



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

dr hab. inż. Jacek Czub
Katedra Chemii Fizycznej
Politechnika Gdańska
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
tel. +48 535970599
e-mail: jacek.czub@pg.edu.pl

Gdańsk, 13.04.2023

RECENZJA

**osiągnięć naukowych oraz całokształtu dorobku pani doktor Karoliny Mikulskiej-Rumińskiej
w związku z postępowaniem o nadanie jej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk
ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki fizyczne**

Niniejszą recenzję przygotowałem w odpowiedzi na pismo prof. dr. hab. Ireneusza Grabowskiego, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, informujące mnie o powołaniu przez tę Radę na recenzenta w postępowaniu o nadania stopnia doktora habilitowanego pani doktor Karolinie Mikulskiej-Rumińskiej. Recenzja została przygotowana zgodnie z ustawą „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dn. 20 lipca 2018 (z późniejszymi zmianami), na podstawie dołączonej do w/w pisma dokumentacji przedłożonej przez Habilitantkę, spełniającej wedle mojej oceny wymogi formalne ustawy.

Pani dr Karolina Mikulska-Rumińska ukończyła studia magisterskie na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika (UMK) w Toruniu, gdzie w 2009 r. uzyskała tytuł magistra fizyki ze specjalnością Fizyka medyczna. Stopień doktora nauk fizycznych uzyskała w 2014 r. w tej samej instytucji, broniąc z wyróżnieniem rozprawy pt. *„Badanie nanomechaniki adhezyjnych białek neuronalnych metodami sterowanej dynamiki molekularnej i spektroskopii sił pojedynczych cząsteczek”*, przygotowanej pod kierunkiem prof. Wiesława Nowaka. W roku 2013 zatrudniła się na swoim macierzystym Wydziale, pracując początkowo jako asystent naukowo-dydaktyczny a od 2019 jako adiunkt. W latach 2016–2018 odbyła staż doktorski w zespole kierowanym przez prof. Ivet Bahar (School of Medicine, University of Pittsburgh).

Zainteresowania naukowe Habilitantki koncentrują się na badaniu układów biomolekularnych z wykorzystaniem metod biofizyki obliczeniowej, w tym symulacji dynamiki molekularnej (MD), technik opartych na modelach sieci elastycznych oraz dokowania molekularnego. W szczególności zajmuje się ona badaniem mikroskopowych mechanizmów leżących u podstaw zjawiska ferroptozy, czyli jednego z poznanych rodzajów programowanej śmierci komórkowej, który jest zależny od żelaza i charakteryzuje się nagromadzeniem nadtlenków lipidów. Badania te, zapoczątkowane w ramach stażu doktorskiego, prowadzi w ścisłej współpracy z zespołami doświadczalnymi kierowanymi przez prof. V. Kagana (University of Pittsburgh), światowy autorytet w dziedzinie biologii

wolnych rodników, a także prof. H Bayir ze Szpitala Dziecięcego w Pittsburghu. Ponadto pani Mikulska-Rumińska prowadziła także szereg innych badań nad układami o znaczeniu biologicznym, dotyczących między innymi roli białka IL-1 α w regulowanej śmierci komórki, podstaw choroby genetycznej określanej jako zespół Bartha, właściwości mechanicznych wybranych białek oraz sygnalizacji allosterycznej w obrębie białek opiekuńczych. W ramach swojej współpracy z zespołem prof. Bahar była także zaangażowana w rozwój narzędzia obliczeniowego ProDy będącego pakietem do analizy dynamiki strukturalnej białek opartym na modelach sieci elastycznych i technikach analizy głównych składowych oraz analizy modów normalnych.

Od czasu uzyskania stopnia doktora do złożenia wniosku Habilitantka opublikowała 15 artykułów w czasopismach z listy JCR, z czego 8 stanowi osiągnięcie naukowe przedłożone jako podstawa wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Wiele z tych publikacji ukazało się w czołowych czasopismach kierowanych do szerokiej społeczności naukowych, takich jak *Cell*, *J. Am. Chem. Soc.*, *Nat. Chem. Biol.* czy *Proc. Natl. Acad. Sci.*, co wskazuje na zaawansowany charakter prowadzonych badań oraz ich duży walor innowacyjności. Publikacje pani dr Mikulskiej-Rumińskiej były do momentu składania wniosku cytowane 836 razy (nie wliczając autocytowań, dane z Web of Science), zaś jej indeks Hirscha wynosi 12. Przełomowa w dziedzinie ferroptozy interdyscyplinarna praca opublikowana w *Cell* w 2017 roku została już do tej pory zacytowana ponad 400 razy, co świadczy o dużym znaczeniu tych badań dla nauk biologicznych i medycznych. Na podstawie deklaracji dotyczących wkładu pracy, które znajdują potwierdzenie także w oświadczeniach współautorów, można stwierdzić, że w większości swoich najważniejszych prac Habilitantka była odpowiedzialna za część obliczeniową szerzej zakrojonych badań biologicznych. Habilitantka zaprezentowała 16 referatów na konferencjach międzynarodowych i krajowych, a także wygłosiła 4 wykłady na zaproszenie na konferencjach i spotkaniach w Polsce oraz 6 seminariów na zaproszenie, głównie w University of Pittsburgh. W mojej ocenie przytoczone powyżej dane naukometyczne oraz znaczący i dobrze zdefiniowany udział w interdyscyplinarnych badaniach jednoznacznie sytuują dorobek naukowy Habilitantki wśród najlepszych na tym etapie kariery naukowej.

