jako niniejsze osiągnięcie zostały zainicjowane podczas mojego stażu podoktorskiego w grupie prof. Ivet Bahar w *School of Medicine* na Uniwersytecie w Pittsburghu (Pittsburgh, USA) we współpracy z grupami doświadczalnymi, głównie grupą prof. Valeriana Kagana z *Graduate School of Public Health* na Uniwersytecie w Pittsburghu oraz grupą prof. Hülya Bayır ze Szpitala Dziecięcego w Pittsburghu. Grupa badawcza prof. I. Bahar stosuje i rozwija zagadnienia dotyczące modeli sieci elastycznych, przeprowadza badania z zakresu biologii obliczeniowej i systemowej oraz przyczynia się do rozwoju nowych narzędzi bioinformatycznych. Z kolei współpracownicy z grup eksperymentalnych wykonują doświadczenia z zakresu lipidomiki, pomiary metodami spektroskopii masowej, obrazowanie, eksperymenty na komórkach, zwierzętach i próbkach od pacjentów.

Do grupy prof. Ivet Bahar dołączyłam jako fizyk z doświadczeniem w biofizyce eksperymentalnej i obliczeniowej oraz bioinformatyce. Ścisła współpraca między wyżej wspomnianymi grupami doprowadziła do uzyskania pierwszych przełomowych wyników dotyczących mechanizmów ferroptotycznych opublikowanych w trzech czasopismach o wysokim współczynniku *Impact Factor* [H1-H3], m.in. w *Cell*. Po powrocie ze stażu do Instytutu Fizyki Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu kontynuowałam moją współpracę nad zagadnieniami ferroptozy, co zaowocowało kolejnymi ważnymi odkryciami [H4-H8]. Dalsze badania były prowadzone częściowo we współpracy z jeszcze innymi grupami naukowymi, które doświadczalnie walidowały uzyskane wyniki teoretyczne dot. mechanizmów ferroptozy.

IV. 2.1. Wstęp i motywacja badań

Ciało człowieka składa się z około 10^{12} - 10^{16} komórek [3]. Wszystkie zdrowe komórki są zdolne do dzielenia się i umierania, a czas ich życia jest precyzyjnie regulowany przez organizm. Bywa jednak, że zaczynają się one dzielić w sposób niekontrolowany, łamiąc limit Hayflicka [4], co może prowadzić do powstania nowotworów [5]. Istnieją dwa główne wzorce śmierci komórkowej: przypadkowa (ACD), kiedy komórki narażone są na ekstremalne bodźce fizykochemiczne lub mechaniczne i umierają w sposób niekontrolowany, oraz regulowana (RCD), będąca częścią fizjologicznych programów chroniących organizm przed niekontrolowanym podziałem lub uruchamiana na skutek niewydolności odpowiedzi adaptacyjnych [6]. RCD, niezbędna dla prawidłowego rozwoju [7] lub homeostazy [8, 9], jest naturalnym i wysoce zorganizowanym procesem zachodzącym wewnątrz komórek. Tradycyjnie śmierć komórki była podzielona tylko na dwa rodzaje: apoptozę i nekrozę. Jednak ostatnie badania wykazały, że istnieje więcej trybów RCD takich jak pyroptoza (2001), nekroptoza (2005) lub ferroptoza (2012), które mają odmienne cechy morfologiczne i biochemiczne [2, 10].

W 2012 roku środowisko naukowe zostało poruszone przez zaproponowaną koncepcję nowej, zależnej od żelaza i nieapoptotycznej formy RCD, która charakteryzuje się powstawaniem i gromadzeniem nadtlenków lipidów, powodujących rozległe uszkodzenia błon w wyniku peroksydacji lipidów. Proces ten nazwano ferroptozą [11, 12]. Ustalono, że ferroptoza różni się od innych programów RCD i nie ma morfologicznych cech typowej nekrozy czy apoptozy [10, 11]. W rzeczywistości ferroptoza powoduje w komórkach zmniejszenie objętości mitochondriów, redukcję lub zanik grzebieni mitochondrialnych oraz uszkodzenie zewnętrznej błony mitochondrialnej [10, 11]. Mitochondria są dla organizmu „fabrykami” energii i odpowiadają za oddychanie komórkowe, które jest jednym z najważniejszych procesów zachodzących w organizmach. Dlatego też ferroptoza ma istotny wpływ na choroby układu nerwowego, serca, płuc, wątroby czy nerek (**Rys. 1**). Co więcej wykazano, że ferroptoza jest skorelowana z chorobami neurodegeneracyjnymi, np. w chorobie Alzheimera [13, 14], Parkinsona [15, 16], czy Huntingtona [17], gdzie obserwuje się podwyższony poziom nadtlenków lipidów zależnych od żelaza, a także w zaniku mózdkowo-korowym, sepsie, chorobach bakteryjnych i wirusowych [18]. Kontrolowana indukcja ferroptozy ma potencjał w terapii nowotworowej i ochronie immunologicznej [19-22]. Ponadto, ferroptoza może być istotną przyczyną zapalenia wielonarządowego w chorobie COVID-19 [23-26] i może przyczynić się do degradacji tkanek, jak to ma miejsce w niewydolności nerek, urazach mózgu i astmie [27-29].

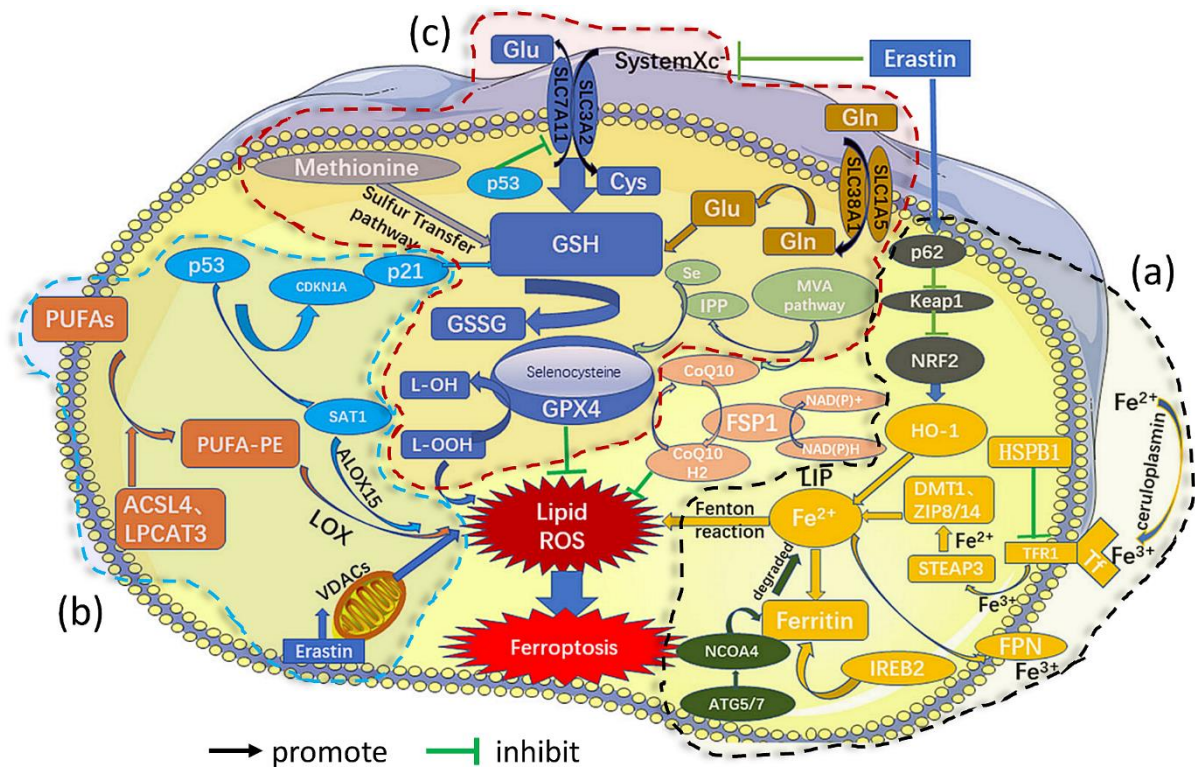


Rysunek 1. Rola ferroptozy w różnych chorobach systemowych. Zmodyfikowany rysunek zaczerpnięty z [2].

Zanim przedstawię w jaki sposób wykorzystałam metody teoretycznej biofizyki molekularnej do badania mechanizmów związanych z procesem ferroptozy muszę wprowadzić szereg pojęć biochemicznych, które pozwolą lepiej zrozumieć badane zagadnienie.

Ferroptoza obejmuje różne szlaki biologiczne. Może zostać zainicjowana na skutek utraty kontroli jednego z trzech głównych procesów: metabolizmu żelaza (**Rys. 2a**, czarna przerywana linia), peroksydacji lipidów (**Rys. 2b**, niebieska przerywana linia) lub regulacji tioli (**Rys. 2c**, czerwona przerywana linia). Peroksydacja lipidów zależna od żelaza jest głównym czynnikiem

wyzwalającym aktywację ferroptozy [28]. Ponieważ podobny schemat katalityczny napędzany żelazem ma zastosowanie w więcej niż jednym procesie, hipotezy dotyczące rodzajów procesów peroksydacji napędzanych żelazem wahają się między ściśle enzymatycznymi a nieenzymatycznymi [30]. Nieenzymatyczny proces utleniania zachodzi na drodze reakcji Fentona (*Szlak Metaboliczny Żelaza*), natomiast kandydatami do enzymatycznego utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) są białka zwane lipooksygenazami (LOXs) [31]. PUFAs są niezbędnymi składnikami błon biologicznych i regulują stan zapalny, odporność, wzrost komórek czy plastyczność synaptyczną [32, 33]. Są one również substratami w procesie ferroptozy ze względu na obecność słabego wiązania C-H na pozycjach bis-allylowych (*wyróżnione na zielono, Rys. 4*) [34]. PUFAs różnią się liczbą wiązań podwójnych, a większa ich liczba zwiększa ich podatność na utlenianie [35]. Dodatkowo, nowo utlenione cząsteczki mogą utleniać kolejne PUFAs [36]. Aby przedstawić moje badania w odpowiedniej perspektywie, w następnym kroku, opiszę wyżej wspomniane trzy główne szlaki metaboliczne schematycznie przedstawione na **Rys. 2**.



Rysunek 2. Zestawienie czynników regulujących ferroptozę uwzględniając udział trzech głównych szlaków metabolicznych. (a) Szlak Metaboliczny Żelaza, (b) Szlak Metaboliczny Utleniania Lipidów oraz (c) Szlak Metaboliczny Glutationu. Rysunek zmodyfikowany z [2].

Szlak Metaboliczny Żelaza. W organizmie człowieka metabolizm żelaza jest ściśle kontrolowany na poziomie komórkowym i ogólnoustrojowym zachowując odpowiednią równowagę między białkami, aby zapewnić precyzyjnie określone ilości żelaza potrzebne do niezbędnych funkcji biologicznych [37, 38]. Żelazo może przyjmować i oddawać elektrony, dlatego też w organizmie może ono występować zarówno w formie Fe^{2+} jak i Fe^{3+} . W mitochondriach zależne od O_2 utlenianie węglowodanów daje początek reaktywnym formom tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), które są ważnymi cząsteczkami sygnalizacyjnymi. Jednak ROS stają się toksyczne przy wyższych stężeniach [39]. Żelazo może bezpośrednio generować nadmiarowe ROS poprzez

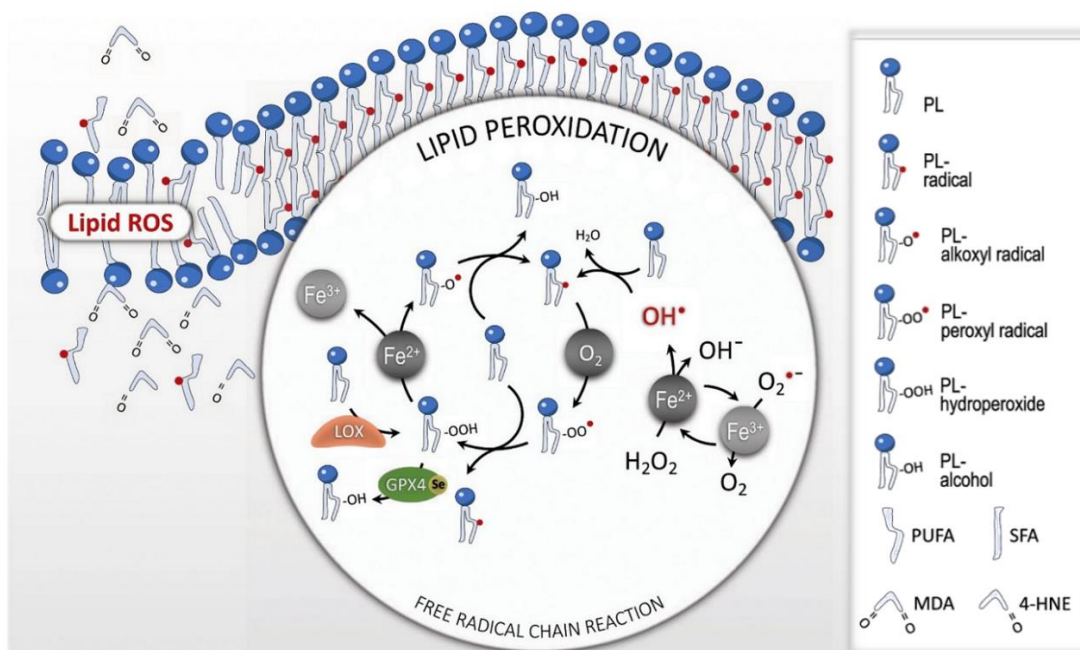
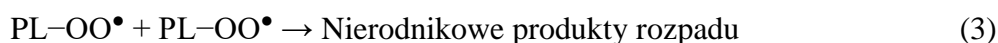
reakcję Fentona [40], zwiększając w ten sposób uszkodzenia oksydacyjne i prowadząc do peroksydacji lipidów, uszkodzenia błon i śmierci komórek [11]. W nieenzymatycznej peroksydacji lipidów, która odnosi się do reakcji Fentona, Fe^{2+} jest utleniane do Fe^{3+} poprzez reakcję z nadtlenkiem wodoru (H_2O_2), w wyniku czego powstają wysoce reaktywne rodniki hydroksylowe (OH^\bullet) (**Rys. 3**). Fe^{3+} jest dalej redukowane z powrotem do Fe^{2+} poprzez reakcję z anionorodnikami ponadtlenkowymi ($O_2^{\bullet-}$), a rodniki hydroksylowe (OH^\bullet) odrywają wodór z PUFA tworząc rodnik fosfolipidowy (PL) o centrum węglowym (PL^\bullet) w następujący sposób:



Dalej rodnik fosfolipidowy PL^\bullet może reagować z tlenem cząsteczkowym (O_2), tworząc fosfolipidowy rodnik peroksydowy ($PL-OO^\bullet$), który następnie odrywa wodór z innego PUFA, tworząc wodoronadtlenek fosfolipidu ($PL-OOH$) i nowy PL^\bullet , który może ponownie reagować z kolejnym O_2 . Ten mechanizm napędza tworzenie kolejnych $PL-OO^\bullet$ i propagację procesu rodnikowego do sąsiednich cząsteczek lipidów.



Ostatnim etapem peroksydacji jest terminacja, podczas której odpowiednio liczne rodniki spontanicznie reagują dając nierodnikowe produkty rozpadu [39]. $PL-OOH$ mogą rozkładać się do 4-hydroksynonenalu (4-HNE) lub dialdehydu malonowego (MDA) (**Rys. 3**), które poprzez tworzenie sieciowych wiązań (ang. *crosslinking*) mogą dezaktywować białka [41]. Proces peroksydacji i generowanie 4-HNE lub MDA prowadzi do niestabilności i podwyższonej przepuszczalności błon, a w końcu do śmierci komórki.



Rysunek 3. Nieenzymatyczny i enzymatyczny proces peroksydacji lipidów. Do nieenzymatycznych procesów peroksydacji lipidów zalicza się reakcję Fentona, gdzie Fe^{2+} jest utleniane do Fe^{3+} poprzez reakcję z H_2O_2 i generuje wysoce reaktywne rodniki OH^\bullet . Enzymatyczna peroksydacja lipidów obejmuje: (i)

lipooksygenazy (LOX), które generują wodoronadtlenki lipidów, oraz (ii) peroksydazę glutationową 4 (GPX4), która redukuje reaktywne wodoronadtlenki lipidów do niereaktywnych alkoholi lipidowych, co przerywa łańcuchową reakcję wolnych rodników i hamuje peroksydację lipidów. Rysunek z [41].

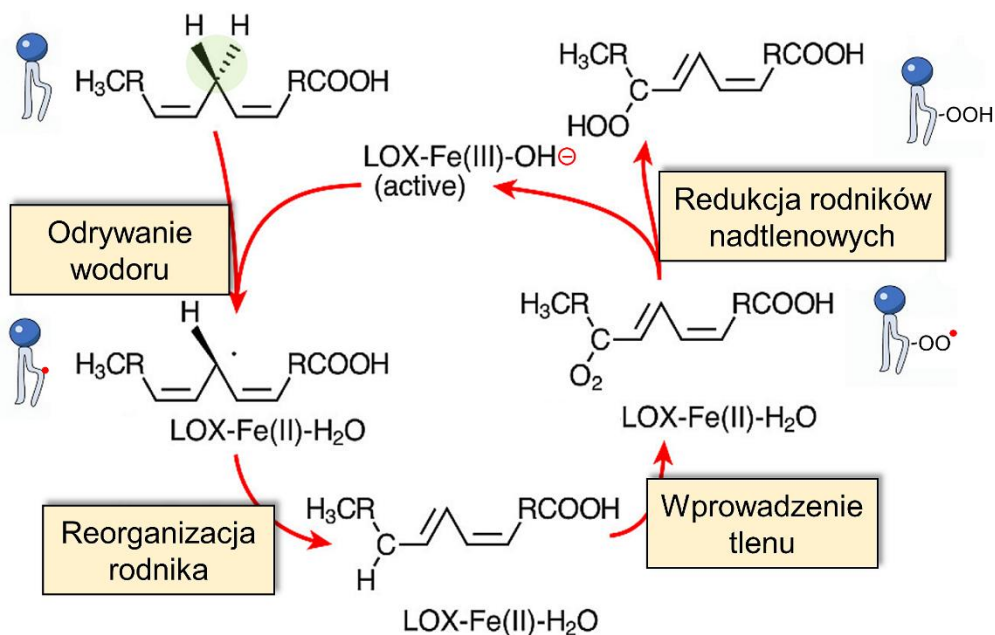
Zanim jednak reakcja Fentona będzie miała miejsce, musi zostać aktywowanych kilka szlaków sygnałowych, które powinny przebiec w określony sposób (**Rys. 2, czarny przerywany kształt**). Szlak metaboliczny żelaza rozpoczyna się gdy Fe^{3+} dostaje się do komórki przez białko błonowe zwane receptorem transferyny 1 (TFR1) i jest przekształcane w Fe^{2+} przez reduktazę żelaza. Niestabilna forma żelaza Fe^{2+} jest następnie uwalniana do labilnej puli żelaza (ang. *labile iron pool, LIP*) w cytoplazmie przez białko transportujące DMT1 (ang. *divalent metal transporter 1*). Tutaj, białko STEAP3 (ang. *six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3 metalloredutase*) redukuje Fe^{3+} umożliwiając DMT1 jego eksport. Nadmiar jonów żelaza może być przechowywany w ferrytynie w postaci Fe^{3+} lub pozostać w formie wolnej, będąc uwalnianym przez białko błonowe ferroportynę (FNP), aby utrzymać labilną pulę żelaza na niskim poziomie i tym samym uniknąć toksyczności dla komórek [38, 42]. HSPB1 działa jako negatywny regulator ferroptozy, zmniejszając wychwyty żelaza i peroksydację lipidów [43]. Kilka innych czynników może dodatkowo wpływać na główny szlak regulacyjny żelaza, m.in. NRF2 (ang. *nuclear factor like 2*), który jest modulatorem sygnałów związanych z żelazem [44] czy (NCOA)4 (ang. *nuclear receptor co-activator*), który pośredniczy w degradacji ferrytyny [45].

Szlak Metaboliczny Utleniania Lipidów. Żelazo jest wykorzystywane do syntezy metaloprotein takich jak hemoglobina (transport tlenu) czy cytochromy (nośniki elektronów), do tworzenia organicznych (np. grupa hemowa) lub nieorganicznych kofaktorów (np. klastry Fe/S) [10]. Ponieważ żelazo Fe^{3+} jest słabo rozpuszczalne w neutralnym pH [46] organizmy żywe wykształciły umiejętność umożliwiającą związanie żelaza z białkami. Takie białka określa się mianem białek niehemowych [47]. Są to np. transferyny, które służą do transportu żelaza niehemowego [48] lub lipooksygenazy [49], które katalizują utlenienie PUFA do PL-OOH będących ferroptotyczny sygnałem śmierci komórki. Lipooksygenazy są głównym obiektem niniejszych badań, a ich mechanizmy zaliczane są do enzymatycznego aspektu ferroptozy.

Lipooksygenazy (LOXs) są niehemowymi enzymami zawierającymi żelazo, które mogą katalizować utlenianie wolnych (np. kwas arachidonowy, AA) [50] lub zestryfikowanych PUFA [H1] [PUFA-PLs; np. fosfatydyloetanolamina (SA-PE) lub kardiolipina (CL)] [10] do ich odpowiedników wodoronadtlenkowych, tzn. PUFA do których przyłączony został O_2 w łańcuchu fosfolipidowy w miejscu C-H otoczonym wiązaniami podwójnymi w formie *cis* (wyróżnione na zielono, **Rys. 4**).

Reakcja katalityczna LOXs obejmuje cztery etapy (**Rys. 4**):

- (i) odrywanie wodoru z bisalilowego węgla metylenowego PUFA przez kofaktor $Fe(III)-OH$, co daje $Fe(II)-OH_2$ tworząc przy tym rodnik kwasu tłuszczowego (PL^\bullet),
- (ii) reorganizację rodnika względem innego centrum węglowego,
- (iii) przyłączenie tlenu cząsteczkowego (O_2) do przegrupowanego rodnika węglowego i utworzenie przez to peroksydowego rodnika fosfolipidowego ($PL-OO^\bullet$) związanego z przegrupowanym węglem,
- (iv) redukcje rodnika nadtlennego do odpowiadającego mu anionu ($PL-OOH$) [51-53]. Produkty takie mogą powodować uszkodzenia warstwy lipidowej błony [49].



Rysunek 4. Schematyczny diagram reakcji katalizacyjnej LOX. LOX katalizuje wprowadzenie tlenu cząsteczkowego do PUFA. Prowadzi to do powstania odpowiednich wodoronadtlenków lipidów w czterech etapach: (1) odrywanie wodoru, (2) reorganizacja rodnika na inne centrum węglowe, (3) wstawienie tlenu do zmienionego centrum rodnika węglowego oraz (4) redukcja rodnika ponadtlenkowego. Zmodyfikowany rysunek z [51].