Jako osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego pani dr Karolina Mikulska-Rumińska przedłożyła cykl ośmiu publikacji zatytułowany: „*Rozszyfrowanie maszynerii molekularnej, oddziaływań fizycznych, transdukcji sygnału oraz inhibicji procesu ferroptozy*”. Ten jednotematyczny cykl poświęcony jest badaniu wybranych aspektów ferroptozy ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów działania kluczowych enzymów zaangażowanych w ten proces oraz potencjalnych sposobów jego inhibicji. Jak to szczegółowo i przystępnie opisuje Habilitantka we wstępie do swojego osiągnięcia, ferroptozą to niedawno odkryty wariant programowanej

śmierci komórkowej, w którym dochodzi do akumulacji nadtlenków lipidów a w konsekwencji do rozległych uszkodzeń błon fosfolipidowych. Za enzymatyczny szlak peroksydacji lipidów odpowiadają zawierające nie-hemowe żelazo enzymy z klasy lipooksygenaz (LOX), których substratami są przede wszystkim wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA), zarówno wolne jak i występujące jako łańcuchy acylowe w cząsteczkach lipidów błonowych. Uważa się, że ferroptoza odgrywa istotną rolę w stanach patologicznych wielu narządów, chorobach neurodegeneracyjnych a nawet chorobach infekcyjnych. Adekwatnie do tego znaczenia zainteresowanie procesem ferroptozy w literaturze światowej stale wzrasta.

Spośród ośmiu wieloautorskich prac przedłożonych jako cykl habilitacyjny siedem stanowi owoc wieloaspektowej współpracy doświadczalno-teoretycznej. Jak to jasno wynika z oświadczeń o szczegółowych udziałach, zarówno dołączonych do wniosku, jak i zdefiniowanych w artykułach, w pracach tych Habilitantka była odpowiedzialna za określoną część badań teoretycznych, biorąc udział w ich konceptualizacji i wykonaniu. Ze względu na dominującą rolę doświadczenia w biologii, tylko w jednej z tych siedmiu interdyscyplinarnych prac (H6, *Int. J. Mol. Sci.*) Habilitantka zajmuje pierwsze miejsce na liście autorów i jest jedną z dwóch autorek korespondujących. Nie pomniejsza to jednak znaczenia uzyskanych przez nią wyników, które dostarczyły molekularnej interpretacji pomiarów doświadczalnych a także posłużyły jako punkt wyjścia do dalszych eksperymentów. Jedna z przedłożonych prac (H4, *J. Chem. Inf. Model.*) ma charakter czysto obliczeniowy, a w jej powstaniu Habilitantka miała wiodący udział, odpowiadając za koncepcję i realizację badań, opracowanie i wizualizację wyników, a także napisanie wstępnego tekstu pracy. Znajduje to także odzwierciedlenie na liście autorów, gdzie Habilitantka jest wymieniona jako pierwsza autorka oraz jako jedna z dwóch autorek korespondujących (razem z I. Bahar, jej przełożoną w trakcie stażu podoktorskiego). Wszystkie prace składające się na osiągnięcie habilitacyjne zostały opublikowane w renomowanych czasopiśmie recenzowanych (w tym tak prominentnych jak wspomniane wyżej *Cell*, *JACS* i *Nat. Chem. Biol.*), zatem poddane zostały bardzo skrupulatnej i rygorystycznej ocenie merytorycznej przez niezależnych ekspertów. Znacząca liczba ich cytowań w literaturze przedmiotowej świadczy o tym, że wywołały także pozytywny odzew wśród społeczności naukowej.