Należy zauważyć, że w skład lipidów komórkowych wchodzi tysiące różnych typów lipidów, które różnią się pod względem ilości, lokalizacji i funkcji. W rzeczywistości, im wyższe stężenie PUFAs w komórce, tym bardziej rozległe uszkodzenia mogą być spowodowane przez proces peroksydacji lipidów, który może być różny w zależności od chorób i typu narządów/tkanek [49]. Wolne PUFAs są substratami w tych reakcjach. Jednak w niektórych przypadkach, takich jak fosfatydyloetanoloamina (PE), najpierw muszą być zestryfikowane z fosfolipidami błonowymi, aby mogły być dalej utlenione w celu przekazania sygnału ferroptotycznego [2]. W proces ten zaangażowane są dwa białka, ACSL4 (ang. *acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) oraz LPCAT3 (ang. *lysophosphatidylcholine acyltransferase 3*), które uczestniczą w biosyntezie i przebudowie PUFAs w reakcjach estryfikacji [49] (**Rys. 2b**, niebieska linia przerywana). Estryfikowane PUFAs-PE mogą być dalej utleniane przez LOXs, które wiążą tlen cząsteczkowy do centrum żelaza i przekształcają PUFAs w aktywną formę w celu indukowania ferroptozy w komórkach [54]. Peroksydacja PUFAs generuje różne produkty utleniania, a niektóre z nich są wysoce cytotoksyczne i patogenne [10].

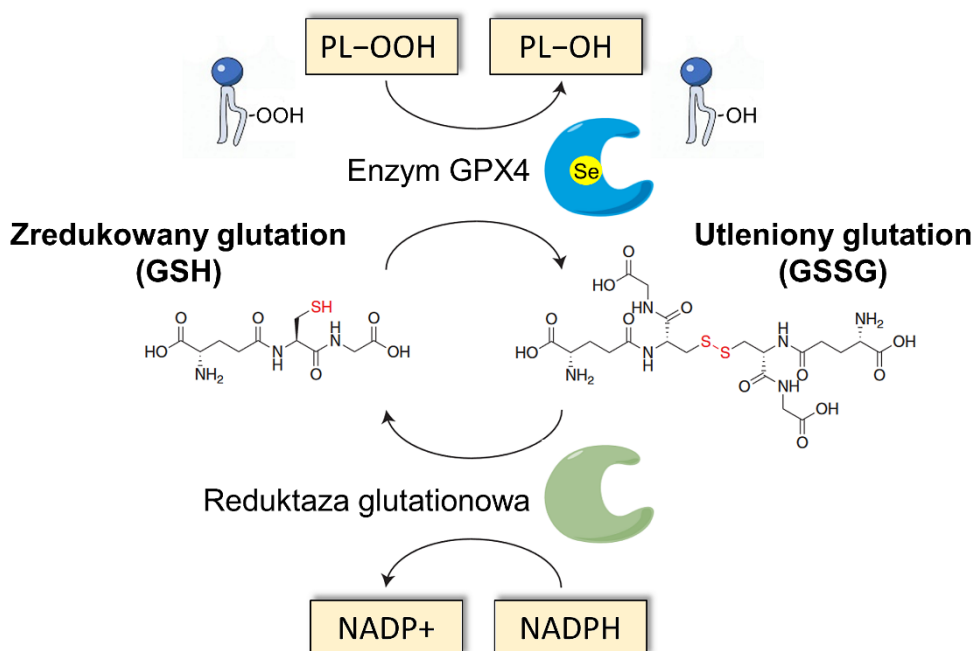
Rodzina LOX u ssaków jest kodowana przez sześć funkcjonalnych genów [12, 36, 51], które określa się mianem lipooksygenazy kwasu arachidonowego (ang. *arachidonic acid lipooxygenase*, ALOX). Istnieje sześć ludzkich izoform LOX (E3-LOX, 5-LOX, 12-LOX-1, 12-LOX-2, 15-LOX-1, 15-LOX-2), które są skategoryzowane pod względem ich specyficzności utleniania PUFAs [55]. Liczba przy nazwie białka wskazuje bowiem numer atomu węgla w łańcuchu sn-2 PUFA, przy którym najczęściej wstawiany jest tlen.

Warto wspomnieć, że w regulację ferroptozy zaangażowany jest również szlak P53-SAT1-ALOX15 [56]. SAT1 (ang. *spermidine/spermine N1-acetyl transferase 1*) jest enzymem i celem transkrypcyjnym P53, którego indukcja jest skorelowana z poziomem ekspresji 15LOX, a indukcja ferroptozy przez SAT1 jest znacząco tłumiona w obecności inhibitora 15LOX [2, 56].

Szlak Metaboliczny Glutationu. Komórki wyposażone są w szereg mechanizmów umożliwiających im ucieczkę przed śmiercią [57, 58]. W ferroptozie główny mechanizm tego typu związany jest z białkiem peroksydazą glutationową 4 (GPX4), która odgrywa kluczową rolę w regulacji ferroptozy poprzez redukcję toksycznych wodoronadtlenków lipidów (PL–OOH) do nietoksycznych alkoholi lipidowych (PL–OH). Pozwala to ograniczyć propagację peroksydacji lipidów w obrębie błony (**Rys. 5**) [39, 59, 60]. U ludzi występuje kilka form białka GPX (GPX1–8). Różnią się one pełnionymi funkcjami, lokalizacją w obrębie komórki i specyficnością względem substratów [61, 62]. W porównaniu z innymi enzymami GPX, GPX4 jest wyjątkowy w swojej zdolności do redukcji dużych organicznych nadtlenków, w tym wielonienasyconych lipidów i steroli [39] zapobiegając tym samym akumulacji lipidowych ROS [11, 28]. GPX4 jako kofaktor wykorzystuje glutation (tripeptyd złożony z trzech aminokwasów: kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny), będący najobficiej występującym tiolem w komórkach zwierzęcych [63]. Glutation istnieje w stanie zredukowanym (GSH) i utlenionym (GSSG) i jest katalizowany przez GPX4 w następującej reakcji:



Reakcja ta zachodzi w miejscu aktywnym GPX4 utworzonym przez selenocysteinę, glutaminę i tryptofan (triada katalityczna). Glutation oscyluje między stanem utlenionym i zredukowanym. Cykl katalityczny GPX4 rozpoczyna się, gdy aktywny selenol (Se–H) jest utleniany przez nadtlenki substratów do kwasu selenowego (Se–OH). Następnie pierwsza cząsteczka GSH jest wykorzystywana do redukcji do pośredniego selenodisiarczku (Se–SG), który jest dalej redukowany przez drugą cząsteczkę GSH, uwalniając cząsteczkę GSSG [36, 39] (**Rys. 5**). GSSG może zostać zregenerowany do postaci GSH przez enzym reduktazę glutationową [22, 64], która wykorzystuje NADPH jako źródło elektronów [65].

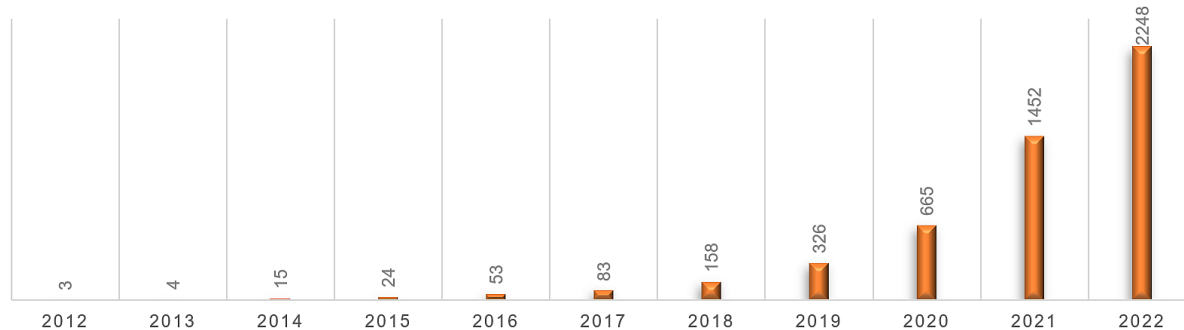


Rysunek 5. Reakcja enzymatyczna GPX4. Zmodyfikowany rysunek zaczerpnięty z [39].

Wpływ na wytwarzanie glutationu ma pozakomórkowa cystyna, która jest wymieniana na wewnątrzkomórkowy glutaminian w stosunku 1:1 przez System Xc⁻ (ang. *plasma membrane cystine/glutamate antiporter*, **Rys. 2**). Następnie jest ona przekształcana w cysteinę, która jest

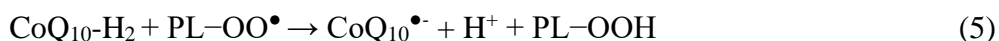
niezbędna do wytwarzania GSH. Zahamowanie wychwytu cysteiny prowadzi do nagromadzenia produktów peroksydacji lipidów [66]. W zdrowych komórkach ponad 90% całkowitej puli glutationu występuje w formie zredukowanej (GSH) [67], a stosunek GSSG do GSH sugeruje poziom komórkowego stresu oksydacyjnego [68]. Ze względu na wiodącą rolę GPX4 w katalizowaniu redukcji nadtlenków lipidów w reakcji zależnej od glutationu, jest on określany mianem kluczowego regulatora ferroptozy.

Dodatkowe szlaki i regulatory ferroptozy. Ostatnie lata przyniosły dynamiczny wzrost zainteresowania procesem ferroptozy [69]. Widać to po liczbie artykułów naukowych, które są publikowane każdego roku (**Rys. 6**). Od odkrycia ferroptozy w 2012 roku przez grupę B. Stockwella do listopada 2022 roku opublikowano łącznie 5031 artykułów, co sprawdziłam wyszukując hasło "ferroptosis" w abstraktach w bazie *Web of Science*. Wysilek naukowców zgłębiających proces ferroptozy daje wgląd na nowe regulatory oraz udział innych, nowych szlaków metabolicznych skorelowanych z tym procesem. Niektóre z nich zostaną opisane w tym paragrafie.



Rysunek 6. Roczna liczba publikacji dotyczących procesu ferroptozy. Wykres wygenerowany na podstawie informacji zawartych w bazie *Web of Science* (z dnia 22 IX 2022 roku).

Ścieżka Metaboliczna CoQ. Poza trzema głównymi ścieżkami metabolicznymi opisanymi powyżej, naukowcy wciąż znajdują nowe zależności pomiędzy ferroptozą, a innymi komponentami systemu komórkowego. Ostatnio stwierdzono, że ferroptoza niezależna od glutationu może być zatrzymana przez niedawno zidentyfikowane białko FSP1 (ang. *ferroptosis suppressor protein 1*) [70, 71]. FSP1 zawiera N-myristoylowaną resztę (modyfikacja lipidowa), która umożliwia przyłączenie do błony plazmatycznej oraz domenę oksydoreduktazy flawoproteinowej (ang. *flavoprotein oxidoreductase domain*) wymaganą do hamowania ferroptozy. FSP1 redukuje koenzym Q₁₀ (CoQ₁₀) do ubichinolu (CoQ₁₀-H₂, **Rys. 2**), który dalej blokuje peroksydację lipidów działając jako pułapka na rodniki peroksyłowe lipidów [1, 70]. CoQ₁₀ jest mobilnym lipofilnym nośnikiem elektronów, który syntetyzuje rozpuszczalne w lipidach antyoksydanty [72]. Jednak sam CoQ₁₀ nie wystarcza do zatrzymania propagacji nadtlenków lipidów, chyba że jest utrzymywany w stanie zredukowanym jako CoQ₁₀-H₂, a wtedy można go wykorzystać w następujący sposób [73]:



Produkt tej reakcji, rodnik ubisemichinonu-10, Q₁₀[•], może dalej wpłynąć na kolejny rodnik w następujący sposób:





FSP1 może bezpośrednio redukować utleniony CoQ₁₀ do stanu zredukowanego, wykorzystując NADH jako kofaktor [70]. *Bersuker i współpracownicy* zasugerowali, że mechanizm ochronny FSP1 może być wtórny do mechanizmu wykorzystującego GPX4, a nawet sporadycznie stając się pierwotną formą w pewnych warunkach [1].

Syntaza tlenku azotu. Indukowana syntaza tlenku azotu (iNOS) generuje cząsteczki NO [13], których reaktywność wobec różnych pośrednich form peroksydacji lipidów została odkryta już ponad 30 lat temu [14]. W naszych badaniach wykazaliśmy, że cząsteczki NO hamują peroksydację lipidów generowaną przez kompleks lipooksygenazy z białkiem PEBP1 [H5-H6]. Opis tego odkrycia zostanie przedstawiony w paragrafie **Wyniki**.

Fosfolipaza iPLA₂β. Nasze ostatnie badania wykazały, że fosfolipaza iPLA₂β (ang. *Ca²⁺-independent phospholipase A₂β*) może hydrolizować peroksydowane fosfolipidy, które są generowane przez lipooksygenazy. Oznacza to, że iPLA₂β może wyeliminować sygnał śmierci komórki na drodze ferroptozy [H8]. Opis tego odkrycia zostanie przedstawiony w paragrafie **Wyniki**.

IV. 3.2. Metody użyte do uzyskania wyników składających się na osiągnięcie naukowe

W trakcie realizacji niniejszych badań wykorzystano różne metody biofizyki obliczeniowej [74] i narzędzia bioinformatyczne [75] do symulowania fizycznych oddziaływań i dynamiki układów biologicznych zaangażowanych w proces ferroptozy. Wyniki uzyskane metodami obliczeniowymi zostały potwierdzone przez badania eksperymentalne uzyskane przez współpracowników z USA, głównie przez grupy prof. V. Kagana i prof. H. Bayr z Uniwersytetu w Pittsburghu. Tylko najczęściej wykorzystywane metody obliczeniowe, które przysłużyły się do uzyskania wyników składających się na niniejsze osiągnięcie zostały poniżej krótko scharakteryzowane. Opisy technik eksperymentalnych nie zostaną uwzględnione w niniejszym opracowaniu.

Dokowanie molekularne. Dokowanie molekularne (ang. *molecular docking*) [76-79] jest metodą pozwalającą na przewidywanie preferowanej orientacji jednej molekuly (*ligand*: białko lub związek chemiczny) względem drugiej (*receptor*: białko) w oparciu o ugruntowane funkcje oceniające, które wartościują oddziaływania fizyczne w celu przewidywania stabilnego kompleksu [76, 77]. Oba podejścia, tzn. dokowanie białko-białko i dokowanie białko-ligand, zostały zastosowane w niniejszych badaniach do przewidywania struktur kompleksów białkowych takich jak 15LOX-1/PEBP1 i 15LOX-2/PEBP1 [H1], jak również początkowej pozycji substratów (PUFAs i PL-PUFAs) [H2, H6] i inhibitora ferroptozy – ferostatyny-1 [H7]. Modele PEBP1/15LOXs (15LOX-1 i 15LOX-2) z/bez substratów były obszernie zbadane przez nasz zespół, wykorzystując zarówno podejście eksperymentalne, jak i obliczeniowe, co pozwoliło na dokonanie kolejnych przełomowych obserwacji związanych z procesem ferroptozy [H4-H7].

Symulacje dynamiki molekularnej (MD). Pełno-atomowa klasyczna MD jest standardową metodą stosowaną od końca lat 70-tych [80, 81] w biofizyce i biochemii do analizy fizycznych ruchów atomów i zespołów cząsteczek [82, 83]. Metoda ta polega na iteracyjnym numerycznym obliczeniu chwilowych sił obecnych w układzie biomolekularnym,

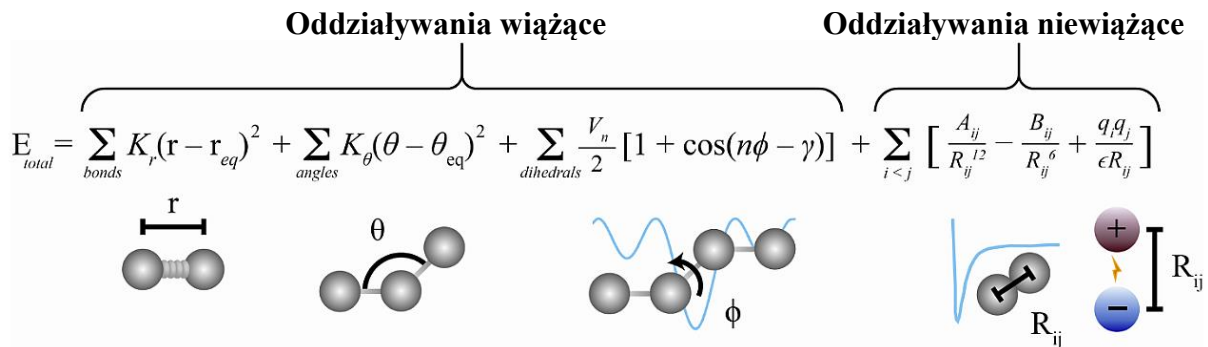
powodujących ruch atomów w odpowiedzi na ich oddziaływania molekularne zgodnie z klasycznymi równaniami ruchu Newtona (wz. 7), które opisują przyspieszenie atomu i o masie m_i wzdłuż współrzędnej r_i w czasie t .

$$\vec{F}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2}, \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (7)$$

Symulacje MD bazują na znajomości energii układu w funkcji współrzędnych atomowych. Wyjściowe współrzędne są uzyskiwane przez techniki eksperymentalne tj. NMR, krystalografia czy cryo-EM. Liczne współrzędne struktur białkowych są zdeponowane i ogólnodostępne w bazie *Protein Data Bank* (PDB) [84] i mogą być pobrane jako tzw. pliki PDB. Ogólne podejście polega na wyznaczeniu sił działających na każdy atom, które są związane z gradientem potencjału V względem pozycji atomów r (wz. 8) i mogą być wykorzystane do obliczenia ewolucji układu w funkcji czasu.

$$\vec{F}_i = -\vec{\nabla}_{r_i} V(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N) \quad (8)$$

Funkcje energii zawierają wiele sparametryzowanych elementów sprecyzowanych w ciągu ostatnich 50 lat na podstawie badań eksperymentalnych i/lub kwantowo-mechanicznych. Ciągłe udoskonalenia doprowadziły w końcowym efekcie do powstania zbioru funkcji i związanych z nimi parametrów stosowanych do większych struktur biologicznych. Określa się je mianem pola siłowego. CHARMM, GROMACS, OPLS, AMBER to nazwy tylko kilku z nich. Pomimo różnic, wszystkie pola siłowe składają się z wyrażeń określających oddziaływania wiążące i niewiążące (**Rys. 7**) między atomami. Oddziaływania wiążące dotyczą wiązań i różnego rodzaju kątów w strukturze białka, natomiast oddziaływania niewiążące określają oddziaływania długozasięgowe, tj. oddziaływania elektrostatyczne i van der Waalsa.



Rysunek 7. Klasyczne pole siłowe stosowane w symulacjach MD. Zmodyfikowany rysunek z [85].

W celu uzyskania ewolucji w czasie położenia r i prędkości v dla każdego atomu w symulowanym układzie stosuje się metody numeryczne. Najczęściej stosowany jest algorytm Verleta [86], który spełnia wszystkie wymagania stawiane schematowi numerycznemu rozwiązywania równań ruchu – jest wydajny numerycznie, stabilny i dokładny.

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\Delta t^2 \quad (9)$$

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{1}{2}\Delta t[\vec{a}(t) + \vec{a}(t + \Delta t)] \quad (10)$$

$$\vec{a}(t) = -\frac{1}{m} \nabla V(\vec{r}(t)) \quad (11)$$

\vec{r} - położenie atomu, t - czas, Δt - krok czasowy, \vec{v} - prędkość, \vec{a} - przyspieszenie

Prędkości początkowe są zwykle przypisywane losowo na podstawie rozkładu Maxwella-Boltzmanna dla danej temperatury. Zależność pomiędzy temperaturą a prędkościami atomów w układzie opisana jest poprzez równanie (12) dla energii kinetycznej oraz zasady ekwipartycji energii (kinetycznej):

$$\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 = \frac{3}{2} N k_B T \quad (12)$$

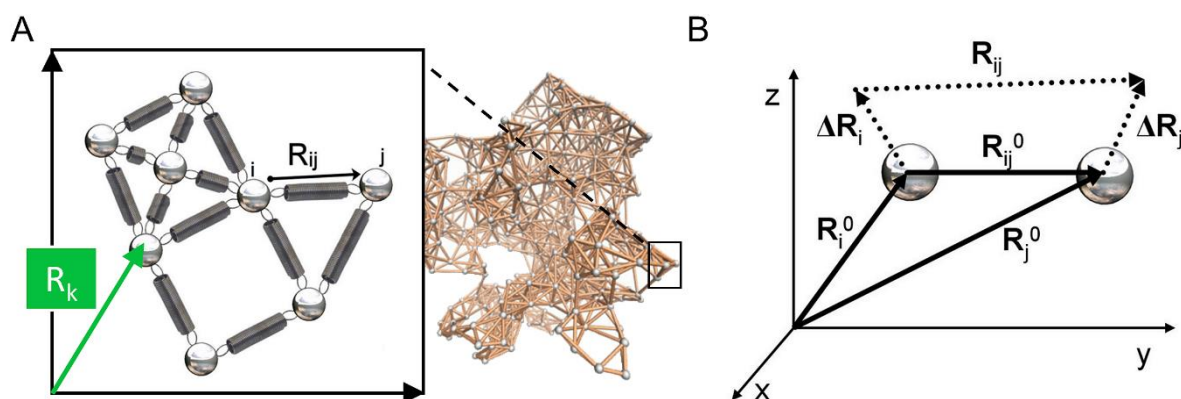
k_B - stała Boltzmanna, N - liczba atomów, T - temperatura,
 m_i - masa i -tego atomu, v_i - prędkość i -tego atomu.

Po wyznaczeniu struktur i scharakteryzowaniu układu fizycznego pod względem parametrów modelu, symulacje MD są z powodzeniem wykorzystywane jako źródło odpowiedzi do dalszych badań dla eksperymentatorów, dostarczając możliwych wyjaśnień dotyczących zjawisk zachodzących na poziomie molekularnym.

Symulacje MD są skutecznie wykorzystywane przez środowisko naukowe w przypadku, gdy układy biologiczne zawierają elementy standardowe. Trudność pojawia się w przypadku elementów niestandardowych, zwłaszcza gdy stanowią one integralną część układu biologicznego, np. jon metalu w miejscu katalitycznym jak u lipooksygenaz. W takich przypadkach wymagana jest zaawansowana wiedza nt. parametryzacji niestandardowych obiektów oraz obliczeń kwantowo-chemicznych (np. przy użyciu programu Gaussian i metody DFT B3LYP/6-31(d,p)), które dostarczają informacji o geometrii i ładunkach cząstkowych układu. W moich badaniach z powodzeniem zastosowałam symulacje MD do wyjaśnienia dynamiki i fizycznych oddziaływań różnych komponentów układów biologicznych zaangażowanych w proces ferroptozy [H4-H8]. Niektóre z nich wymagały parametryzacji miejsca katalitycznego z jonem metalu (np. 15LOX-1 [H4], 15LOX-2 [H5-H7]) czy niestandardowych molekuł, np. ferrostatyny-1 [H7], nadtlenuków lipidów [H8]. Bardziej szczegółowe informacje na temat klasycznej MD można znaleźć w następujących artykułach [83, 87, 88].

Modele Sieci Elastycznych (ENMs). ENMs (ang. *Elastic Network Models*) zaliczane są do modeli entropowych, które w ostatnich latach ujawniły niejednokrotnie swoje zdolności do skutecznego uchwycenia długofalowej dynamiki układów biologicznych, dostarczając przy tym wyjaśnienia poczynionych obserwacji eksperymentalnych [89-91]. ENMs wykorzystują uproszczone jednolite potencjały harmoniczne dla oddziałujących elementów strukturalnych białka reprezentowanych przez atomy C α aminokwasów. W ENMs możemy wyróżnić dwa rodzaje modów: nisko- i wysokoczęstotliwościowe (ang. *low- and high-frequency modes*), które zapewniają prosty i interpretowalny opis kolektywnego ruchu białka. Wykazano, że niskoczęstotliwościowe mody normalne (tzw. mody globalne) odpowiadają kooperatywnym ruchom dużych fragmentów struktury białkowej, które są niezbędne dla funkcjonalności białka. Natomiast ich dalekosiężny charakter umożliwia allosteryczne oddziaływanie różnych, przestrzennie oddalonych od siebie, części struktury białkowej [92-94].

Istnieją dwa proste, a zarazem wydajne ENMs do przewidywania kolektywnej dynamiki struktur białkowych, które dobrze odpowiadają obserwacjom eksperymentalnym. Jest to Model Sieci Gaussowskiej (ang. *Gaussian Network Model*, GNM) wprowadzony przez prof. Iveta Bahar i współpr. [95] oraz jego rozszerzenie do trzech wymiarów opisane jako Model Sieci Anizotropowej (ang. *Anisotropic Network Model*, ANM) [96]. Sieć GNM składa się z koralików/węzłów, których pozycja R_k jest reprezentowana przez atom C^α dla każdego aminokwasu ze struktury białka (**Rys. 8A**). Sprężyny łączą aminokwasy znajdujące się w odległości wartości odcięcia r_c (np. 10 Å). Dla dwóch węzłów i oraz j istnieją wektory pozycji równowagi, R_i^0 oraz R_j^0 , z których możemy otrzymać wektor odległości równowagi R_{ij}^0 (**Rys. 8B**). Węzły i i odległości międzywęzłowe R_{ij} ulegają fluktuacjom gaussowskim, które są określone jako ΔR_i dla węzła i i ΔR_j dla węzła j . Zatem chwilowy wektor fluktuacji pomiędzy węzłami i i j przedstawia się następująco: $\Delta R_{ij} = \Delta R_j - \Delta R_i$.



Rysunek 8. Koncepcja Modelu Sieci Gaussowskiej. (A) Reprezentacja struktury białka z węzłami odpowiadającymi atomom C^α i sprężynami łączącymi węzły w odległości funkcji odcięcia. (B) Schematyczne przedstawienie dwóch węzłów, i i j , w koncepcji GNM. Zmodyfikowane z Wikipedii.

Energia potencjalna układu jest określana na podstawie teorii sprężystości Flory'ego [97] i modelu Rouse'a [98] dla polimerów (wz. 13), gdzie γ jest stałą sprężystości jednakową dla wszystkich sprężyn, a Γ_{ij} jest ij -tym elementem macierzy Kirchhoffa kontaktów między aminokwasami (wz. 14-15).

$$V_{GNM} = \frac{\gamma}{2} \left[\sum_{i,j}^N (\Delta R_j - \Delta R_i)^2 \right] = \frac{\gamma}{2} \left[\sum_{i,j}^N \Delta R_i \Gamma_{ij} \Delta R_j \right] = \frac{\gamma}{2} \Delta R \Gamma \Delta R \quad (13)$$

Stala sprężystości

Wektor fluktuacji ΔR

Macierz Kirchhoffa Γ_{ij}

$$\frac{\gamma}{2} [\Delta R_1 \quad \Delta R_2 \quad \Delta R_3 \quad \dots \quad \Delta R_{N-1} \quad \Delta R_N] \begin{bmatrix} 1 & -1 & & & & \\ -1 & 2 & -1 & & & \\ & -1 & 2 & & & \\ & & & \dots & & \\ & & & -1 & 2 & -1 \\ & & & & -1 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \Delta R_1 \\ \Delta R_2 \\ \Delta R_3 \\ \dots \\ \Delta R_{N-1} \\ \Delta R_N \end{bmatrix} \quad (14)$$

$$\Gamma_{ij} = \begin{cases} -1, \text{ if } i \neq j \text{ and } R_{ij} \leq r_c \\ 0, \text{ if } i \neq j \text{ and } R_{ij} > r_c \\ -\sum_{j, j \neq i}^N \Gamma_{ij}, \text{ if } i = j \end{cases} \quad (15)$$

W przeciwieństwie do GNM, który ogranicza się do oceny średnich kwadratowych przemieszczeń i korelacji krzyżowych pomiędzy fluktuacjami, gdzie ruch jest rzutowany na przestrzeń modów o N wymiarach, koncepcja ANM pozwala na ocenę preferencji kierunkowych poprzez dostarczenie trójwymiarowych opisów $3N-6$ wewnętrznych modów. Dlatego w ANM stała sprężystości układu opisana jest przez Hessian H (ang. *Hessian matrix*), macierz składającą się z drugich pochodnych cząstkowych potencjału V (wz. 16).

$$H = \begin{bmatrix} H_{11} & H_{12} & \dots & H_{1N} \\ H_{21} & H_{22} & \dots & H_{2N} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ H_{N1} & \dots & \dots & H_{NN} \end{bmatrix} \quad (16)$$

$$H_{ij} = \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 V}{\partial X_i \partial X_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial X_i \partial Y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial X_i \partial Z_j} \\ \frac{\partial^2 V}{\partial Y_i \partial X_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial Y_i \partial Y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial Y_i \partial Z_j} \\ \frac{\partial^2 V}{\partial Z_i \partial X_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial Z_i \partial Y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial Z_i \partial Z_j} \end{bmatrix}$$

Więcej szczegółów dotyczących koncepcji GNM i ANM można znaleźć w obszernych artykułach przeglądowych [95, 99-105].

Na podstawie koncepcji ENMs możemy uzyskać różne rodzaje analiz, które z powodzeniem zostały wykorzystane do uzyskania wyników przedstawionych w niniejszym osiągnięciu, np.:

- *Korelacja krzyżowa* pomiędzy ruchami aminokwasów (wz. 17) jest określona przez macierz Kirchhoffa (macierz łączności, Γ_{ij} , $N \times N$ w GNM) do analizy struktur białkowych w celu uzyskania informacji o ich właściwościach dynamicznych i przewidywania regionów, które będą wykazywały silnie skorelowane (wartości $\sim 0,7$ do 1) i antyskorelowane ($-0,75$ do -1) ruchy. Regiony nieskorelowane (wartości ~ 0) nazywane są miejscami zawiasowymi i odgrywają istotną rolę w przewidywaniu potencjalnych miejsc wiązania inhibitorów, które mogą wpływać na kolektywne ruchy białka, prowadząc tym samym do utraty jego funkcji. Podejście to pomaga w identyfikacji potencjalnych miejsc allosterycznych [**H1**, **H3-H4**][**A3**].

$$\langle (\Delta R_i \cdot \Delta R_j) \rangle \sim [\mathbf{\Gamma}^{-1}]_{ij} \quad (17)$$

- *Skanywanie reakcji na zaburzenie* (ang. *Perturbation Response Scanning, PRS*), zaadoptowane do GNM (wz. 18-19), oparte jest na teorii odpowiedzi liniowej [106], pozwala na ocenę przemieszczeń aminokwasów w odpowiedzi na siły zewnętrzne \mathbf{F} w celu przewidywania efektywności i wrażliwości aminokwasów na allosteryczną transdukcję sygnału w strukturze białka [107-109][**H4**][**A3**]. Najsilniejsze efekty mogą być interpretowane jako elementy

sprawujące globalną kontrolę nad propagacją sygnałów allosterycznych do partnera (białka/liganda). Najsilniejsze sensory określają efektywne odbiorniki sygnałów allosterycznych biorących udział w realizacji allosterycznych zmian strukturalnych. W tej metodzie, i -ty element ΔR_i oznacza przesunięcie i -tego aminokwasu z jego położenia równowagi w odpowiedzi na wywieraną siłę \mathbf{F} . Następnie oceniamy odpowiedź ΔR_i wszystkich aminokwasów na jednostkową siłę przyłożoną do j -tego aminokwasu za pomocą operacji, $\Gamma^{-1} \mathbf{F}_j$, gdzie \mathbf{F}_j składa się ze wszystkich zer z wyjątkiem j -tego elementu, który jest równy jeden. Powtarzając tę procedurę (skanując) dla wszystkich miejsc otrzymuje się macierz odpowiedzi [H4].

$$\begin{array}{c} \text{Zaburzenie} \quad \text{Odpowiedź układu} \\ \swarrow \quad \searrow \\ \gamma^{-1} \Gamma^{-1} \mathbf{F} = \Delta \mathbf{R} \end{array} \quad (18)$$

$$\gamma^{-1} \Gamma^{-1} \begin{bmatrix} \mathbf{F}_1 \\ \mathbf{F}_2 \\ \mathbf{F}_3 \\ \dots \\ \mathbf{F}_{N-1} \\ \mathbf{F}_N \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \Delta \mathbf{R}_1 \\ \Delta \mathbf{R}_2 \\ \Delta \mathbf{R}_3 \\ \dots \\ \Delta \mathbf{R}_{N-1} \\ \Delta \mathbf{R}_N \end{bmatrix} \quad (19)$$

- *Dynamika sygnowa* (*SignDy*) służąca do oceny charakterystycznych cech dynamiki całej rodziny białek oraz do klasyfikacji białek na podstawie ich kolektywnej dynamiki [110][H4].
- *Obliczenia sztywności mechanicznej* (*MechStiff*) w celu określenia odporności mechanicznej na siłę zewnętrzną tzn. zadanie jednoosiowych naprężeń przyłożonych do określonych par aminokwasów w strukturze białka. Koncepcja ta wykorzystuje ANM do skonstruowania mapy odpowiedzi mechanicznej wszystkich par aminokwasów w danym białku jako odpowiedź na deformację jednoosiową. Metoda ta jest wprowadzona i szczegółowo opisana w [105], a jej zastosowanie do struktury białkowych można znaleźć w [H4, A4].

ProDy. Analiza stosowana do uzyskania wyników mojego osiągnięcia habilitacyjnego została napisana m.in. w języku *Python* w pakiecie *ProDy* [111, 112][A6]. Jako postdoc w grupie prof. Ivet Bahar uczestniczyłam w rozwoju tego pakietu [A4-A6], który jest obecnie szeroko wykorzystywany przez środowisko naukowe (>2,3 mln pobrań). Napisałam >2 200 linii kodu, które zostały włączone do programu *ProDy* (dane *Github*), oraz >50 000 linii kodu, które zostały wykorzystane w niezależnych skryptach udostępnionych innym naukowcom, m.in., poprzez *Supplementary Materials* w opublikowanych publikacjach.

IV.3.3. Wyniki i opis publikacji

Osiągnięcie habilitacyjne dotyczy enzymatycznych aspektów programu przemian w komórce zwanego ferroptozą, a skupia się głównie na lipooksygenazach (LOXs) dających największy wkład w generowanie nadtlenków lipidów powodujących maszyną peroksydację lipidów i uszkodzenia błon w tym procesie. Osiągnięcie obejmuje dwa główne kierunki/cele:

- rozszyfrowanie molekularnych podstaw ferroptozy związanych z peroksydacją lipidów generowaną przez lipooksygenazy 15LOXs, oraz
- hamowanie procesu ferroptozy poprzez działanie na strukturę 15LOXs lub produkty tego enzymu.

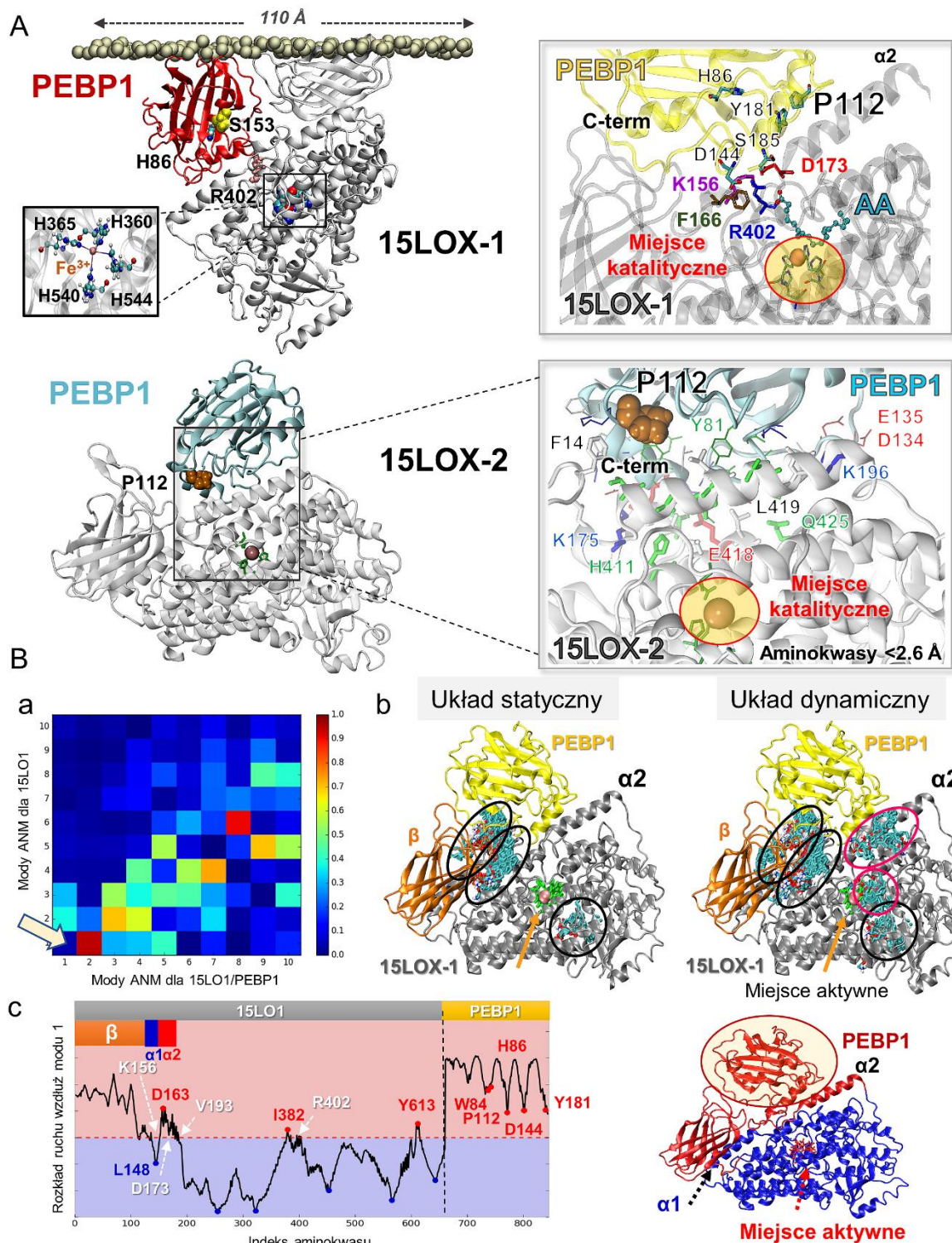
Bazując na tym podziale (A/B), omówię prace w grupach tematycznych dotyczących identyfikacji molekularnych mechanizmów ferroptozy na poziomie atomowym oraz badań inhibicji z wykorzystaniem (i) tlenu azotu, (ii) najpowszechniejszego inhibitora ferroptozy – ferostatyny-1 oraz (iii) fosfolipaz uczestniczących w hydrolizie wodoronadtlenków lipidowych, które są generowane przez ludzki kompleks 15LOX z PEBP1.

A. Poznanie podstawowych mechanizmów procesu ferroptozy

Ludzkie lipooksygenazy. Szereg badań eksperymentalnych z nokautem LOX (LOX w formie nieczynnej) dało kontrowersyjne wyniki, które tylko częściowo potwierdzały udział lipooksygenaz [113, 114] w procesie ferroptozy, sugerując, że do peroksydacji PUFA-PL potrzebny jest jeszcze inny czynnik. Rzeczywiście, w pracy [H1] wykazaliśmy, że ferroptozą jest programem śmierci komórkowej uruchamianym poprzez selektywne utlenianie SA-PE przez 15-lipooksygenazę (izofory: 15LOX-1 i 15LOX-2) związaną z białkiem PEBP1 i dopiero ten kompleks białkowy stymuluje proces ferroptozy [H1].

PEBP1 jest bardzo ważnym białkiem regulatorowym, które jest zaangażowane w różne rodzaje programów RCD [115]. W licznych badaniach wykazano, że PEBP1 oddziałuje nie tylko z lipidami [116, 117] lub małymi cząsteczkami [118], ale także z wieloma białkami związanymi z RCD, takimi jak RIP3 (nekroptoza [115]), Raf-1 (nekroptoza [115]), i LC3 (autofagia [119])[A1]. Nasze badania pokazały istotność PEBP1 w mechanizmie regulacyjnym jeszcze innego procesu RCD – ferroptozy – w komórkach nabłonka dróg oddechowych w astmie, komórkach nabłonka nerek w niewydolności nerek oraz w urazach mózgu [H1]. Odkryliśmy, że po związaniu PEBP1, ludzka 15LOX zmienia swoją specyficzność substratową z klasycznego substratu LOXs, tj. wolnego PUFA [51] (AA) na zestryfikowany PUFA-PL (SA-PE) w celu wygenerowania hydroperoksy-PE (zwanego również 15-HpETE-PE), który jest wykorzystywany jako sygnał śmierci komórkowej w ferroptozie [H1].

Aby zapewnić wgląd na poziomie molekularnym w działanie różnych komponentów maszyny ferroptozy, zastosowałam narzędzia molekularnej biofizyki obliczeniowej do wygenerowania modeli strukturalnych ludzkiego kompleksu 15LOX/PEBP1 przy użyciu symulacji dokowania molekularnego [H1]. Przewidywanie modeli fizycznych kompleksu ludzkiego 15LOX/PEBP1 dostarczyło szczegółowych informacji na temat ich interfejsów wiążących i ich fizycznych oddziaływań w obrębie par aminokwasów (**Rys. 9A** (15LOX-1 (*górny panel*) i 15LOX-2 (*dolny panel*)) [H1]. Informacje te zostały następnie wykorzystane do zaproponowania potencjalnych mutacji (np. P112E w PEBP1) i modyfikacji (obcięcie helisy C-końcowej, **Rys. 9, dolny panel**) w strukturze białka PEBP1 w celu weryfikacji zaproponowanego modelu komputerowego. Badania mutagenetyczne zostały przeprowadzone przez współpracowników z Uniwersytetu w Pittsburgu [H1].



Rysunek 9. Model strukturalny i dynamika ludzkiego kompleksu 15LOX/PEBP1. (A) Modele strukturalne 15LOXs (15LOX-1 i 15LOX-2) w kompleksie z PEBP1 wraz z interfejsami wiążącymi. (B) Analiza Modeli Sieci Elastycznych: (a) Korelacja pomiędzy modami ANM dla 15LOX-1 w formie niezwiązanej i związanej z PEBP1. Korelacje oznaczono kolorami od czerwonego (najsilniejsze) do niebieskiego (najsłabsze). (b) Porównanie pól wiązania SA-PE na kompleksie PEBP1/15LOX-1, uzyskane dla kompleksu sztywnego/statycznego (lewy panel) i dynamicznego/elastycznego wzdłuż modu ANM 1 (prawy panel). Dwa dodatkowe miejsca wiązania (różowe owale) zostały zaobserwowane, gdy pozwolono kompleksowi na ruch wzdłuż modu 1. (c) Profil GNM, który pokazuje względne ruchy różnych regionów 15LOX-1 w kompleksie z PEBP1. Dodatkowo (czerwone) i ujemne (niebieskie) regiony wskazują na regiony strukturalne podlegające ruchom antykorelacyjnym. Kolory modelu odpowiadają panelowi c. Źródło: różne rysunki z [H1].

Białka są obiektami dynamicznymi, które ulegają przemianom strukturalnym. Są one kluczowe dla ich funkcji, ale nie są w pełni uchwycone przez badania eksperymentalne (krystalografia, NMR), które dostarczają jedynie niewielkiej liczby pól strukturalnych. Chcąc uzyskać informacje o dalekosiężnej dynamice kompleksu 15LOX-1/PEBP1, użyłam modeli sieci elastycznych (GNM i ANM) w celu dostarczenia możliwego wyjaśnienia, dlaczego specyficzność substratowa 15LOX-1 może się zmieniać po związaniu z białkiem PEBP1. Moje przewidywania metodą ANM sugerują, że po związaniu białek, 15LOX-1 zyskuje nowy mod globalny, który może zmienić specyficzność enzymu. Mod ten nie jest natomiast dostępny dla wyizolowanego 15LOX-1 (**Rys. 9Ba**, Wideo w [**H1**]). Dokowanie molekularne zastosowane do kompleksu 15LOX-1/PEBP1 zmieniającego konformacje wedle przewidzianego modu ANM wykazało różnice w wiązaniu SA-PE i jego dostępności względem nowych miejsc wiązania ulokowanych bliżej miejsca katalitycznego (*różowe owale*, **Rys. 9Bb**). Ponadto, zauważyliśmy w analizie GNM, że tworzenie kompleksu ma wpływ na względne ruchy poszczególnych regionów 15LOX-1, w przeciwieństwie do izolowanego 15LOX-1 (**Rys. 9Bc**).

Następnie zbadaliśmy wpływ PEBP1 na enzymatyczne utlenianie wolnych AA. W nieobecności PEBP1, 15LOXs wykazują wyższą aktywność wobec wolnego AA niż wobec SA-PE [**H1**]. Wszystko zmienia się w obecności PEBP1. Dlatego też zbadaliśmy zdolność PEBP1 do wiązania AA, wykorzystując jego dwa modele, strukturę natywną (WT) i mutant (Y176X z usuniętą helisą C-końca od Y176), z uwzględnieniem podejścia eksperymentalnego i obliczeniowego. Badania eksperymentalne wykryły trzy, sześć i dziewięć miejsc wiążących dla WT PEBP1. Dlatego też wytypowałam aż dziewięć możliwych miejsc wiążących, które zostały dodatkowo zweryfikowane przez pełno-atomowe symulacje MD (7 pól pozostało stabilnie związanych z PEBP1) [**H1**]. Eksperymenty wykazały, że usunięcie C-końcowej helisy PEBP1 znacznie zmniejsza wiązanie AA, co sugerowały również badania obliczeniowe dla Y176X PEBP1 (rysunki¹: *Fig.6F*, *Fig. S6A,C*; dostępne w [**H1**]). W tych badaniach moja praca ukierunkowywała i wspierała badania eksperymentalne poprzez dostarczenie molekularnego wyjaśnienia mechanizmów, które mogą zachodzić w wyżej wspomnianych układach biochemicznych.