Pierwsze cztery prace cyklu habilitacyjnego (H1–H4) dotyczą mechanizmów działania enzymów z klasy lipooksygenaz, odgrywających – jak wspomniałem – kluczową rolę w enzymatycznej peroksydacji lipidów w procesie ferroptozy. W pierwszej publikacji (H1, *Cell*) badacze przedstawili przełomowe odkrycie polegające na wykazaniu kluczowej roli białka PEBP1 (ang. *Phosphatidylethanolamine-binding protein 1*) w procesie ferroptozy. W ramach obliczeniowej części badań Habilitantka zaproponowała strukturę kompleksu, jaki białko to tworzy z lipooksygenazą 15LOX, wykorzystując w tym celu dokowanie białko-

białko. Na podstawie przewidzianej struktury wytypowała reszty PEBP1 odpowiedzialne za stabilizację kompleksu, co zostało później potwierdzone poprzez eksperymentalną mutagenezę. Wykorzystanie modeli sieci elastycznych oraz dokowania molekularnego pozwoliło z kolei Habilitantce na zaproponowanie w jaki sposób białko PEBP1 modyfikuje aktywność enzymatyczną 15LOX poprzez wpływ na jego globalną dynamikę oraz preferencję względem wolnych lub zestryfikowanych substratów typu PUFA.

W drugiej pracy cyklu (H2, *JACS*) autorzy kontynuowali wątek zaskakującej selektywności kompleksu 15LOX/PEBP1 względem konkretnego typu lipidu błonowego (wielonienasycona fosfatydyloetanolamina). W ramach części obliczeniowej, Habilitantka testowała hipotezę, wedle której za tę specyficzność substratową odpowiada allosteryczny wpływ efektora PEBP1 na kieszeń wiążącą substraty białka 15LOX. W tym celu wykorzystwała modele sieci elastycznych, które oparte są na statycznej geometrii białka bądź lokalnej krzywiznie hiperpowierzchni energii potencjalnej. Taki wybór rodzi pytanie, czy Habilitantka rozważała zastosowanie bardziej wyrafinowanych metod badania komunikacji allosterycznej, bazujących na próbkowaniu przestrzeni konfiguracyjnej. W ciągu ostatnich lat społeczność biofizyków obliczeniowych dopracowała się szeregu takich technik wykorzystujących m.in. formalizm teorii informacji (entropia transferu, informacja wzajemna) oraz uczenie maszynowe.

Artykuł H3 dotyczył wyjaśnienia, w jaki sposób homolog ludzkiej lipooksygenazy 15LOX pochodzący z patogena bakteryjnego *P. aureginosa*, białko pLoxA, może wywoływać ferroptozę w ludzkich komórkach nabłonkowych bez udziału PEBP1. Poprzez porównanie sekwencji i struktury obu homologów Habilitantka wskazała, które elementy strukturalne białka mogą być kluczowe dla zachowania aktywności peryoksydacyjnej względem wielonienasyconych fosfatydyloetanolamin. Zidentyfikowała także w obrębie białka pLoxA dodatkowe helisy, które – jak wykazała analiza z wykorzystaniem sieci elastycznych – mogą pełnić rolę podobną do PEBP1 w przypadku ludzkiego 15LOX.

Ściśle obliczeniowa praca H4, w której powstaniu Habilitantka miała przewodnią rolę, stanowi niejako kontynuację badań podjętych w H3. Wykorzystując szereg zaawansowanych metod opartych na modelach sieci elastycznych oraz 88 dostępnych struktur krystalicznych, Habilitantka porównała w niej właściwości strukturalne i dynamiczne enzymów z rodziny lipooksygenaz. Warto odnotować, że zastosowaną w pracy metodę badania wytrzymałości mechanicznej białek Habilitantka sama zaimplementowała w programie ProDy. Badania wykazały szereg podobieństw i różnic we właściwościach lipooksygenaz pochodzących z organizmów reprezentujących różne gałęzie drzewa życia oraz wskazały na rejony i kanały dostępowe dla substratów potencjalnie ważne dla aktywności katalitycznej.

W serii artykułów H5–H8 pani dr Mikulska-Rumińska wraz ze współpracownikami eksplorowała możliwości kontroli procesu ferroptozy, jako procesu potencjalnie

odgrywającego dużą rolę w etiologii licznych chorób. W zbliżonych tematycznie pracach H5 i H6 badacze pokazali, że zmniejszona odporność na ferroptozę makrofagów układu immunologicznego wynika z obniżonego poziomu tlenu azotu(II), charakterystycznego dla określonych stanów patologicznych (H5), a następnie analizowali molekularne mechanizmy tej zależności (H6). Pełnoatomowe symulacje MD przeprowadzone przez Habilitantkę w ramach tego programu badawczego dostarczyły molekularnej interpretacji obserwowanych zjawisk. W szczególności wskazały, że cząsteczki tlenu azotu są dostarczane do miejsca katalitycznego 15LOX-2 poprzez kanał tlenowy i konkurują o miejsce wiązania z tlenem. Symulacje ujawniły także, m.in., że związanie białka PEBP1 do lipooksygenazy 15LOX może zwiększać jej powinowactwo do tlenu azotu.