Nasza kolejna praca [**H2**] dostarczyła potencjalnego wyjaśnienia, dlaczego enzymatyczny kompleks 15LOX-2 i PEBP1 wybiera substrat SA-PE spośród ~100 innych możliwych do utlenienia fosfolipidów błonowych. By odkryć selektywne i sprecyzowane mechanizmy specyficzności katalitycznej, zastosowaliśmy lipidomikę, analizę mutacyjną i biofizykę obliczeniową. Badania wykazały, że są one związane z (i) reaktywnością w kierunku łatwo dostępnej błony z SA-PE, (ii) względną przewagą gatunków PUFA PE w porównaniu z innymi PUFA oraz (iii) allosteryczną modyfikacją ludzkiego 15LOX-2 po związaniu z białkiem PEBP1.

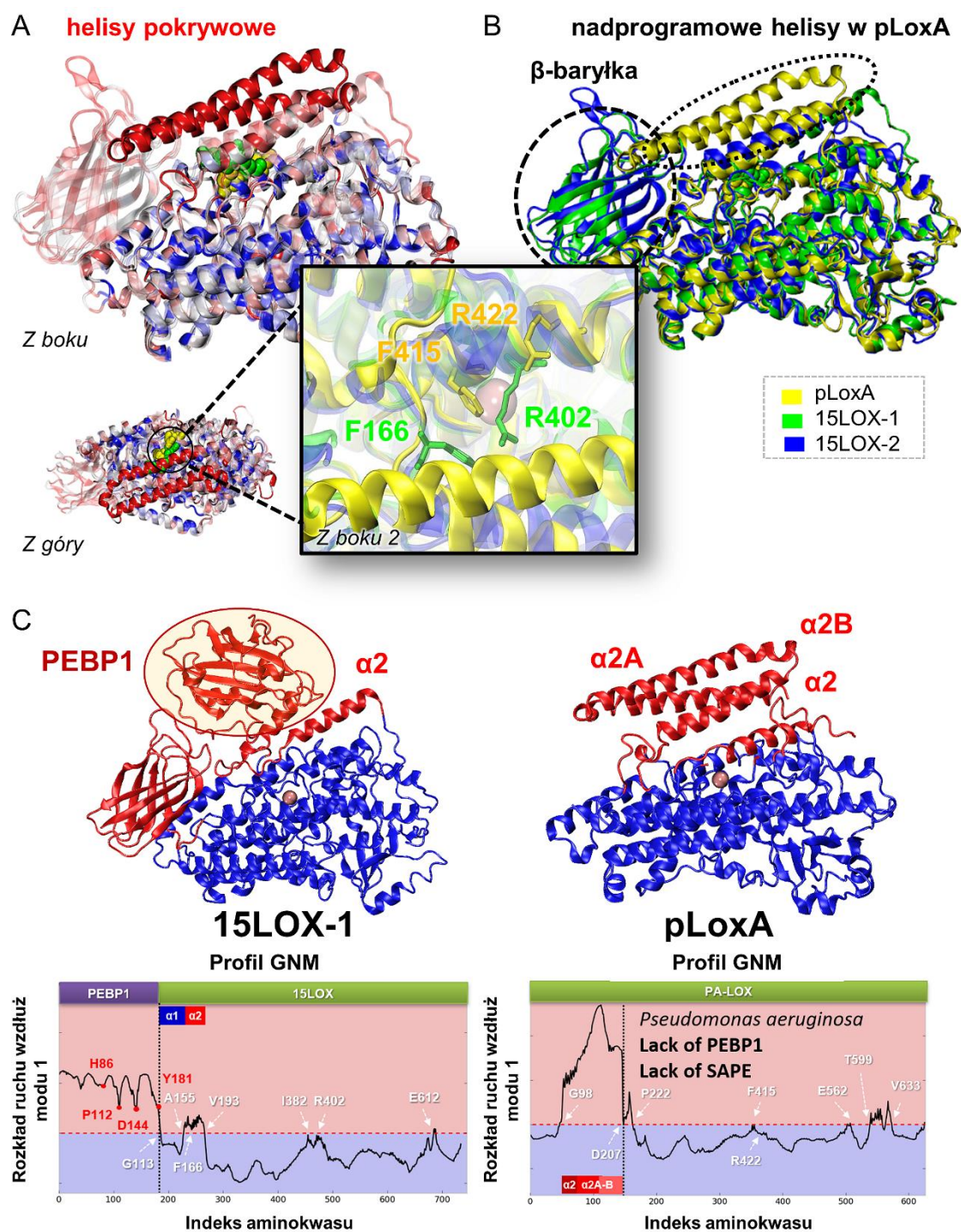
Modelowanie komputerowe było zaangażowane w wyjaśnienie allosterycznej modulacji 15LOX-2 po związaniu z PEBP1 [**H2**]. Połączyłam tutaj dwa podejścia, tj. dokowanie molekularne zapewniające informacje o powinowactwie wiązania struktur (w tym przypadku kompleksu 15LOX-2/PEBP1 i SA-PE) oraz analizę ruchów kompleksu dającą wgląd w kolektywne ruchy struktur białkowych (15LOX-2/PEBP1). Celem badania było pokazanie, jak substrat wiąże się do miejsca katalitycznego 15LOX-2 w formie związanej z PEBP1 ulegającej zmianie konformacyjnej wedle modu ANM 1 (wideo w [**H2**]). Podejście to zostało wykorzystane do pokazania, że nowy mod enzymu pojawia się po związaniu z PEBP1. Zaobserwowaliśmy przy

¹ Odnośniki do rysunków kursywą w języku angielskim odnoszą się do numerów rysunków w publikacjach [**H1-H8**]

tym ruch mobilnej helisy zmniejszającej dostęp do wejścia do miejsca aktywnego, co ograniczyło dostęp dla lipidów z dużymi głowami hydrofobowymi (PI i PC), ale nie dla lipidów PE [H2].

Bakteryjna lipooksygenaza. Pokazaliśmy, że ferroptoza jest regulowanym programem śmierci komórki, który może być uruchamiany poprzez selektywne utlenianie SA-PE przez ludzki kompleks 15LOX/PEBP1 [H1-H2]. 15LOX są szeroko reprezentowane w wielu komórkach eukariotycznych [120, 121], jednak są również obecne w prokariotycznych bakteriach [122, 123]. Z tego względu zapoczątkowaliśmy badania obejmujące 15LOX z bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, która jest uważana za patogen o dużym znaczeniu medycznym. Po pierwsze dlatego, że występuje powszechnie w środowiskach naturalnych, tj. gleby, rośliny czy woda i wywołuje choroby nie tylko u ludzi, ale także u roślin i zwierząt [124]. Po drugie dlatego, że Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wpisała *P. aeruginosa* na listę priorytetów krytycznych ze względu na jej zdolności infekcyjne i oporność wielolekową [125]. Wykazaliśmy w [H3], że *P. aeruginosa* rozwinęła zdolność do używania unikalnego enzymu, 15-lipooksygenazy (zwanego pLoxA lub PA-LOX), do przejmowania ferroptotycznego programu śmierci komórki, tzn. wykorzystania wielonienasyconego SA-PE gospodarza do wywoływania przechwyconej ferroptozy w komórkach nabłonka oskrzeli, co nie tylko niszczy barierę nabłonkową, ale może naruszać funkcje immunostymulujące [H3]. Co zaskakujące, ten typ bakterii nie zawiera w swoim układzie PEBP1 ani lipidów SA-PE, ale mimo to jest w stanie dokonywać ekspresji pLoxA, utleniać SA-PE gospodarza do 15-HpETE-PE i wywoływać ferroptozę u ludzi. Eksperymenty na próbkach wyizolowanych od pacjentów z uporczywymi infekcjami dolnych dróg oddechowych, dostarczone przez współpracowników, wykazały wysoki poziom utlenionego SA-PE u pacjentów z mukowiscydozą [H3], u których *P. aeruginosa* powoduje długotrwałe, przewlekłe infekcje dróg oddechowych, często trwające latami. Ten ewolucyjnie zachowany mechanizm, wykryty w badaniach [H3], tj. ferroptoza inicjowana przez pLoxA może być potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu pacjentów z patologią mukowiscydozy, która stanowi najczęstszą autosomalną chorobę recesywną (populacja kaukaska; 1/3500 urodzeń) [126].

Do wyjaśnienia na poziomie molekularnym, dlaczego pLoxA może wyzwać ferroptozę bez udziału PEBP1 [H3] wykorzystałam podejścia bazujące na biofizyce obliczeniowej oraz modele strukturalne bakteryjnego pLoxA i ludzkich kompleksów 15LOX/PEBP1. Na podstawie szczegółowej analizy dopasowania strukturalnego eukariotycznych i prokariotycznych struktur 15LOX, zidentyfikowałam charakterystyczne cechy ludzkich 15LOXs, które są również zachowane w strukturze pLoxA i wymagane w procesie utleniania SA-PE, jednak niezauważalne poprzez tradycyjne dopasowanie sekwencji (Rys. 10A, zakonserwowane aminokwasy na niebiesko i Fig. S7A w [H3]). Wykazałam również, że pomimo dużego podobieństwa strukturalnego modeli prokariotycznych i eukariotycznych, pLoxA posiada dwie dodatkowe helisy, które są nieobecne w 15LOX ssaków (Rys. 10B). Analiza modów normalnych przy użyciu GNM sugerowała, że nadprogramowe helisy mogą służyć w pLoxA jako pokrywa i dodatkowo modyfikować organizację miejsca katalitycznego, aby faworyzować wiązanie bardziej masywnych substratów, takich jak SA-PE zamiast AA, podobnie jak PEBP1 dla ludzkich 15LOXs (Rys. 10C). Ponadto pokazałam, że niskoczęstotliwościowy mod ANM (mod 1) uwidacznia przejście pomiędzy strukturą związaną a niezwiązaną z substratem, uzyskaną w badaniach krystalograficznych i zdeponowaną w PDB (wideo w [H3]). To dodatkowo pokazuje wiarygodność przewidywanych ruchów/modów przez ENMs.



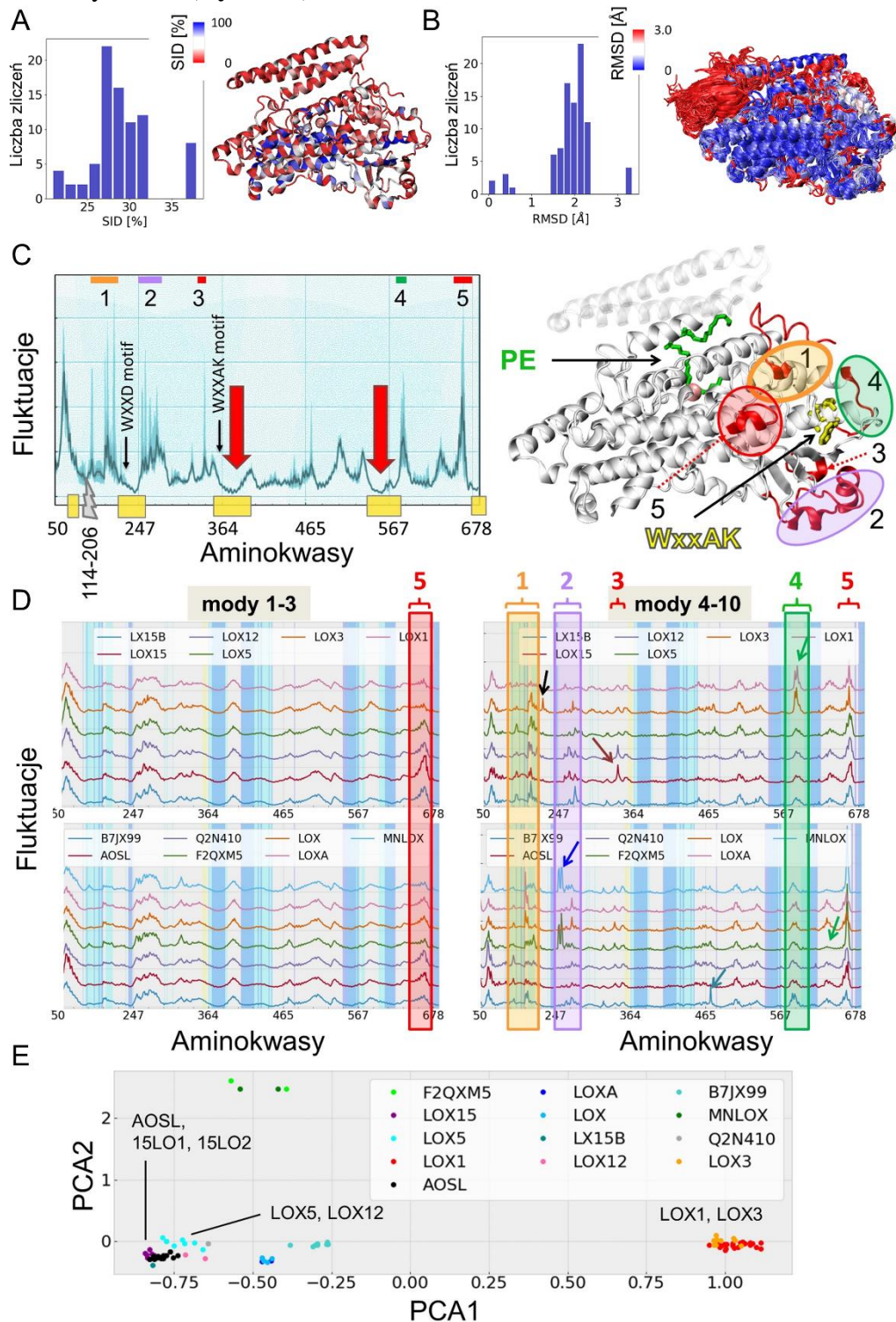
Rysunek 10. Dynamika i zakonserwowanie sekwencji struktury pLoxA oraz jej porównanie z formą ludzką. (A) Miejsce wiążące ligand w strukturze pLoxA i porównanie pary Arg-Phe, reprezentowanej przez bakteryjne i ludzkie LOXs. Struktura jest pokolorowana według zakonserwowania sekwencji (czerwono-biało-niebieskie kolory) na podstawie członków rodziny LOXs. (B) Strukturalne porównanie pLoxA i ludzkich LOX (15LOX-1 i 15LOX-2). Strukturalne dopasowanie pokazuje brakującą β -baryłkę bakteryjnego pLoxA i jego dwie dodatkowe α -helisy, (C) Porównanie globalnych ruchów GNM dla pLoxA i 15LOX-1 związanych z PEBP1. Rozkład ruchu dla poszczególnych aminokwasów wzdłuż modu 1 uzyskany z analizy GNM kompleksu 15LOX-1/PEBP1 (lewy panel) i pLoxA (prawy panel) dzielące strukturę na dwie domeny wykazujące ruch antykorelacyjny. Aminokwasy w miejscach zawiasowych (wartości zbliżone do 0, na biało) są zaznaczone. Skorelowane grupy aminokwasów są pokazane na czerwono lub niebiesko. Źródło: [H3].

Następnie wykorzystałam dostępne sekwencje rodziny LOXs z bazy Pfam [127] (>230 sekwencji LOXs; surowe dane przygotowane przez dr Jamesa Kriegera w ramach analizy ewolucyjnej sekwencji LOXs), aby przedstawić podobieństwo ich sekwencji oraz drzewo filogenetyczne ze szczególnym uwzględnieniem różnych bakterii (*Fig. S8* w [H3]). Analiza ujawniła tendencję do zakonserwowania aminokwasów zlokalizowanych w pobliżu miejsca katalitycznego LOXs, podczas gdy regiony peryferyjne, w tym dodatkowe helisy odróżniające pLoxA od ludzkich 15LOXs, wykazywały brak podobieństwa sekwencyjnego w obrębie LOXs. W ramach badań przyjrzelśmy się dokładnie całej rodzinie LOXs. W szczególności skupiliśmy się na właściwościach strukturalnych i dynamice, które mogą dać szczegółowe informacje o transdukcji sygnału, korelacji krzyżowej i funkcjonalności różnych regionów białka [H4]. Takie modelowanie w odniesieniu do różnych gatunków i typów może pomóc w zrozumieniu spójnych dla rodziny LOXs mechanizmów działania, jak również uwypuklić specyficzność przypisaną jej poszczególnym członkom, np. dlaczego 15LOX-2 wykazuje specyficzność w kierunku wstawiania O₂ wyłącznie w pozycji C15 PUFA, a 12LOX w pozycji C12, a tylko sporadycznie w C15, lub dlaczego niektóre LOXs preferują kwas linolowy (LA), a nie wspomniany wyżej jako preferowany substrat, kwas arachidonowy (AA).

W tym ściśle obliczeniowym podejściu wykorzystaliśmy modele strukturalne i metody oparte na ich analizie wraz z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych do analizy 88 dostępnych struktur krystalicznych LOX zdeponowanych w bazie PDB. Poszczególnych członków rodziny LOXs sklasyfikowaliśmy w oparciu o ich: (i) sekwencję, (ii) strukturę, (iii) dynamikę oraz (iv) własności allosteryczne. Ze względu na obszerność wykonanych przeze mnie obliczeń i analiz opublikowanych w pracy [H4], tylko niektóre główne punkty pracy zostaną tutaj przedstawione.

Badania [H4] pozwoliły oszacować, że wśród członków rodziny LOX identyczność sekwencji (SID) jest stosunkowo niewielka (SID: $28,6 \pm 3,7$ Å, **Rys. 11A**), ale jednocześnie rodzina ta zachowuje podobną strukturę przestrzenną (RMSD $\sim 2,3$ Å, **Rys. 11B**). Największe zróżnicowanie strukturalne występuje przy β -baryłce i helisach pokrywowych [H3-H4]. Następnie, w oparciu o nowo wprowadzony przez dr J. Kriegera, dr S. Zhanga i dr H. Li (współautorów [H4]) moduł ProDy (*SignDy*), uzyskałam tzw. *profil sygnaturowy* opisujący dynamikę całej rodziny LOXs. Profil ten zawiera sumaryczne fluktuacje aminokwasów, uzyskane z ENMs, dla dostępnych struktur krystalicznych dla poszczególnych członków rodziny LOX (**Rys. 11C**, *niebieska krzywa*). Uwzględnia on przy tym różnice między nimi jako odchylenie standardowe (*jasnoniebieskie pasmo*). Tego typu analiza dostarcza informacji nt. podobieństw (niskie odchylenie standardowe, **Rys. 11C**) i różnic (wysokie odchylenie standardowe, **Rys. 11C**) wśród danej rodziny białek na podstawie ich dynamiki oszacowanej na podstawie ENMs. W naszym przypadku na podstawie dziesięciu niskoczęstotliwościowych modów GNM. Analiza pokazuje, że miejsca funkcjonalne (aminokwasy katalityczne, kluczowe motywy sekwencyjne (np. WxxAK, WxxD) ulegają minimalnemu ruchowi (**Rys. 11C**, *żółte pola*) ze względu na ściśle określoną orientację, która jest wymagana dla mechanochemicznej aktywności enzymu [128]. Również dynamika kolektywna jest podobna we wszystkich LOXs (wąskie pasmo na **Rys. 11C**) z wyjątkiem pięciu regionów oznaczonych kolorowymi paskami wzdłuż górnej linii wykresu, wyświetlonych także na strukturze przestrzennej pLoxA (**Rys. 11C**, *na czerwono na prawym panelu*). Szczegółowa analiza modów niskiej (*lewy panel*) i wysokiej częstotliwości (*prawy panel*) wskazała różnice pomiędzy poszczególnymi wariantami LOX

(Rys. 11D). Warto zauważyć, że *region 5* może wpływać na dostosowanie precyzyjnej pozycji określonych substratów w miejscu katalitycznym (jak sugeruje [H2]). Jego ruch antykorelacyjny, z zakonserwowanymi rejonami obejmującymi motywy WxxAK i WxxD (Fig. S3 w [H4]), może ułatwiać dostęp tlenu do miejsca katalitycznego (pokazany w [H5-H6] jako *Wejście 1* dla 15LOX-2). Na dalszym etapie, na podstawie podobieństw dynamiki kolektywnej poszczególnych LOX, byłam w stanie rozróżnić podgrupy w obrębie rodziny LOX, m.in. podzielić je na podstawie ich dynamiki (Rys. 11E).



Rysunek 11. Właściwości członków rodziny LOX. (A) Histogram identyczności sekwencji (SID) wraz z odpowiadającymi wartościami SID aminokwasów, przedstawionymi na strukturze przestrzennej

pLoxA. (B) Rozkład RMSD wraz z nałożeniem struktur LOX, (C) Profil sygnowy określający dynamikę rodziny LOX. Wyniki oparte na 88 strukturach PDB. Regiony 1-5 pokazane na reprezentatywnej strukturze *pLoxA* są skupione wokół D207-R211, I250-E276, A338, S585-S588 i A666-R668. Motyw WxxAK obejmujący aminokwasy W357-K361 w *pLoxA*. (D) Mody niskiej częstotliwości (mody 1-3) oraz mody wysokiej i średniej częstotliwości (mody 4-10) dla 13 reprezentatywnych członków rodziny LOX. (E) Rozmieszczenie LOXs w podprzestrzeni wyznaczonej przez dwie główne składowe uzyskane metodą PCA. Źródło: [H4].

Przedstawione powyżej dane były podstawą do przeprowadzenia innych istotnych analiz opartych na ENMs, które dostarczyły podobieństw i różnic pomiędzy członkami rodziny LOX. Wszystkie analizy, w tym korelacja krzyżowa między fluktuacjami różnych regionów u członków LOX (Fig. 3 oraz Fig. S3 w [H4]) oraz analiza PRS oceniająca rolę aminokwasów LOX jako sensorów i efektorów sygnałów allosterycznych w rodzinie LOX (Fig. 4 w [H4]) implikują znaczenie Regionu 5. Istotna rola tego rejonu została również zauważona w analizie sztywności mechanicznej opartej na ANM (zaimplementowanej jako moduł *MechStiff* przeze mnie w pakiecie ProDy). Metoda ta oblicza wytrzymałość na działanie naprężeń jednoosiowych dla poszczególnych par aminokwasów w białku (Fig. S5 w [H4]). Wagę tego rejonu można było dostrzec również w symulacjach MD (Fig. S4 w [H4]) dla ludzkiego kompleksu 15LOX-1 z białkiem PEBP1. Przed związaniem z PEBP1 aminokwasy 15LOX-1 zlokalizowane przy interfejsie z PEBP1 wykazywały cechy wysokiej wrażliwości (potencjalne miejsca wiązania partnera w PRS). Natomiast po związaniu z PEBP1 cecha ta przenosiła się na region 5. W [H4] przeprowadziłam pierwsze pełno-atomowe symulacje MD kompleksu ludzkiego 15LOX-1/PEBP1 z w pełni sparametryzowanym miejscem katalitycznym 15LOX-1 (parametryzacja na podstawie obliczeń kwantowo-chemicznych) [H4]. Po sprawdzeniu zmienności dynamicznej (Rys. 11) i strukturalnej (Fig. S1 w [H4]) rodziny LOX, skupiliśmy się na zakonserwowaniu sekwencji wśród LOX u różnych gatunków (u człowieka – Fig. S2 w [H4]), uwzględniając przy tym ich charakterystyczne i wysoce stabilne motywy (Fig. 5 oraz Fig. S1 w [H4]).

B. Zahamowanie sygnału śmierci komórkowej o charakterze ferroptotycznym

Zrozumienie, w jaki sposób komórki umierają w procesie ferroptozy, stanowi ogromny potencjał dla badań translacyjnych, oferując możliwości kontroli związanej ze śmiercią lub przeżyciem komórek na drodze ferroptozy. Ferroptozę została powiązana z patogenezą wielu ciężkich chorób. Stąd duże zainteresowanie projektowaniem nowych inhibitorów i metod zapobiegania ferroptozie. Celem niniejszego osiągnięcia naukowego było nie tylko rozszyfrowanie mechanizmów kontrolujących enzymatyczny aspekt ferroptozy, ale również znalezienie efektywnego sposobu jej hamowania, zwłaszcza poprzez ingerencję w proces peroksydacji lipidów związany z kompleksem 15LOX/PEBP1 [H1-H3]. Rozważaliśmy cztery podejścia, opisane poniżej, które mogą znacząco wpłynąć na produkcję wodoronadtlenków lipidów prowadzącą do śmierci komórki na drodze ferroptozy, tj.

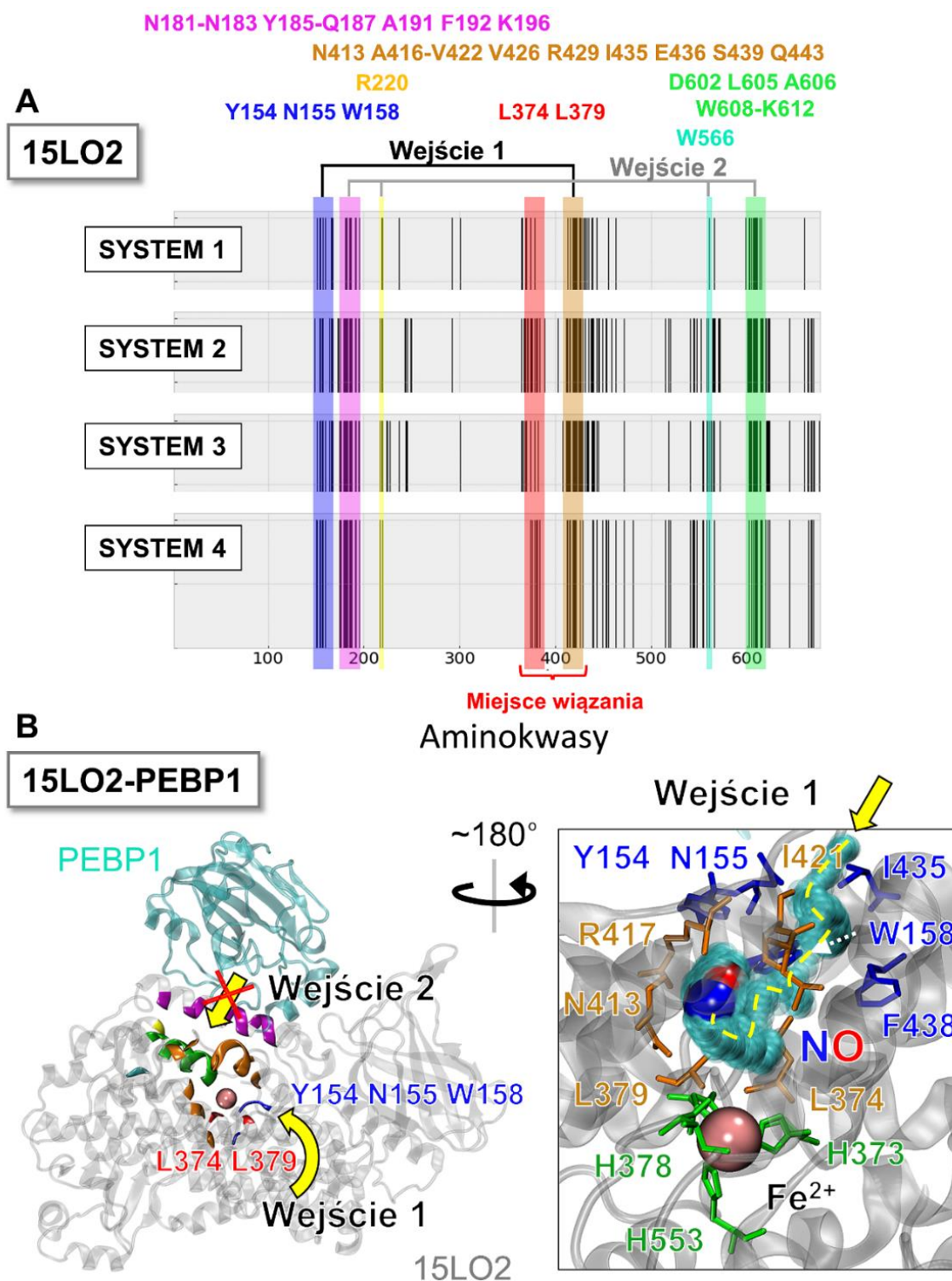
- (i) wykorzystanie tlenku azotu (NO) do kontrolowania produkcji wodoronadtlenków lipidów przez ludzki kompleks 15LOX/PEBP1 [H5-H6],
- (ii) wpływ na tworzenie kompleksu ludzkiego 15LOX/PEBP1 po związaniu ferostatyny-1 (Fer-1) [H7],

- (iii) eliminacja wodoronadtlenków lipidów, które są produkowane przez kompleks 15LOX/PEBP1 w procesie hydrolizy, zanim zajdzie masowa peroksydacja lipidów błonowych [H8],
- (iv) znalezienie nowych inhibitorów kompleksu 15LOX/PEBP1 (manuskrypt złożony w czasopiśmie PNAS, artykuł pierwszoautorски łącznie z trzema innymi osobami).

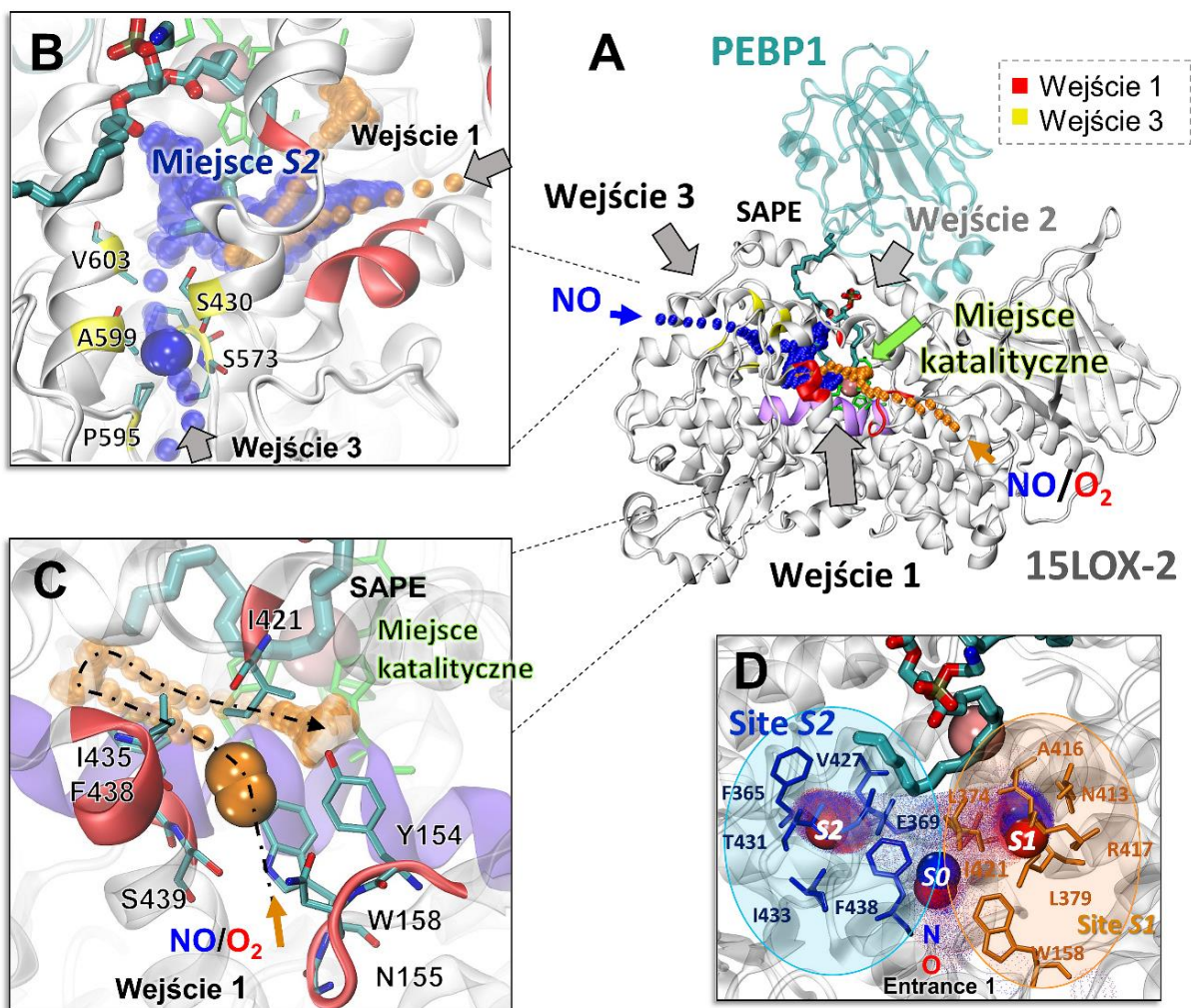
Tlenek azotu (i) Produkcja wodoronadtlenków lipidów przez LOXs, jak wskazano na **Rys. 4**, odbywa się w obecności żelaza i wymaga wstawienia cząsteczki O₂ do łańcucha PUFA, który jest bogaty w bisalilowy węgiel metylenowy. W naszych poprzednich badaniach [H1-H3] wykazaliśmy, że kompleks 15LOX/PEBP1, a nie sama 15LOX, katalizuje utlenianie SA-PE, dlatego skupiliśmy się tutaj głównie na kompleksie 15LOX-2/PEBP1 [H5] i jego formie związanej z preferowanym substratem, SA-PE [H6]. W celu sprawdzenia, czy cząsteczki tlenu azotu (NO) mogą działać jako efektywne regulatory ferroptozy, przeprowadziliśmy badania obejmujące oddziaływania NO z wyżej wymienionym kompleksem. Eksperymentalnie wykazaliśmy, że enzym o nazwie indukowana syntaza tlenu azotu (iNOS), który katalizuje produkcję NO [129], wykazuje zdolność do bezpośredniej kontroli ferroptozy, w makrofagach i mikroglejach, poprzez zdolność NO do tłumienia produkcji 15-HpETE-PE przez kompleks 15LOX-2/PEBP1. Wyjaśnienia na poziomie molekularnym dotyczące tego mechanizmu były możliwe dzięki moim badaniom obliczeniowym [H5-H6].

Używając pełno-atomowych symulacji MD, pokazałam, jak NO konkuruje z O₂ [animacje w [H5] (substrat niezwiązany) i [H6] (substrat związany), *Fig. 3* w [H6]] o miejsce wiązania w centrum katalitycznym 15LOX-2, dostarczając przy tym szczegółowych informacji nt. kluczowych oddziaływań na poziomie molekularnym. Efekt ten powoduje zahamowanie produkcji 15-HpETE-PE przez ludzki kompleks 15LOX-2/PEBP1 przy jednoczesnym sprzyjaniu powstawania nitrozyłowanego ETE-PE, tj. NO zamiast O₂ jest wstawiany do łańcucha PUFA [H6].

Przeprowadzone symulacje MD, zaprezentowane w [H5-H6] dostarczają opisu inhibicji wywoływanej cząsteczkami NO, rozszerzając zarazem nasze zrozumienie mechanizmu ferroptozy poprzez identyfikację specyficznych oddziaływań i mechanizmów aktywacji LOXs. Moje badania obliczeniowe pozwoliły scharakteryzować ścieżki dyfuzji zlokalizowane w strukturze 15LOX dla O₂ i NO. Cząsteczki O₂ są niezbędne do zainicjowania reakcji katalitycznej w ludzkich 15LOX-2 do generowania wodoronadtlenków lipidów (**Rys. 4**). Przeprowadzone przeze mnie symulacje MD dla 15LOX-2 w formie związanej/niezwiązanej z PEBP1 i SA-PE (forma niezwiązana z SA-PE [H5] i forma związana z SA-PE [H6]) ujawniły funkcjonalne kanały (określane jako "*Wejście*" na **Rys. 12-13**) nakierowujące cząsteczki O₂ i NO do miejsca katalitycznego 15LOX-2 (**Rys. 13A-B**, **Rys. 13B-C**) oraz aminokwasy uczestniczące w oddziaływaniach z NO/O₂ w procesie utleniania (**Rys. 13D**). Następnie wykazałam, że *Wejście 1* jest głównym kanałem tlenowym (w pobliżu aminokwasów Y154, N155, W158) do miejsca katalitycznego, a *Wejście 2* jest prawie całkowicie zasłonięte w obecności PEBP1 (**Rys. 12B**). W symulacjach związanych z substratem zaobserwowałam dodatkowy kanał, *Wejście 3*, który nie był obserwowany w symulacjach bez substratu (**Rys. 13B**).

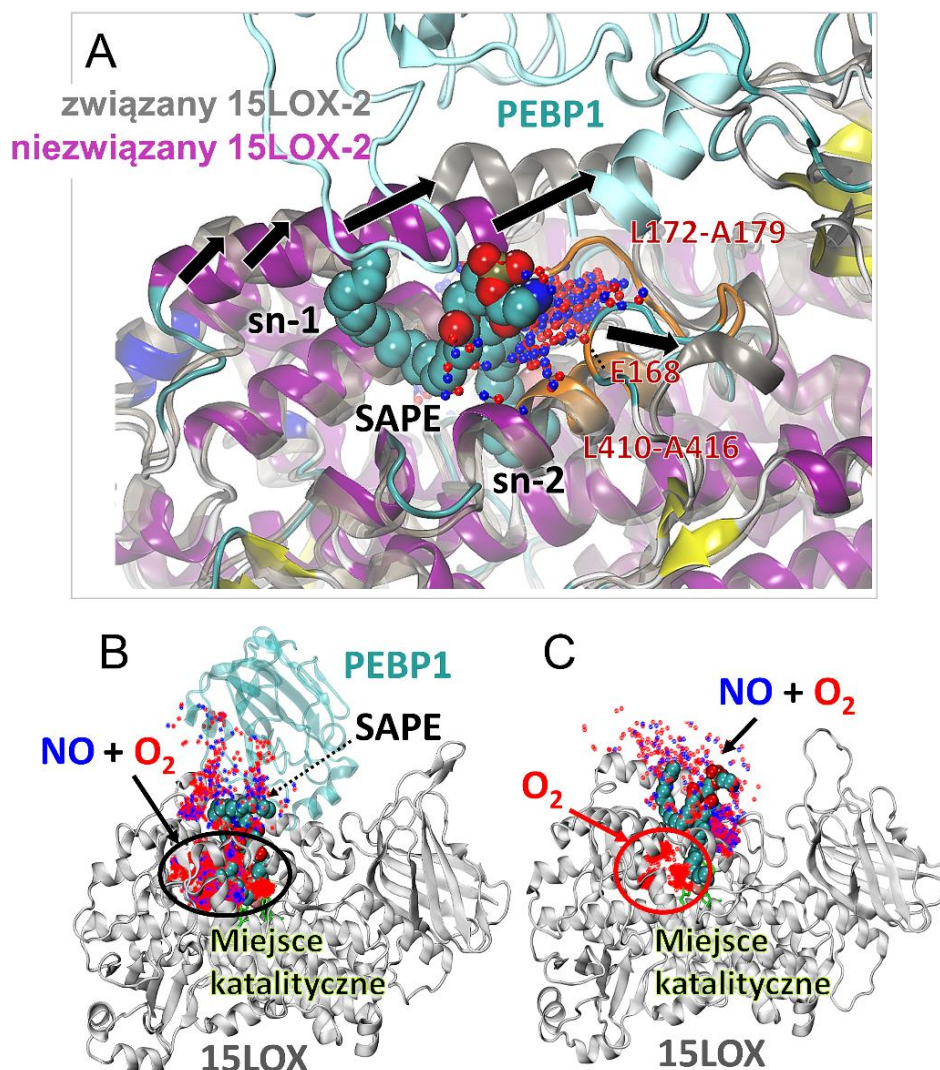


Rysunek 12. Pełno-atomowe symulacje MD kompleksu ludzkiego 15LOX-2/PEBP1. (A) Bliskie kontakty NO i O₂ podczas symulacji MD (4 trajektorie), (B) Struktura kompleksu 15LOX-2/PEBP1 z rejonami o najczęstszych oddziaływaniach z NO/O₂, przy czym kolory odpowiadają rejonom wskazanym w panelu (A). Dodatkowo zaprezentowano szczegóły ścieżki dyfuzji dla cząsteczek NO/O₂ przez Wejście 1. Pokazane są aminokwasy Wejścia 1 (na niebiesko), kluczowe oddziaływania w miejscu katalitycznym (na pomarańczowo) i aminokwasy katalityczne (na zielono). Źródło: [H5].



Rysunek 13. Pełno-atomowe symulacje MD dla ludzkiego kompleksu 15LOX-2/PEBP1/SA-PE ujawniły funkcjonalne kanały O₂/NO do miejsca katalitycznego LOX. (A). Pokazano aminokwasy kluczowe dla Wejścia 3 (B) i Wejścia 1 (C, miejsce S0 w D). Wejście 2 (A) jest zamknięte przez białko PEBP1 i substrat SA-PE. Cząsteczki NO/O₂ zajmują dwa miejsca wiążące w miejscu katalitycznym w pobliżu substratu (S1 i S2). Źródło: [H6].

W kolejnym kroku zidentyfikowałam specyficzne oddziaływania (Fig. 5-6 oraz Fig. S4 i Tabela S2 w [H6]) i mechanizm aktywacji 15LOX po związaniu z PEBP1, które nie mogłyby być w pełni poznane bez obliczeń opartych na strukturze przestrzennej (Rys. 14). Moje badania ujawniły również dodatkową rolę białka PEBP1, które po interakcji z 15LOX-2 zmienia konformację pętli zlokalizowanej w miejscu wiązania PEBP1/15LOX-2 (Rys. 14A, na pomarańczowo). Skutkuje to zwiększeniem powinowactwa NO do miejsca katalitycznego. W przypadku braku PEBP1, przy niskich stężeniach NO, cząsteczki NO nie były w stanie dotrzeć do miejsca katalitycznego, będąc przyciągane przez wnękę w pobliżu łańcucha sn-2 SA-PE (Rys. 14B-C, Fig. S6-S7 w [H6]). Ta wiedza była szczególnie ważna dla wyjaśnienia wyników eksperymentalnych dotyczących tego zjawiska oraz do wyjaśnienia dlaczego cząsteczki NO hamują ferroptozę w wysokich stężeniach w obecności PEBP1. W ten sposób dodatkowo potwierdzono istotną rolę białka PEBP1 w procesie ferroptozy [H6].



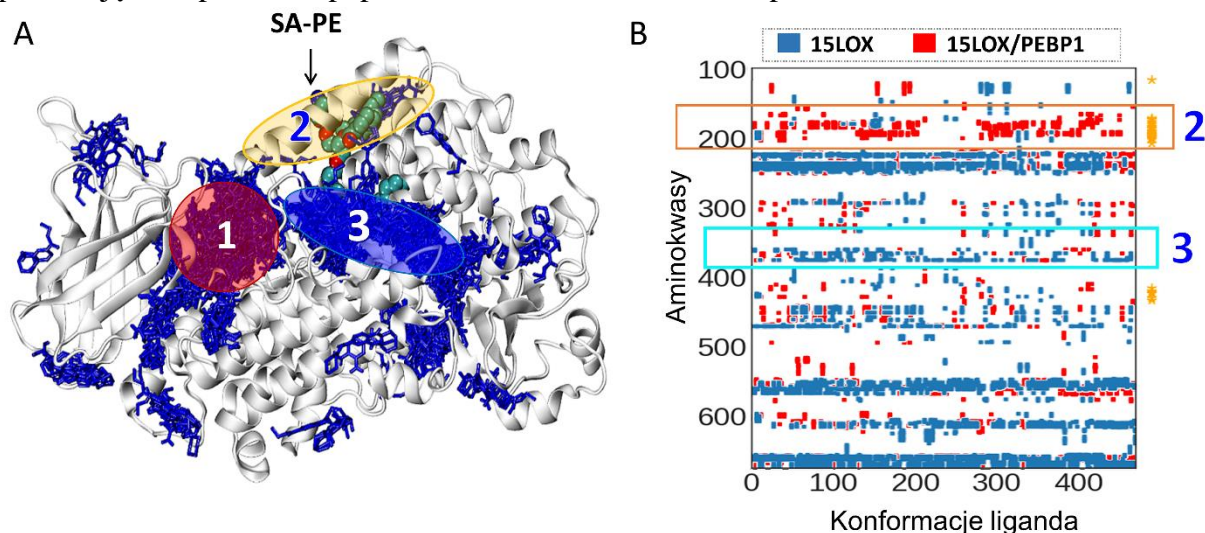
Rysunek 14. Symulacje MD dla kompleksu 15LOX-2/PEBP1 (A) i 15LOX-2 (B) przewidywały zmianę konformacyjną LOX indukowaną po związaniu PEBP1, która umożliwia wiązanie tlenku azotu (NO) do miejsca katalitycznego w obecności SA-PE (C). Źródło: [H6].

Ferostatyna-1 (ii) Ferrostatyna-1 (Fer-1) jest najczęściej stosowanym inhibitorem ferroptozy, wykorzystywanym w ~15-20% wszystkich eksperymentów zgłaszanych w publikacjach. Niektóre badania sugerują, że ten ważny agent antyferroptotyczny jest zarazem słabym inhibitorem 15LOX [113, 130]. Stwierdzenia te powodowały spory wśród naukowców wspierających koncepcję enzymatycznie napędzanej ferroptozy. Sugerowano bowiem, że najprawdopodobniej wolnorodnikowa peroksydacja lipidów (tj. reakcja Fentona, **Rys. 2-3**), a nie enzymatyczna reakcja napędzana LOX (**Rys. 2, Rys. 4**) jest niezbędna do przeprowadzenia procesu ferroptotycznej śmierci komórki.

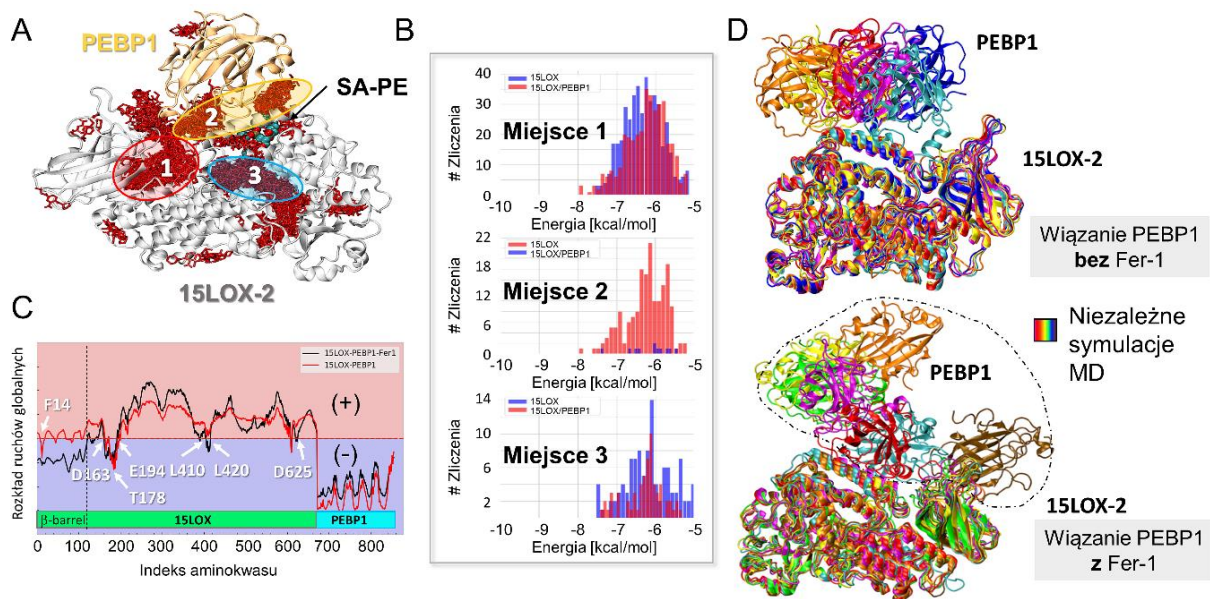
Nasze badania [H7] zweryfikowały ten nierozwiązany paradoks ferroptotycznej śmierci komórki. Paradoks mówiący o tym, że agent antyferroptotyczny, Fer-1, jest słabym inhibitorem 15LOX, tj. do enzymu, który daje największy wkład w produkcję wodoronadtlenków lipidowych. Chcąc wyjaśnić tę zagadkę naukową, najpierw zastosowałam dokowanie molekularne, aby określić miejsca wiązania Fer-1 w strukturze 15LOX-2 w formie związanej/niezwiązanej z białkiem PEBP1. Podejście to pozwoliło nie tylko na określenie

powinowactwa wiązania poszczególnych ligandów (entalpia), ale również ujawniło bardziej korzystne entropowo miejsca kompleksu poprzez wyeksponowanie liczniejszych populacji póż Fer-1 (**Rys. 15A** – niezwiązany 15LOX-2, **Rys. 16A** – związany 15LOX-2). Dodatkowo, podejście to obejmowało liczne konformacje kompleksu białkowego, które zostały pozyskane z wcześniejszych symulacji pełno-atomowych za pomocą PCA (ang. *Principal Component Analysis*) i algorytmu *Mean Shift* [**H7**]. To rozbudowane podejście, bazujące na dokowaniu do wielu konformacji białek (w sumie >900 póż wiążących Fer-1) zostało wykorzystane do wskazania różnic w wiązaniu cząsteczek Fer-1 w obecności PEBP1 (**Rys. 15B**, **Rys. 16B**).

Trzy konformacje Fer-1 o najniższej energii wiązania (największe powinowactwo wiązania, **Rys. 16B**, *Miejsce 2* i *Fig. S4* w [**H7**]) zostały dalej wybrane do symulacji MD. Tym razem układ zawierał kompleks 15LOX-2/Fer-1 oraz białko PEBP1 w dalszej odległości (~10 Å). Miało to na celu sprawdzenie, czy Fer-1 w którejkolwiek z trzech wyznaczonych pozycji wpłynie na wiązanie PEBP1 do 15LOX-2. Analiza ENMs wykazała, że Fer-1 związany w *Miejscu 2* znacząco zmienia ruch allosteryczny, który jest uzyskiwany po związaniu 15LOX z PEBP1 (**Rys. 16C**, profil GNM uwzględniający mod o niskiej częstotliwości), a obszerne dane MD sugerowały, że Fer-1 znacząco wpływa na tworzenie kompleksu PEBP1/15LOX-2 (**Rys. 16D**). PEBP1 przyłączał się do 15LOX-2 do wcześniej określonego miejsca wiązania (**Rys. 9A**) tylko w nieobecności Fer-1 (**Rys. 16D**, *górny panel*), ale nie wtedy, gdy Fer-1 była przyłączona do *Miejscu 2* (**Rys. 16D**, *dolny panel*). Zaobserwowaliśmy dwa wyjątki, gdy PEBP1 związał się w przewidywanym miejscu, ale w tych przypadkach Fer-1 przesunął się z początkowej pozycji wiązania (**Rys. 16D**, *dolny panel*, czerwony i cyjan PEBP1 i *Fig. S4* w [**H7**]). Nasze dane sugerowały, że rzeczywiście Fer-1 nie wpływa na wyizolowany 15LOX, ale skutecznie hamuje produkcję 15-HpETE-PE poprzez zakłócenie tworzenia kompleksu 15LOX/PEBP1.



Rysunek 15. Skłonność do wiązania Fer-1 obserwowana w symulacjach dokowania z niezwiązanym 15LOX. (A) Pozy wiązania Fer-1 (na niebiesko). Trzy miejsca wyróżniają się wysokimi prawdopodobieństwami: Miejsce 1 (różowe koło) – interfejs pomiędzy domeną katalityczną i β -baryłką 15LOX-2, Miejsce 2 (żółta elipsa) – epitop wiążący PEBP1 z 15LOX oraz Miejsce 3 (niebieska elipsa) – miejsce katalityczne/ortosteryczne 15LOX. (B) Mapa oddziaływań aminokwasów 15LOX-2 z Fer-1 obserwowana w dwóch zestawach symulacji dokowania, z formą niezwiązaną (niebieskie kropki) i formą związaną z PEBP1 (czerwone kropki) 15LOX-2. Pomarańczowa ramka oznacza aminokwasy wiążące Fer-1 w Miejscu 2, a cyjanowe pole wskazuje na aminokwasy wiążące w Miejscu 3. Pomarańczowe gwiazdki oznaczają region interfejsu wiążącego PEBP1. Źródło: [**H7**].



Rysunek 16. Wpływ wiązania Fer-1 na dynamikę kompleksu 15LOX-2/PEBP1. (A) Miejsca wiązania Fer-1 (na czerwono). Trzy miejsca, podobnie jak na Rys. 15, są wyróżnione. Szczegółowe interakcje pomiędzy Fer-1 a kompleksem ludzkim pokazano na Rys. 15B (na czerwono). (B) Histogramy z liczbą pól wiążących w każdym miejscu, Miejsce 1-3, dla 15LOX-2 w formie związanej/niezwiązanej z PEBP1. (C) Porównanie dynamiki w GNM kompleksu 15LOX-2/PEBP1 w obecności (czarna krzywa) i braku (czerwona krzywa) Fer-1. Wymienione aminokwasy odpowiadają miejscom zawiasowym. (D) Konformacje końcowe z symulacji MD kompleksu 15LOX-2/PEBP1 bez (górny panel) i z Fer-1 związanym z 15LOX-2 (dolny panel). Kolory rozróżniają konformacje z niezależnych przebiegów MD. Zmodyfikowano z [H7].

Fosfolipaza iPLA2 β (iii) Fosfolipaza A2 (PLA2) to rodzina enzymów, które mogą katalizować rozszczepianie kwasów tłuszczowych poprzez rozpoznawanie łańcucha acylowego sn-2 fosfolipidów i uwalnianie kwasu arachidonowego i kwasu lizofosfatydowego, biologicznie aktywnych mediatorów lipidowych, które mogą wpływać na liczne zdarzenia komórkowe [130]. W pracy [H8] wykazaliśmy, że iPLA2 β (ang. *Ca²⁺-independent phospholipase A2 β*) mogła hydrolizować peroksydowane fosfolipidy SA-PE, 15-HpETE-PE, generowane przez ludzki kompleks 15LOX/PEBP1, a tym samym wyeliminować ferroptotyczny sygnał śmierci i służyć jako tzw. strażnik antyferroptotyczny. Ten alternatywny mechanizm eliminacji 15-HpETE-PE może być szczególnie ważny, gdy napędzana tiolami obrona z wykorzystaniem GPX-4 staje się niewystarczająca (Rys. 5). Próbkę pochodzącą od pacjenta z mutacją związaną z chorobą Parkinsona (PD) (R747W w iPLA2 β), badane przez współpracowników z USA, wykazują selektywnie zmniejszoną aktywność hydrolizy 15-HpETE-PE, akumulację 15-HpETE-PE i zwiększoną wrażliwość na ferroptozę [H8]. W niniejszej pracy przeprowadziłam rozległe modelowanie komputerowe z wykorzystaniem narzędzi obliczeniowej biofizyki molekularnej, które obejmowało pomyślnie wykonanie następujących etapów:

- (i) Pełno-atomowe symulacje MD dla błony ze zróżnicowaną liczbą fosfolipidów (9 typów z dokładnym stosunkiem jak w eksperymentach, patrz *Extended Data Fig. 2* w [H8]) oraz z uwzględnieniem 15-HpETE-PE w celu uzyskania peroksydowanego łańcucha acylowego 15-HpETE-PE wyeksponowanego na powierzchni błony zgodnie z proponowanym modelem Whiskera (*Fig. 1c* w [H8]) [131]. Niestandardowe elementy błonowe, tj. 15-HpETE-PE, wymagały obliczeń kwantowo-chemicznych w celu uzyskania geometrii i ładunków cząstkowych do parametryzacji w polu siłowym CHARMM.

- (ii) Przygotowanie kompletnej struktury dimeru iPLA2 β . Struktura krystalograficzna uzyskana przez naszych współpracowników zawierała nierozpoznane fragmenty. Aby przewidzieć brakujące regiony, przeprowadziłam modelowanie homologiczne przy użyciu różnych dostępnych narzędzi (*Fig. 1d* oraz *Extended Data Fig. 6* w [H7]). Przygotowany model jest dostępny jako *Supplementary Material* pracy [H7] i może być wykorzystany przez innych naukowców.
- (iii) Przeprowadziłam pełno-atomowe symulacje MD w celu zbadania oddziaływań iPLA2 β z błoną i cząsteczkami 15-HpETE-PE (przygotowanymi w (i)). Struktura początkowa przedstawiona jest na *Fig. 1d-e* w [H7], natomiast ostateczne oddziaływania i różnice pomiędzy natywnym iPLA2 β a jej mutantem R747W pokazane są na *Fig. 2* w [H8]. Symulacje obejmowały natywną strukturę iPLA2 β [cała struktura (domena katalityczna z powtórzeniami ankirynowymi) lub domena katalityczna] oraz ich mutanty związane z PD (~0,5-1 mln atomów w układach MD).

Moje symulacje MD uwiaryściły zdolność peroksydowanego łańcucha acylowego 15-HpETE-PE do migracji w obrębie powierzchni błony (po raz pierwszy pokazano tu model *Whisker* dla 15-HpETE-PE) w przeciwieństwie do jego odpowiednika w SA-PE (*Fig. 1c, Ext. Data Fig. 3b* i *Videos 1-3* w [H8]). Oznacza to, że peroksydowany łańcuch 15-HpETE-PE ma większe prawdopodobieństwo przemieszczania się bliżej powierzchni iPLA2 β i miejsca katalitycznego (*Ext. Data Fig. 4a,b* w [H8]). Tłumaczy to obserwowaną doświadczalnie wyższą aktywność iPLA2 β wobec 15-HpETE-PE w porównaniu z SA-PE. Analiza ilościowa wewnętrznej dynamiki SA-PE w jego utlenionej i nieutlenionej formie z wykorzystaniem parametrów rzędu deuteru (ang. *deuterium order parameters*) wykazała większe uporządkowanie w miejscu peroksydacji w 15-HpETE-PE niż w SA-PE (*Ext. Data Fig. 5a,b* w [H8]). Ponadto, symulacje z/bez mutacji R747W dostarczyły szczegółowych informacji o różnicach w oddziaływaniach pomiędzy strukturą białka, a cząsteczkami 15-HpETE-PE (*Ext. Data Fig. 7* w [H8]) oraz o molekularnym wyjaśnieniu obniżonej zdolności katalitycznej R747W iPLA2 β wobec 15-HpETE-PE (*Fig. 2* w [H8]).

Podsumowanie. Publikacje przedstawione jako osiągnięcie habilitacyjne stanowią wspólne dzieło multidyscyplinarnego zespołu naukowców, zarówno biofizyków teoretycznych, jak i eksperymentatorów, posiadających komplementarne i cenne doświadczenie w pracy naukowej. Każda z publikacji [H1-H8] wymagała ogromnego wkładu każdej z grup, jednak w ostatecznym rozrachunku wnosząc przełomowe odkrycia z zakresu ferroptozy. Jako biofizyk obliczeniowy wykorzystywałam metody teoretycznej biofizyki molekularnej do komputerowego modelowania układów biologicznych, często bardzo zaawansowanych i niezbędnych do zrozumienia mechanizmów molekularnych opisywanych w wyżej wspomnianych publikacjach. Moje badania wniosły istotny wkład w zrozumienie molekularnych mechanizmów ferroptozy na poziomie atomowym i zostały wykorzystane do ulepszenia badań eksperymentalnych moich współpracowników. Wszelkie wyniki przedstawione jako osiągnięcie habilitacyjne były ukierunkowane na zrozumienie nieznanych mechanizmów molekularnych programu śmierci komórki w ferroptozie oraz mechanizmów ich hamowania. Jest to bowiem niezbędne do opracowania racjonalnych leków interwencyjnych związanych z ferroptozą. Przedstawione powyżej osiągnięcie zawiera opis zainicjowanych, wykonanych i przeanalizowanych przez kandydatkę obliczeń. W opisie pominięto wyniki uzyskane lub przygotowane przez dr I. Shrivastavę lub dr J. Kriegera, czyli przez innych członków tzw. zespołu obliczeniowego.

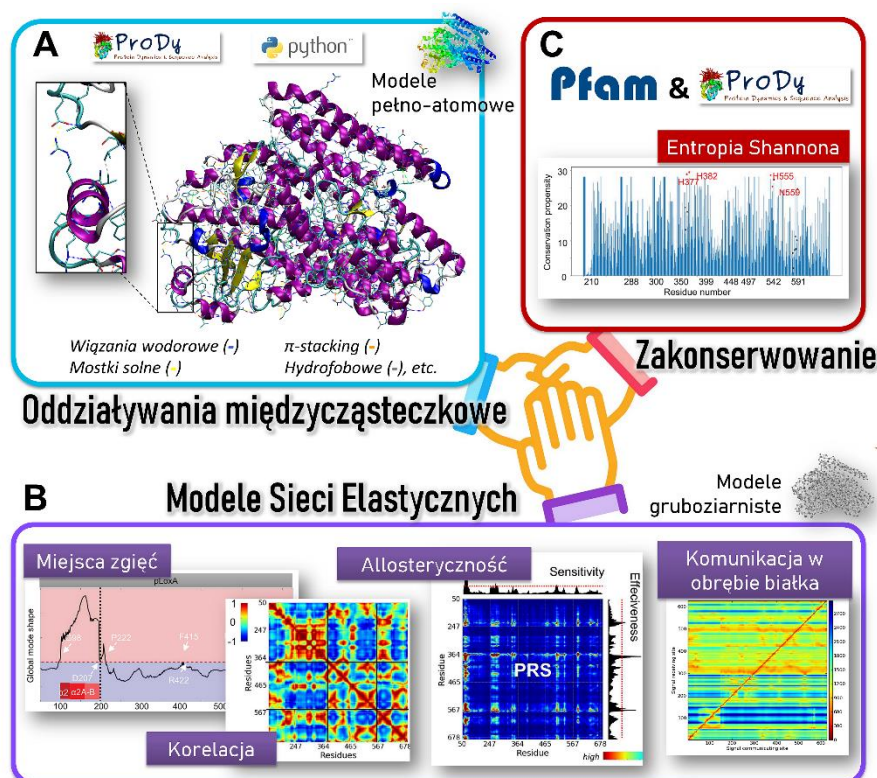
IV. 3.4. Znaczenie osiągnięcia i przyszłe badania

Znaczenie badań. Wyniki uzyskane w przedstawionym osiągnięciu mają istotny wpływ na różne dziedziny i dyscypliny naukowe, w tym biofizykę, biochemię, biologię i medycynę. Świadczy o tym liczba cytowań uzyskanych w krótkim czasie przez każdy artykuł z dorobku habilitacyjnego. Prezentowane wyniki mają szczególne znaczenie dla nauk biomedycznych ze względu na ich związek z różnymi chorobami, m.in. z głównymi chorobami neurodegeneracyjnymi (Parkinson, Alzheimer), sepsą, astmą, nowotworami, patologią mukowiscydozy, zapaleniem płuc, ostrymi urazami mózgu, układu krążenia, wątroby, nerek i innych narządów. Zrozumienie podstaw molekularnych mechanizmów leżących u podstaw procesu ferroptotycznej śmierci komórki jest niezbędne do kontroli tego zjawiska i racjonalnego opracowania leków interwencyjnych, tj. inhibitorów i metod leczenia chorób związanych z ferroptozą. Osiągnięcie to przyniosło znaczące korzyści naukowe w postaci zrozumienia, jak działają mechanizmy maszynerii ferroptozy i jak można je zablokować. Wiedza ta stanowi podstawę i postęp w ogólnych badaniach w tej dziedzinie oraz wskazuje na kluczowe znaczenie biofizyki obliczeniowej w praktycznym wyjaśnianiu fundamentalnego procesu biochemicznego. To osiągnięcie habilitacyjne oferuje dodatkową wiedzę, która może być wykorzystana do zidentyfikowania leków, np. w patologii mukowiscydozy, zapalenia płuc (pLoxA) lub astmy (15LOX/PEBP1). Jakość badań prowadzonych przez nasz zespół jest najwyższa z możliwych, a obliczeniowo habilitantka stosuje metody z najwyższej półki.

Przyszłe badania. Moje obecne i przyszłe badania są skoncentrowane głównie na poznaniu funkcji i znaczenia różnych mediatorów lipidowych w kontekście ferroptozy i innych programów RCD, jak również na rozwoju nowych narzędzi obliczeniowych, które mogą przynieść korzyści społeczności badawczej. Moje plany obejmują:

- (i) **Badanie roli di-arachidonoylu-PE w procesie ferroptozy.** Ten typ PUFA-PL zawiera dwa możliwe do utlenienia łańcuchy (zamiast jednego jak w SA-PE) i ma wysoką specyficzność względem ludzkiego kompleksu 15LOX/PEBP1. Jest to projekt realizowany we współpracy z grupami prof. V. Kagana i prof. H. Bayır z Uniwersytetu w Pittsburghu, który może dostarczyć wyjaśnienie kolejnych brakujących elementów do zrozumienia procesu ferroptozy.
- (ii) **Poszukiwanie nowych inhibitorów pLoxA o wysokim powinowactwie.** Istnieje silne zapotrzebowanie na inhibitory pLoxA o wysokim powinowactwie, które mogą służyć jako środek w patologii mukowiscydozy lub zapalenia płuc. Planuję zbadać dynamikę, selektywność wobec różnych substratów oraz mechanizmy działania pLoxA w celu zaprojektowania nowych inhibitorów. Wniosek o finansowanie, który obejmuje ten temat, został złożony w 2022 roku do Narodowego Centrum Nauki (program SONATA BIS). Będzie on obejmował współpracę pomiędzy grupami prof. V. Kagana, prof. H. Bayır i prof. S. Wenzel (szef Instytutu Astmy w UPMC) z Uniwersytetu w Pittsburghu oraz grupą dr Ganesha Rai z NIH National Center for Advancing Translational Sciences.
- (iii) **Badanie wpływu błony na dynamikę kompleksu 15LOX-1/PEBP1.** Jest to trwający projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (SONATA), w ramach którego zostanie przygotowana praca doktorska mgr Thilibana Manivarmy. W ramach tego projektu badamy wpływ błony lipidowej na ludzki kompleks białkowy 15LOX-1/PEBP1.

- (iv) **Badanie dynamiki cyklooksygenazy-2 i jej specyficzności substratowej.** COX-2 jest enzymem katalizującym konwersję kwasu arachidonowego do prostaglandyny H₂, ważnego prekursora prostacykliny, która ulega ekspresji w stanach zapalnych. Białko to będzie przedmiotem kolejnych badań we współpracy z grupami eksperymentalnymi prof. V. Kagana i prof. H. Bayır. Będziemy badać specyficzność białka wobec różnych lipidów.
- (v) **Interakcje cytochromu *c* z cząsteczkami kardiolipiny i jej różnymi wariantami.** Jest to projekt realizowany we współpracy z prof. I. Bahar ze Stony Brook University (NY, USA) i prof. Patrickiem van der Wel z University of Groningen (Holandia), który dotyczy oddziaływania lipidów z Cyt *c* i jej roli w ciężkich chorobach.
- (vi) **Opracowanie narzędzia komputerowego do oceny wpływu wiązania inhibitorów na dynamikę białka.** Obecnie pracuję nad nowym narzędziem do zaimplementowania w programie ProDy [132], które pomoże oszacować potencjalne oddziaływania międzycząsteczkowe w obrębie struktury białka lub pomiędzy białkiem a ligandem (**Rys. 17A**). Podejście to dostarczy informacji o regionach bogatych w oddziaływania. Informacje te zostaną zestawione z danymi z ENMs (m.in. miejsca zawiasów, miejsca allosteryczne, korelacja krzyżowa i czas propagacji sygnału, **Rys. 17B**) oraz z zakonserwowaniem sekwencji (dane Pfam [133], **Fig. 17C**). Pozwoli to ocenić wpływ miejsca wiązania liganda/białka na dynamikę białka. Konsolidacja tych podejść umożliwi szerszej społeczności badanie fizycznych oddziaływań w obrębie struktur biologicznych w połączeniu z zachowaniem sekwencji i wiedzą ENMs na temat dynamiki kolektywnej. Wiedza ta może być kluczowa przy wyborze najbardziej efektywnego inhibitora i jego miejsca wiązania. Projekt realizowany jest we współpracy z dr J. Kriegerem z Universidad Autónoma de Madrid, Hiszpania oraz prof. I. Bahar z Stony Brook University, NY, USA.



Rysunek 17. Schemat opisujący działanie nowego narzędzia z wykorzystaniem (A) oddziaływań międzycząsteczkowych (B) Modeli Sieci Elastycznych (ENMs) oraz (C) zakonserwowania sekwencji.

IV. 3.5. Inne osiągnięcia naukowe

Przez ostatnie lata byłam zaangażowana w kilka innych projektów naukowych poświęconych badaniom różnym cech białek, m.in. dynamiki, nanomechaniki czy specyficzności substratowej struktur białkowych zaangażowanych w różne choroby. Opisane poniżej tematy (*Temat 1-4*) są stosunkowo odległe tematycznie od osiągnięcia habilitacyjnego, dlatego też nie zostały one włączone do niniejszego osiągnięcia. Niektóre z nich stają się jednak niezależnymi projektami, które zaczynają być równie ważnym polem zainteresowań kandydatki, jak np. rozszyfrowanie mechanizmów innych programów RCD (*Temat 1*) czy opracowanie nowych narzędzi z dziedziny biofizyki obliczeniowej (*Temat 3*).

Temat 1: Mediatory lipidowe w innych programach RCD. W ciągu ostatnich dwóch dekad można było zaobserwować rosnącą liczbę form RCD i ich implikacji w patologii ludzkich chorób. Programy RCD to zazwyczaj wysoce wyspecjalizowane procesy, w których biorą udział silnie ustrukturyzowane kaskady sygnalizacyjne i ściśle określone mechanizmy. Osiągnięcie habilitacyjne koncentruje się na mechanizmie ferroptozy, jednak ja byłam również zaangażowana w badania dwóch innych programów RCD - apoptozy [A1] (współpraca z Prof. P. Wel, Prof. V. Kagan i kilkoma innymi grupami) oraz autofagii [A2] (współpraca z Prof. M. Ardit i Prof. I. Bahar). W tych dwóch niezależnych projektach przeprowadziłam obszernie, pełno-atomowe symulacje MD w obecności błony fosfolipidowej w celu zbadania oddziaływań cytochromu *c* (Cyt *c*) [A1] oraz pro-interleukiny-1 α (IL-1 α) [A2] z kardiolipinami (CL) bądź jej wariantami (np. mono-lyso-CL (MLCL)). Moje modelowanie w badaniach [A1] dostarczyło dowodów na to, że cząsteczki MLCL, akumulujące się w rzadkim zaburzeniu genetycznym zwanym zespołem Bartha, tworzą anomalny kompleks z Cyt *c*, powodując peroksydację PUFA, co może być pierwotnym mechanizmem tego zaburzenia. Pokazałam w tych badaniach, które aminokwasy Cyt *c* są zaangażowane w początkowe i stabilizujące oddziaływania z błoną, jakie zmiany konformacyjne zachodzą w Cyt *c* po związaniu z MLCL oraz w jaki sposób Cyt *c* oddziałuje z inhibitorem IOA (imidazolowy kwas oleinowy). Moje wyniki były zgodne z obserwacjami poczynionymi w eksperymentach lipidomicznych i NMR, które uzyskali moi współpracownicy. W pracy [A2] zidentyfikowałam motyw wiązania pro-IL-1 α z cząsteczkami CL z błony za pomocą symulacji MD. Współpracownicy potwierdzili moje obserwacje za pomocą mutagenety. Ponadto, podobny motyw wiążący CL zidentyfikowałam w białku LC3 β (ang. *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*), centralnym białku w autofagii, poprzez nałożenie sekwencji obu białek. Można zatem przypuszczać, że wiązanie pro-IL-1 α z CL może zakłócać mitofagię zależną od kompleksu CL-LC3 β . Jest to ważnym odkryciem pozwalającym na lepsze zrozumienie chorób związanych z inflammasomem NLRP3.

Temat 2: Nanomechanika białek modułowych z wykorzystaniem podejścia opartego na indukowanej sile. Większość białek ma ściśle określoną strukturę natywną. Modyfikacje ich składu lub konformacji mogą prowadzić do poważnych chorób. Jednak natywna struktura niektórych białek często w sposób naturalny ulega znaczącym zmianom konformacyjnym, na przykład w wyniku działania naprężeń mechanicznych. W takich przypadkach stabilność mechaniczna odgrywa istotną rolę i bezpośrednio wpływa na wiele procesów biologicznych, np. pracę mięśni czy translokację cząsteczek przez błonę komórkową. Mechanizmy te są uwarunkowane specyficznymi miejscami i sposobem oddziaływania sił zewnętrznych na

białka. To wyjaśnia duże zainteresowanie metodami badania właściwości nanomechanicznych pojedynczych molekuł jakie miało miejsce w ostatnich latach. Moje badania wykorzystywały dwie komplementarne metody, obliczeniową (sterowana dynamika molekularna, SMD) i eksperymentalną (spektroskopia sił pojedynczych cząsteczek, SMFS, AFM). Obie wprowadzają do badanego układu białkowego siłę zewnętrzną. Ma to na celu uzyskanie profilu widma siłowego białka ukazującego jego zachowanie mechaniczne. Moje umiejętności na tym polu, zdobyte podczas studiów doktoranckich, wykorzystano do wyodrębnienia charakterystyki ścieżek rozkładu białek, siły potrzebnej do wywołania zmiany konformacyjnej w każdej domenie białka, itp. Przedmiotem tych badań były dwa białka modularne: kontaktyna 4 [A4] i reelina [A3] (część eksperymentalną dla reeliny wykonał dr J. Strzelecki UMK).

Temat 3: Rozwój nowych metod i ich zastosowanie do struktur białek. Pomimo biofizycznych i biochemicznych aspektów mojej pracy naukowej, byłam również zaangażowana w projekty rozwijające nowe narzędzia i metody obliczeniowe do analizy dynamiki białek [A4-A6]. Ponieważ miałam doświadczenie w eksperymentalnej i obliczeniowej spektroskopii sił (metoda sterowanej MD i technika SMFS opisana w *Temacie 2*), moim pierwszym zadaniem jako post-doca w grupie prof. I. Bahar było zaimplementowanie do pakietu ProDy (wprowadzonego przez Bahar Lab w 2011 roku, <http://prody.csb.pitt.edu/>, >2,3 mln pobrań) nowego modułu o nazwie *MechStiff* służącego do wyznaczania słabych i silnych par oddziaływań w zależności od kierunku siły zewnętrznej i miejsc poddawanych perturbacjom. *MechStiff* wykorzystuje gruboziarnistą koncepcję ANM i pomaga w identyfikacji anizotropowej odpowiedzi struktury na perturbacje zewnętrzne. Po utworzeniu *MechStiff* wykorzystałam to narzędzie do uzyskania informacji o składzie efektywnej stałej sprężystości w obecności siły zewnętrznej dla każdej domeny kontaktyny 4 [A4]. Byłam również zaangażowana w projekt wprowadzający moduł *CryoDy*, który oblicza dynamikę kompleksów białkowych uzyskanych metodą cryo-EM poprzez aproksymację map gęstości pseudo-atomami [A5]. Moim zadaniem były obliczenia ANM różnych struktur cryo-EM białka opiekuńczego TRiC/CCT, które były przedmiotem tego projektu. Zaangażowanie w rozwój modułów ProDy zostało podsumowane w pracy [A6], gdzie przedstawiliśmy nowe moduły/metody zaimplementowane w ProDy w ciągu ostatnich dziesięciu lat.

Temat 4: Badania nad repelentami komarów. Komary są jednymi z najgroźniejszych zwierząt na Ziemi. Przenoszą bowiem choroby, które zabijają blisko milion osób rocznie, będąc tym samym jedną z głównych przyczyn ludzkiej śmiertelności. Podstawową ochroną przed komarami są repelenty, czyli związki chemiczne, które odstraszały owady, głównie poprzez oddziaływanie na ich niezwykle wrażliwy zmysł węchu. Najczęściej stosowane środki chemiczne zawierające DEET stopniowo tracą swoją aktywność ze względu na postępującą odporność komarów. W związku z tym istnieje potrzeba stworzenia nowych strategii walki z nimi. Receptory muskarynowe to rodzina transmembranowych receptorów sprzężonych z białkami G (GPCRs), która odgrywa istotną rolę w układach nerwowych ludzi i komarów [134, 135]. W tym projekcie przeprowadzałam symulacje dokowania molekularnego, aby przewidzieć prawdopodobne miejsca wiązania DEET w receptorach acetylocholinyl M1 i M3 w miejscach allosterycznych i ortostatycznych (*Fig. 4D-E* i *Fig. 5* w [A7], a szczegóły w *Tabeli S4*). Informacje te zostały następnie wykorzystane do przetestowania różnego typu repelentów i porównania ich miejsc wiązania i powinowactwa (*Fig. 4, Fig. 7* oraz *Fig. S1* w [A8]).

Referencje

Artykuły wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego

- [H1] *PEBP1 warden ferroptosis by enabling lipoxygenase generation of lipid death signals*, S. Wenzel, Y. Tyurina, J. Zhao, C. Croix, H. Dar, G. Mao, V. Tyurin, T. Anthonyuthu, A. Kapralov, A. Amoscato, **K. Mikulska-Ruminska**, I. Shrivastava, E. Kenny, Q. Yang, J. Rosenbaum, L. Sparvero, D. Emler, X. Wen, Y. Minami, F. Qu, S. Watkins, T. Holman, A. VanDemark, J. Kellum, I. Bahar, H. Bayir, V. Kagan, *Cell*, 171 (2017) 628-641.
- [H2] *Empowerment of 15-Lipoxygenase Catalytic Competence in Selective Oxidation of Membrane ETE-PE to Ferroptotic Death Signals, HpETE-PE*, T. Anthonyuthu, E. Kenny, I. Shrivastava, Y. Tyurina, Z. Hier, H. Ting, H. Dar, V. A. Tyurin, A. Nesterova, A. Amoscato, **K. Mikulska-Ruminska**, J. Rosenbaum, G. Mao, J. Zhao, M. Conrad, J. Kellum, S. Wenzel, A. VanDemark, I. Bahar, V. Kagan, H. Bayir, *J. Am. Chem. Soc.*, 140 (2018) 17835-17839.
- [H3] *Pseudomonas aeruginosa utilizes host polyunsaturated phosphatidylethanolamines to trigger theft-ferroptosis in bronchial epithelium*, H. Dar, Y. Tyurina, **K. Mikulska-Ruminska**, I. Shrivastava, H. Ting, V. Tyurin, J. Krieger, C. Croix, S. Watkins, E. Bayir, G. Mao, C. Armbruster, A. Kapralov, H. Wang, M. Parsek, T. Anthonyuthu, A. Ogunsoola, B. Flitter, C. Freedman, J. Gaston, T. Holman, J. Pilewski, J. Greenberger, R. Mallampalli, Y. Doi, J. Lee, I. Bahar, J. Bomberger, H. Bayir, V. Kagan, *J. Clin. Invest.*, 128 (2018) 4639-4653.
- [H4] *Characterization of Differential Dynamics, Specificity, and Allostery of Lipoxygenase Family Members*, **K. Mikulska-Ruminska**, I. Shrivastava, J. Krieger, S. Zhang, H. Li, H. Bayir, S. Wenzel, A. VanDemark, V. Kagan, I. Bahar, *J. Chem. Inform. Model.*, 59 (2019) 2496-2508.
- [H5] *Redox Lipid Reprogramming Commands Susceptibility of Macrophages and Microglia to Ferroptotic Death*, A. Kapralov, Q. Yang, H. Dar, Y. Tyurina, T. Anthonyuthu, R. Kim, C. Croix, **K. Mikulska-Ruminska**, B. Liu, I. Shrivastava, V. Tyurin, H. Ting, Y. Gao, R. Domingues, D. Stoyanovsky, R. Mallampalli, I. Bahar, D. Gabilovich, H. Bayir, V. Kagan, *Nature Chem. Biol.*, 3 (2020) 278-290.
- [H6] *NO[•] Represses the Oxygenation of Arachidonoyl PE by 15LOX/PEBP1: Mechanism and Role in Ferroptosis*, **K. Mikulska-Ruminska**, T. Anthonyuthu, A. Levkina, I. Shrivastava, A. Kapralov, H. Bayir, V. Kagan, I. Bahar, *Inter. J. Mol. Sci.*, 22 (2021) 5253.
- [H7] *Resolving the paradox of ferroptotic cell death: Ferrostatin-1 binds to 15LOX/PEBP1 complex, suppresses generation of Peroxidized ETE-PE, and protects against ferroptosis*, T. Anthonyuthu, Y. Tyurina, W. Sun, **K. Mikulska-Ruminska**, I. Shrivastava, V. Tyurin, F. Cinemre, H. Dar, A. VanDemark, T. Holman, Y. Sadosky, B. Stockwell, R. He, I. Bahar, H. Bayir, V. Kagan, *Redox Biol.*, 38 (2021) 101744.
- [H8] *Phospholipase iPLA2b Averts Ferroptosis by Eliminating Death Signal, 15HpETE-PE: Relevance to Parkinson's Disease*, W. Sun, V. Tyurin, **K. Mikulska-Ruminska**, I. Shrivastava, B. Liu, Y. Zhai, M. Pan, H. Gong, D. Lu, J. Sun, W. Duan, S. Korolev, A. Abramov, P. Angelova, I. Miller, O. Beharier, G. Mao, H. Dar, A. Kapralov, T. Hastings, J. Greenamyre, C. Chu, Y. Sadosky, I. Bahar, H. Bayir, Y. Tyurina, R. He, V. Kagan, *Nature Chem. Biol.*, 17 (2021) 1-12.

Warto zauważyć, że powyższe badania realizują podejście interdyscyplinarne i stanowią wspólne dzieło multidyscyplinarnego zespołu naukowców o komplementarnej wiedzy z zakresu biofizyki strukturalnej, biochemii, krystalografii, modelowania obliczeniowego, spektroskopii mas, lipidomiki, obrazowania, biologii komórki, angażując przy tym >10 instytucji z Uniwersytetu w Pittsburghu, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Szpitala UPMC oraz kilka sporadycznych kolaboracji nad poszczególnymi partiami projektu, np. współpraca z prof. Brentem Stockwellem – naukowcem, który w 2012 roku po raz pierwszy zaproponował koncepcję ferroptozy.

Inne prace kandydatki

- [A1] *Recruitment of pro-IL-1 α to Mitochondrial Cardiolipin, via shared LC3 Binding Domain, Drives Nlrp3 Activation and Inhibits Mitophagy*, J. Dagvadorj, **K. Mikulska-Ruminska**, G. Tumurkhuu, R. Ratsimandresy, J. Carriere, A. Andres, Y. Song, S. Chen, M. Lane, A. Dorfleutner, R. Gottlieb, C. Stehlik, S. Cassel, F. Sutterwala, I. Bahar, T. Crother, M. Arditì, *Proc. Nat. Acad. Sci. (PNAS)*, 118 (2021).
- [A2] *Anomalous peroxidase is the primary pathogenic target in Barth syndrome*, V. Kagan, Y. Tyurina, **K. Mikulska-Ruminska**, D. Damschroder, A. Lasorsa, A. Kapralov, V. Tyurin, A. Amoscato, S. Samovich, H. Dar, A. Ramim, P. Lazcano, J. Ji, M. Schmidtke, G. Vladimirov, M. Artyukhova, P. Rampratap, L. Cole, A. Niyatie, E. Baker, J. Peterson, G. Hatch, J. Atkinson, B. Kühn, R. Wessells, P. Wel, I. Bahar, H. Bayir, M. Greenberg, *Nature Metabolism* (2022, during major revision).
- [A3] *Dynamics, nanomechanics and signal transduction in reelin repeats*, **K. Mikulska-Ruminska**, J. Strzelecki, W. Nowak, *Sci. Rep.*, 9 (2019) 1-13.
- [A4] *Nanomechanical unfolding scenarios of multidomain neuronal cell adhesion protein contactin revealed by single molecule AFM and SMD*, **K. Mikulska-Ruminska**, A. Kulik, C. Benadiba, I. Bahar, G. Dietler, W. Nowak, *Sci. Rep.*, 7 (2017) 8852.
- [A5] *Sequential Allosteric Dynamics of Chaperonin TRiC/CCT Elucidated by Network Analysis of Cryo-EM Maps*, Y. Zhang, J. Krieger, **K. Mikulska-Ruminska**, B. Kaynak, C. Sorzano, J. Carazo, A. Horovitz, J. Xing, I. Bahar, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 160 (2020) 104-120.
- [A6] *ProDy 2.0: Increased scale and scope after 10 years of protein dynamics modelling with Python*, S. Zhang, J. Krieger, Y. Zhang, C. Kaya, B. Kaynak, **K. Mikulska-Ruminska**, P. Doruker, H. Li, I. Bahar, *Bioinformatics* (2021) 1-3, DOI: 10.1093/bioinformatics/btab18
- [A7] *The repellent DEET potentiates carbamate effects via insect muscarinic receptor interactions: An alternative strategy to control insect vector-borne diseases*, A. Abdella, M. Stankiewicz, **K. Mikulska**, W. Nowak, C. Pannetier, M. Goulu, C. Fruchart-Gaillard, P. Licznar, V. Apaire-Marchais, O. List, V. Corbel, D. Servent, B. Lapied, *PLOS ONE*, 10 (2015) e0126406.
- [A8] *Orthosteric muscarinic receptor activation by the insect repellent IR3535 opens new prospects in insecticide-based vector control*, E. Moreau, **K. Mikulska-Ruminska**, M. Goulu, S. Perrier, C. Deshayes, M. Stankiewicz, V. Apaire-Marchais, W. Nowak, B. Lapied, *Sci. Rep.*, 10 (2020) 1-15.

Referencje innych autorów

1. Santoro, M.M., *The antioxidant role of non-mitochondrial CoQ10: mystery solved!* Cell metabolism, 2020. **31**(1): p. 13-15.
2. Li, J., et al., *Ferroptosis: past, present and future*. Cell death & disease, 2020. **11**(2): p. 1-13.
3. Bianconi, E., et al., *An estimation of the number of cells in the human body*. Annals of human biology, 2013. **40**(6): p. 463-471.
4. Lobo, N.A., et al., *The biology of cancer stem cells*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2007. **23**: p. 675-699.
5. Harley, C.B., et al. *Telomerase, cell immortality, and cancer*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1994. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
6. Kim-Campbell, N., H. Gomez, and H. Bayir, *Cell death pathways: apoptosis and regulated necrosis*, in *Critical care nephrology*. 2019, Elsevier. p. 113-121. e2.
7. Galluzzi, L., et al., *Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015*. Cell Death & Differentiation, 2015. **22**(1): p. 58-73.
8. Cao, J.Y. and S.J. Dixon, *Mechanisms of ferroptosis*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016. **73**(11): p. 2195-2209.
9. Gao, M., et al., *Ferroptosis is an autophagic cell death process*. Cell research, 2016. **26**(9): p. 1021-1032.
10. Capelletti, M.M., et al., *Ferroptosis in liver diseases: an overview*. International journal of molecular sciences, 2020. **21**(14): p. 4908.
11. Dixon, S.J., et al., *Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death*. Cell, 2012. **149**(5): p. 1060-1072.

12. Tang, D., et al., *Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications*. Cell research, 2021. **31**(2): p. 107-125.
13. Bao, W.-D., et al., *Loss of ferroportin induces memory impairment by promoting ferroptosis in Alzheimer's disease*. Cell Death & Differentiation, 2021. **28**(5): p. 1548-1562.
14. Yan, N. and J. Zhang, *Iron metabolism, ferroptosis, and the links with Alzheimer's disease*. Frontiers in neuroscience, 2020. **13**: p. 1443.
15. Guiney, S.J., et al., *Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease*. Neurochemistry international, 2017. **104**: p. 34-48.
16. Sun, W.-Y., et al., *Phospholipase iPLA 2 β averts ferroptosis by eliminating a redox lipid death signal*. Nature Chem. Biol., 2021: p. 1-12.
17. Yang, W.S. and B.R. Stockwell, *Ferroptosis: death by lipid peroxidation*. Trends in cell biology, 2016. **26**(3): p. 165-176.
18. Miotto, G., et al., *Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1*. Redox Biol., 2020. **28**: p. 101328.
19. Lu, B., et al., *The role of ferroptosis in cancer development and treatment response*. Front. Pharmacol., 2018. **8**: p. 992.
20. Xu, T., et al., *Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy*. Journal of cellular and molecular medicine, 2019. **23**(8): p. 4900-4912.
21. Shen, Z., et al., *Emerging strategies of cancer therapy based on ferroptosis*. Advanced Materials, 2018. **30**(12): p. 1704007.
22. Liang, C., et al., *Recent progress in ferroptosis inducers for cancer therapy*. Advanced materials, 2019. **31**(51): p. 1904197.
23. Yang, M. and C.L. Lai, *SARS-CoV-2 infection: can ferroptosis be a potential treatment target for multiple organ involvement?* Cell death discovery, 2020. **6**(1): p. 1-6.
24. Fratta Pasini, A.M., et al., *Is Ferroptosis a Key Component of the Process Leading to Multiorgan Damage in COVID-19?* Antioxidants, 2021. **10**(11): p. 1677.
25. Tavakol, S. and A.M. Seifalian, *Vitamin E at a high dose as an anti-ferroptosis drug and not just a supplement for COVID-19 treatment*. Biotechnology and applied biochemistry, 2021.
26. Singh, Y., et al., *SARS CoV-2 aggravates cellular metabolism mediated complications in COVID-19 infection*. Dermatologic therapy, 2020. **33**(6): p. e13871.
27. Wenzel, S.E., et al., *PEBP1 Wardens Ferroptosis by Enabling Lipoyxygenase Generation of Lipid Death Signals*. Cell, 2017. **171**(3): p. 628-641. e26.
28. Stockwell, B.R., et al., *Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease*. Cell, 2017. **171**(2): p. 273-285.
29. Conrad, M., et al., *Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species*. Genes & development, 2018. **32**(9-10): p. 602-619.
30. Konstorum, A., et al., *Systems biology of ferroptosis: A modeling approach*. Journal of theoretical biology, 2020. **493**: p. 110222.
31. Yang, W.S., et al., *Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(34): p. E4966-E4975.
32. Gill, I. and R. Valivety, *Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications*. Trends in biotechnology, 1997. **15**(10): p. 401-409.
33. Bazinet, R.P. and S. Layé, *Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease*. Nature Reviews Neuroscience, 2014. **15**(12): p. 771-785.
34. Porter, N.A., et al., *The autoxidation of arachidonic acid: formation of the proposed SRS-A intermediate*. Biochemical and biophysical research communications, 1979. **89**(4): p. 1058-1064.
35. Rouzer, C.A. and L.J. Marnett, *Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases*. Chemical reviews, 2003. **103**(6): p. 2239-2304.
36. Yan, H.-f., et al., *Ferroptosis: mechanisms and links with diseases*. Signal transduction and targeted therapy, 2021. **6**(1): p. 1-16.
37. Piperno, A., S. Pelucchi, and R. Mariani, *Inherited iron overload disorders*. Translational gastroenterology and hepatology, 2020. **5**.
38. Han, C., et al., *Ferroptosis and its potential role in human diseases*. Frontiers in pharmacology, 2020. **11**: p. 239.
39. Forcina, G.C. and S.J. Dixon, *GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis*. Proteomics, 2019. **19**(18): p. 1800311.

40. Winterbourn, C.C., *Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction*. Toxicology letters, 1995. **82**: p. 969-974.
41. Hassannia, B., P. Vandennebeele, and T.V. Berghe, *Targeting ferroptosis to iron out cancer*. Cancer cell, 2019. **35**(6): p. 830-849.
42. Knutson, M.D., *Steap proteins: implications for iron and copper metabolism*. Nutrition reviews, 2007. **65**(7): p. 335-340.
43. Sun, X., et al., *HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death*. Oncogene, 2015. **34**(45): p. 5617-5625.
44. Kerins, M.J. and A. Ooi, *The roles of NRF2 in modulating cellular iron homeostasis*. Antioxidants & redox signaling, 2018. **29**(17): p. 1756-1773.
45. Bellelli, R., et al., *NCOA4 deficiency impairs systemic iron homeostasis*. Cell reports, 2016. **14**(3): p. 411-421.
46. Straub, K.L., M. Benz, and B. Schink, *Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH*. FEMS microbiology ecology, 2001. **34**(3): p. 181-186.
47. Feig, A.L. and S.J. Lippard, *Reactions of non-heme iron (II) centers with dioxygen in biology and chemistry*. Chemical Reviews, 1994. **94**(3): p. 759-805.
48. Aisen, P., C. Enns, and M. Wessling-Resnick, *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2001. **33**(10): p. 940-959.
49. Reichert, C.O., et al., *Ferroptosis mechanisms involved in neurodegenerative diseases*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(22): p. 8765.
50. Shintoku, R., et al., *Lipoxygenase-mediated generation of lipid peroxides enhances ferroptosis induced by erastin and RSL3*. Cancer science, 2017. **108**(11): p. 2187-2194.
51. Singh, N.K. and G.N. Rao, *Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies*. Progress in lipid research, 2019. **73**: p. 28-45.
52. Ackermann, J.A., et al., *The double-edged role of 12/15-lipoxygenase during inflammation and immunity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2017. **1862**(4): p. 371-381.
53. Saura, P., et al., *Computational insight into the catalytic implication of head/tail-first orientation of arachidonic acid in human 5-lipoxygenase: consequences for the positional specificity of oxygenation*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2016. **18**(33): p. 23017-23035.
54. Kagan, V.E., et al., *Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis*. Nature Chem. Biol., 2017. **13**(1): p. 81-90.
55. Kuhn, H., S. Banthiya, and K. Van Leyen, *Mammalian lipoxygenases and their biological relevance*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2015. **1851**(4): p. 308-330.
56. Ou, Y., et al., *Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(44): p. E6806-E6812.
57. Green, D.R., et al., *Immunogenic and tolerogenic cell death*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(5): p. 353-363.
58. Green, D.R., L. Galluzzi, and G. Kroemer, *Metabolic control of cell death*. Science, 2014. **345**(6203): p. 1250256.
59. Ursini, F., et al., *Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1982. **710**(2): p. 197-211.
60. Ursini, F., M. Maiorino, and C. Gregolin, *The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1985. **839**(1): p. 62-70.
61. Margis, R., et al., *Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview*. The FEBS journal, 2008. **275**(15): p. 3959-3970.
62. Brigelius-Flohé, R. and M. Maiorino, *Glutathione peroxidases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013. **1830**(5): p. 3289-3303.
63. Wu, G., et al., *Glutathione metabolism and its implications for health*. The Journal of nutrition, 2004. **134**(3): p. 489-492.
64. Carlberg, I. and B. Mannervik, *[59] Glutathione reductase*, in *Methods in enzymology*. 1985, Elsevier. p. 484-490.
65. Dolphin, D., R. Poulson, and O. Avramovic, *Glutathione: chemical, biochemical, and medical aspects*. Vol. 3. 1989: Wiley New York.

66. Wu, X., et al., *Ferroptosis as a novel therapeutic target for cardiovascular disease*. *Theranostics*, 2021. **11**(7): p. 3052.
67. Halprin, K.M. and A. Ohkawara, *The measurement of glutathione in human epidermis using glutathione reductase*. *J. Invest. Dermatol*, 1967. **48**(2): p. 149.
68. Pastore, A., et al., *Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects*. *Clinical chemistry*, 2001. **47**(8): p. 1467-1469.
69. Dong, X., et al., *Global Characteristics and Trends in Research on Ferroptosis: A Data-Driven Bibliometric Study*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022. **2022**.
70. Bersuker, K., et al., *The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis*. *Nature*, 2019: p. 1-1.
71. Doll, S., et al., *FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor*. *Nature*, 2019: p. 1-1.
72. Crane, F.L., *Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function*. *Mitochondrion*, 2007. **7**: p. S2-S7.
73. Frei, B., M.C. Kim, and B.N. Ames, *Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. **87**(12): p. 4879-4883.
74. Becker, O.M., et al., *Computational biochemistry and biophysics*. 2001: CRC Press.
75. Samish, I., P.E. Bourne, and R.J. Najmanovich, *Achievements and challenges in structural bioinformatics and computational biophysics*. *Bioinformatics*, 2015. **31**(1): p. 146-150.
76. Pagadala, N.S., K. Syed, and J. Tuszynski, *Software for molecular docking: a review*. *Biophysical reviews*, 2017. **9**(2): p. 91-102.
77. Yuriev, E. and P.A. Ramsland, *Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review*. *Journal of Molecular Recognition*, 2013. **26**(5): p. 215-239.
78. Koes, D.R., M.P. Baumgartner, and C.J. Camacho, *Lessons learned in empirical scoring with smina from the CSAR 2011 benchmarking exercise*. *J. Chem. Inf. Mod.*, 2013. **53**(8): p. 1893-1904.
79. Tovchigrechko, A. and I.A. Vakser, *GRAMM-X public web server for protein–protein docking*. *Nucl Acids Res*, 2006. **34**: p. W310-W314.
80. Warshel, A. and M. Levitt, *Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme*. *Journal of molecular biology*, 1976. **103**(2): p. 227-249.
81. McCammon, J.A., B.R. Gelin, and M. Karplus, *Dynamics of folded proteins*. *Nature*, 1977. **267**: p. 585-590.
82. Hospital, A., et al., *Molecular dynamics simulations: advances and applications*. *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*, 2015. **8**: p. 37.
83. Karplus, M. and G.A. Petsko, *Molecular dynamics simulations in biology*. *Nature*, 1990. **347**(6294): p. 631-639.
84. Berman, H.M., et al., *The protein data bank*. *Nucl. Aci. Res.*, 2000. **28**(1): p. 235-242.
85. Durrant, J.D. and J.A. McCammon, *Molecular dynamics simulations and drug discovery*. *BMC biology*, 2011. **9**(1): p. 71.
86. Verlet, L., *Computer" experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules*. *Physical review*, 1967. **159**(1): p. 98.
87. Karplus, M. and J.A. McCammon, *Molecular dynamics simulations of biomolecules*. *Nature Struct. Mol. Biol.*, 2002. **9**(9): p. 646-652.
88. Allen, M.P., *Introduction to molecular dynamics simulation*. *Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins*, 2004. **23**: p. 1-28.
89. Kundu, S., et al., *Dynamics of proteins in crystals: comparison of experiment with simple models*. *Biophysical journal*, 2002. **83**(2): p. 723-732.
90. Tama, F. and Y.-H. Sanejouand, *Conformational change of proteins arising from normal mode calculations*. *Protein engineering*, 2001. **14**(1): p. 1-6.
91. Herguedas, B., et al., *Structure and organization of heteromeric AMPA-type glutamate receptors*. *Science*, 2016. **352**(6285): p. aad3873.
92. Kmiecik, S., et al., *Modeling of protein structural flexibility and large-scale dynamics: Coarse-grained simulations and elastic network models*. *International journal of molecular sciences*, 2018. **19**(11): p. 3496.
93. Yang, L., G. Song, and R.L. Jernigan, *How well can we understand large-scale protein motions using normal modes of elastic network models?* *Biophysical journal*, 2007. **93**(3): p. 920-929.

94. Atilgan, A., et al., *Anisotropy of fluctuation dynamics of proteins with an elastic network model*. Biophys. J., 2001. **80**(1): p. 505-515.
95. Bahar, I., A.R. Atilgan, and B. Erman, *Direct evaluation of thermal fluctuations in proteins using a single-parameter harmonic potential*. Folding and Design, 1997. **2**(3): p. 173-181.
96. Atilgan, A., et al., *Anisotropy of fluctuation dynamics of proteins with an elastic network model*. Biophysical Journal, 2001. **80**(1): p. 505-515.
97. Flory, P.J., *Statistical thermodynamics of random networks*. Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences, 1976. **351**(1666): p. 351-380.
98. Rouse Jr, P.E., *A theory of the linear viscoelastic properties of dilute solutions of coiling polymers*. The Journal of Chemical Physics, 1953. **21**(7): p. 1272-1280.
99. Eyal, E., L.-W. Yang, and I. Bahar, *Anisotropic network model: systematic evaluation and a new web interface*. Bioinformatics, 2006. **22**(21): p. 2619-2627.
100. Haliloglu, T., I. Bahar, and B. Erman, *Gaussian dynamics of folded proteins*. Phys. Rev. Lett., 1997. **79**(16): p. 3090.
101. Cui, Q. and I. Bahar, *Normal mode analysis: theory and applications to biological and chemical systems*. 2005: CRC press.
102. Yang, L., G. Song, and R.L. Jernigan, *Protein elastic network models and the ranges of cooperativity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(30): p. 12347-12352.
103. Fuglebakk, E., S.P. Tiwari, and N. Reuter, *Comparing the intrinsic dynamics of multiple protein structures using elastic network models*. Bioch. Biophys. Acta, 2015. **1850**(5): p. 911-922.
104. Thorpe, M., *Comment on elastic network models and proteins*. Physical biology, 2007. **4**(1): p. 60.
105. Eyal, E. and I. Bahar, *Toward a molecular understanding of the anisotropic response of proteins to external forces: insights from elastic network models*. Biophys. J., 2008. **94**(9): p. 3424-3435.
106. Ikeguchi, M., et al., *Protein structural change upon ligand binding: linear response theory*. Phys. Rev. Lett., 2005. **94**(7): p. 078102.
107. Atilgan, C., et al., *Manipulation of conformational change in proteins by single-residue perturbations*. Biophys. J., 2010. **99**(3): p. 933-943.
108. Atilgan, C. and A.R. Atilgan, *Perturbation-response scanning reveals ligand entry-exit mechanisms of ferric binding protein*. PLoS Comput. Biol., 2009. **5**: p. e1000544.
109. Verkhivker, G.M., *Dynamics-based community analysis and perturbation response scanning of allosteric interaction networks in the TRAP1 chaperone structures dissect molecular linkage between conformational asymmetry and sequential ATP hydrolysis*. Bioch. Biophys. Acta 2018. **1866**(8): p. 899-912.
110. Zhang, S., et al., *Shared signature dynamics tempered by local fluctuations enables fold adaptability and specificity*. Molecular biology and evolution, 2019. **36**(9): p. 2053-2068.
111. Bakan, A., et al., *Evol and ProDy for bridging protein sequence evolution and structural dynamics*. Bioinformatics, 2014. **30**(18): p. 2681-2683.
112. Bakan, A., L.M. Meireles, and I. Bahar, *ProDy: protein dynamics inferred from theory and experiments*. Bioinformatics, 2011. **27**(11): p. 1575-1577.
113. Zilka, O., et al., *On the mechanism of cytoprotection by ferrostatin-1 and liproxstatin-1 and the role of lipid peroxidation in ferroptotic cell death*. ACS central science, 2017. **3**(3): p. 232-243.
114. Shah, R., M.S. Shchepinoy, and D.A. Pratt, *Resolving the role of lipoxygenases in the initiation and execution of ferroptosis*. ACS Cent. Sci., 2018. **4**(3): p. 387-396.
115. Lamade, A.M., et al., *Inactivation of RIP3 kinase sensitizes to 15LOX/PEBP1-mediated ferroptotic death*. Redox Biol., 2022. **50**: p. 102232.
116. Jones, R. and L. Hall, *A 23 kDa protein from rat sperm plasma membranes shows sequence similarity and phospholipid binding properties to a bovine brain cytosolic protein*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1991. **1080**(1): p. 78-82.
117. Shemon, A.N., et al., *Characterization of the Raf kinase inhibitory protein (RKIP) binding pocket: NMR-based screening identifies small-molecule ligands*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10479.
118. Atmanene, C., et al., *Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry*. Med. Sci. Monitor, 2009. **15**(7): p. BR178-BR187.
119. Noh, H.S., et al., *PEBP1, a RAF kinase inhibitory protein, negatively regulates starvation-induced autophagy by direct interaction with LC3*. Autophagy, 2016. **12**(11): p. 2183-2196.
120. Kuhn, H., M. Walther, and R.J. Kuban, *Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases: structure, function, and biological implications*. Prostaglandins Other Lip. Mediat., 2002. **68**: p. 263-290.

121. Oliw, E.H., *Plant and fungal lipoxygenases*. Prostaglandins & other lipid mediators, 2002. **68**: p. 313-323.
122. Hansen, J., et al., *Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach*. Applied Microbiol. Biotech., 2013. **97**(11): p. 4737-4747.
123. Horn, T., et al., *Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling*. Progress in lipid research, 2015. **57**: p. 13-39.
124. Stover, C.K., et al., *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. Nature, 2000. **406**(6799): p. 959-964.
125. Tacconelli, E., et al., *Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis*. Lancet Infect. Dis., 2018. **18**(3): p. 318-327.
126. De Boeck, K., *Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face*. Acta paediatrica, 2020. **109**(5): p. 893-899.
127. Finn, R.D., et al., *The Pfam protein families database: towards a more sustainable future*. Nucl. Aci. Res., 2015. **44**(D1): p. D279-D285.
128. Yang, L.-W. and I. Bahar, *Coupling between catalytic site and collective dynamics: a requirement for mechanochemical activity of enzymes*. Structure, 2005. **13**(6): p. 893-904.
129. Cinelli, M.A., et al., *Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition*. Medicinal research reviews, 2020. **40**(1): p. 158-189.
130. Lei, X., S.E. Barbour, and S. Ramanadham, *Group VIA Ca²⁺-independent phospholipase A2 (iPLA2 β) and its role in β -cell programmed cell death*. Biochimie, 2010. **92**(6): p. 627-637.
131. Greenberg, M.E., et al., *The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(4): p. 2385-2396.
132. Zhang, S., et al., *ProDy 2.0: Increased Scale and Scope after 10 Years of Protein Dynamics Modelling with Python*. Bioinformatics, 2021.
133. Finn, R.D., et al., *The Pfam protein families database: towards a more sustainable future*. Nuc. Aci. Res., 2015. **44**(D1): p. D279-D285.
134. Rosenbaum, D.M., et al., *GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β 2-adrenergic receptor function*. Science, 2007. **318**(5854): p. 1266-1273.
135. Hanlon, C.D. and D.J. Andrew, *Outside-in signaling—a brief review of GPCR signaling with a focus on the Drosophila GPCR family*. J. Cell Sci., 2015. **128**(19): p. 3533-3542.

V. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Moja działalność naukowa za granicą prowadzona była zarówno na uczelniach amerykańskich, jak i europejskich:

- *Postdoctoral associate* w *School of Medicine* na Uniwersytecie w Pittsburghu (USA) w grupie prof. Ivet Bahar przez 30 miesięcy, od stycznia 2016 r.
- *Assistant-doctorant* w *Laboratory of Physics of Living Matter, École Polytechnique Fédérale de Lausanne* (EPFL) w grupie prof. Giovanniego Dietlera przez 6 miesięcy, od września 2013 (w trakcie studiów doktoranckich).

Działalność ta dotyczyła badań i publikacji, które wchodziły w skład osiągnięcia habilitacyjnego omówionego w punkcie IV.2.2 oraz części dotyczącej innych badań przedstawionych w punkcie IV.2.3.

Współpracuję z naukowcami z różnych uczelni (USA i Europa):

- Grupa prof. Valeriana Kagana, Department of Environmental and Occupational Health and Center for Free Radical and Antioxidant Health, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA
- Grupa prof. Hülya Bayır, Department of Critical Care Medicine, Safar Center for Resuscitation Research, Children's Neuroscience Institute, Children's Hospital of Pittsburgh, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA.

- Prof. Ivet Bahar, Laufer Center for Physical and Quantitative Biology, Stony Brook University, New York, USA.
- Grupa Patricka van der Wel, Zernike Institute for Advanced Materials, University of Groningen, Groningen, Holandia.
- Grupa Prof. Sally Wenzel, Department of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA.
- Grupa Prof. Andy VanDemark, Department of Biological Science, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA.
- Grupa Prof. Moshe Arditi, Department of Biomedical Sciences and Department of Pediatrics, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, USA.
- Grupa prof. Bruno Lapieda, Laboratoire Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et des Récepteurs (SiFCIR), Université d'Anger, Francja.
- Dr James M. Krieger, Polytechnic School at Universidad Autónoma de Madrid, Hiszpania.

VI. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.

VI.1. Dydaktyka

W minionych latach prowadziłam zajęcia z następujących przedmiotów:

	<i>Zajęcia</i>	<i>Rok</i>
	<i>Analiza matematyczna 1</i>	2018/2019
	<i>Analiza matematyczna 2</i>	2018/2019
	<i>Podstawy programowania 1</i>	2018/2019
	<i>Podstawy programowania 2</i>	2018/2019
	<i>Wstęp do systemu Unix (ćwiczenia i wykład)</i>	2018/2019 (2 grupy)
		2015/2016 (2 grupy)
	<i>Kurs komputerowy Biopython</i>	2015/2016
	<i>Dynamika molekularna</i>	2015/2016

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

	<i>Języki programowania (język programowania C)</i>	2013/2014 (2 grupy)
	<i>Systemy symboliczne (ćwiczenia i wykład)</i>	2013/2014
	<i>Pracownia komputerowa III – Unix i Internet</i>	2012/2013 (2 grupy)
		2011/2012
		2010/2011
	<i>Fizyka przetwarzania informacji (asystentura przy wykładzie)</i>	2011/2012
	<i>Pracownia komputerowa I – Podstawy obsługi komputera</i>	2010/2011
	<i>Metody dynamiki molekularnej – Komputerowe modelowanie biocząsteczek</i>	2009/2010
	<i>Fizyka elementarna – dla obsady zajęć</i>	2009/2010

Od października 2020 roku pracuję na stanowisku naukowym finansowanym z grantu SONATA15 z Narodowego Centrum Nauki, dlatego też aktualnie nie prowadzę zajęć dydaktycznych. Wcześniej odbywając staż podoktorski na Uniwersytecie w Pittsburghu nie była zobligowana do prowadzenia zajęć ze studentami. Dodatkowo miałam trzy przerwy spowodowane urlopami macierzyńskimi.

Kilkakrotnie prowadziłam warsztaty naukowe z zakresu biofizyki/bioinformatyki dla uczestników (w języku angielskim):

- *Computational Biophysics Workshop* organizowany przez członków *Theoretical and Computational Biophysics Group* z University of Illinois at Urbana-Champaign (UIUC) oraz *National Center for Multiscale Modeling of Biological Systems* (MMBioS) z Uniwersytetu w Pittsburghu. Łącznie trzykrotnie w 2016, 2017 i 2018 roku (Pittsburgh, USA).
- Konferencji *Bioinformatics in Toruniu (BIT) 2010 oraz 2011*. *BIT* organizowany jest przez Polskie Towarzystwo Bioinformatyczne (PTBI) oraz Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.
- Warsztatów dla studentów i doktorantów międzynarodowych w programie Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej SPINAKER – Intensywne Programy Edukacji Międzynarodowej, 12-14 lipca 2022 (Toruń, Polska) – 2 grupy, po 3 godziny szkolenia.

Nadzorowanie prac dyplomowych na UMK:

- Jestem opiekunem pomocniczym następujących doktorantów:
 - Mgr Thiliban Manivarma (od 2020 r., w toku)
 - Mgr Beata Niklas (2018-2020 r.)
- Jestem opiekunem studentów studiów magisterskich:
 - Inż. Radosław Siwiński (od 2022 r., w toku)
- Jestem/byłam opiekunem studentów studiów licencjackich czy inżynierskich:
 - Mateusz Czarnecki (od 2020 r., w toku)
 - Mateusz Mních (od 2020 r., w toku)
 - Mariusz Konstanty (2022 r.)

W związku z trzykrotnym urlopem macierzyńskim (2014/15, 2017/18, 2019/20) oraz 2,5-letnim stażem podoktorskim nie mogłam być promotorem prac dyplomowych przed 2020 r.

VI.2. Organizacja

- Pomoc w organizacji oraz nauczanie na międzynarodowych warsztatach *Computational Biophysics Workshop at Pittsburgh* (2016-2018, 3 razy, Pittsburgh, USA)
- Pomoc w organizacji i koordynacji konferencji międzynarodowych:
 - *Bioinformatics in Torun* (Toruń, Poland) organizowanej przez Polskie Towarzystwo Bioinformatyczne (PTBI) i Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, w latach 2009-2022 (6 razy, 60-100 uczestników każdego roku).
 - *13th annual conference in bioinformatics SocBiN* (26-29 VI 2013, Toruń, Polska).
- Byłam przewodniczącą Wydziałowej Doktoranckiej Komisji Stypendialnej na WFAiIS UMK (2011-2013, przed uzyskanie stopnia doktora).

VI.3. Popularyzacja nauki

Współprowadziłam wykłady i warsztaty:

- Wykład inauguracyjny dla studentów Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki UMK (październik 2015).
- Festiwal Nauki i Sztuki w Toruniu ["Wirtualna podróż wewnątrz ciała czyli eksploracja nanostruktur biologicznych" (2009), "Sekrety fluorescencji czyli skąd się biorą świecące króliki (2010) oraz warsztaty komputerowe "Piękno molekularnych

mechanizmów natury czyli jak działa biomaszyna ciała" (2011) i współprowadzenie wykładu "Świetlne cuda natury czyli tajemnice fluorescencji białek"].

- Toruńska Noc Naukowców (wykład "OCT – tomograf optyczny człowieka")
- Przed uzyskaniem stopnia doktora współorganizowałam i uczestniczyłam w licznych akcjach popularyzatorskich np. w prowadzeniu pokazów fizycznych dla setek uczniów szkół podstawowych i gimnazjalnych, m.in. w akcjach edukacyjnych "Powrót do szkoły", Lekcjach Pokazowych Fizyki realizowanych w ramach projektu Gimnazjalna Akademia Nauk dla subregionu konińskiego, Gimnazjalnej Akademii Nauk, "Otwórz oczy, włącz myślenie", pokazach Polskiego Towarzystwa Fizycznego itp.

Więcej o popularyzacji nauki można znaleźć w punkcie II.3 w *Wykazie osiągnięć naukowych*.

VII. Inne istotne informacje.

Pod uzyskaniem stopnia doktora odbyłam trzy urlopy macierzyńskie/wychowawcze, które trwały po ok. 9-12 miesięcy przy każdym dziecku (daty urodzenia: X 2014, IX 2017, X 2019).

.....
(podpis wnioskodawcy)