Praca uwzględniona w cyklu habilitacyjnym jako H7 poświęcona była wyjaśnieniu tzw. paradoksu ferroptotycznej śmierci komórek, czyli obserwacji, że związek ferostatyna, będący inhibitorem ferroptozy, działa jako wydajny zmiatacz rodników, ale nie hamuje aktywności 15LOX, co z kolei mogłoby sugerować, że ta lipooksygenaza nie odgrywa ważnej roli w ferroptozie. Badacze wykazali mianowicie, że o ile ferostatyna rzeczywiście nie wpływa na działanie izolowanej 15LOX, to skutecznie hamuje działanie kompleksu 15LOX/PEBP1. Potwierdza to ważną rolę enzymatycznego szlaku peroksydacji w ferroptozie. Na podstawie dokowania molekularnego i pełnoatomowych symulacji MD Habilitantka zaproponowała, że ferostatyna wiąże się z kompleksem 15LOX/PEBP1 w trzech miejscach i może zakłócać niskoczęstotliwościowe mody kompleksu 15LOX/PEBP1 ważne dla jego aktywności peroksydacyjnej.

W ostatniej pracy przedłożonego osiągnięcia autorzy pokazali, że fosfolipaza iPLA2 β może zapobiegać ferroptozie poprzez hydrolizę sygnałnych nadtlenuków, podczas gdy jej inaktywacja uwrażliwia komórki na ferroptozę. iPLA2 β działa zatem jako tzw. strażnik antyferroptotyczny. W części obliczeniowej pracy Habilitantka zademonstrowała istotne różnice w sposobie oddziaływania z substratem pomiędzy iPLA2 β a jej mutantem R747W o niższej aktywności względem nadtlenuków. Dodatkowo, przeprowadzone symulacje MD wykazały, że peroksydowane łańcuchy acylowe lipidów są, średnio rzecz biorąc, ulokowane bliżej powierzchni błony, gdzie są eksponowane do centrum katalitycznego fosfolipazy (tzw. model *Whisker*).

Podsumowując, uważam, że osiągnięcie naukowe pani dr Mikulskiej, które zostało mi przedstawione do oceny, jest fascynującym, starannie zrealizowanym i logicznie powiązanim cyklem publikacji, który dostarczył przełomowych informacji dotyczących mechanizmów ferroptotycznej śmierci komórki oraz sposobów jej kontroli i hamowania. Stanowiąc integralną część multidyscyplinarnego programu badawczego, symulacje komputerowe oraz inne obliczenia z dziedziny biofizyki molekularnej i bioinformatyki zrealizowane przez Habilitantkę pozwoliły na interpretację wyników doświadczeń w kontekście struktury i dynamiki białek oraz lipidów zaangażowanych w proces ferroptozy. Bez tej interpretacji

wyniki doświadczalne byłyby niepełne i miały raczej charakter opisowy niż mechanistyczny. Nie mam zatem żadnych wątpliwości co do istotnego wkładu, jaki badania Habilitantki wniosły w rozwój szeroko pojętych nauk fizycznych, dlatego jej wniosek o przyznanie stopnia doktora habilitowanego jest według mnie w pełni uzasadniony.

Należy także podkreślić, że pani dr Mikulska-Rumińska była zaangażowana w szereg innych interesujących działań badawczych niewłączonych w skład osiągnięcia habilitacyjnego. Na potrzeby tych badań nawiązała on wiele wartościowych współprac naukowych z uznanymi uczonymi w Polsce i za granicą. Wymienić można w tym miejscu m.in., prace nad działaniem mediatorów lipidowych w innych wariantach programowanej śmierci komórkowej (współpraca z zespołami prof. van der Wel, University of Groningen, Prof. Arditi, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, USA oraz ze wspomnianymi wyżej zespołami w University of Pittsburgh); nad nanomechaniką białek modułowych oraz repelentami komarów (współpraca z prof. W. Nowakiem i dr. J. Strzeleckim, UMK). Wartym odnotowania jest fakt, że aż 14 z 15 artykułów opublikowanych przez Habilitantkę po otrzymaniu stopnia doktora powstało we współpracy międzynarodowej. Nie ma zatem dla mnie żadnych wątpliwości, że pani dr Mikulska-Rumińska spełnia ustawowy wymóg „wykazywania się istotną aktywnością naukową” realizowaną w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej.

Pani dr Mikulska-Rumińska potrafi efektywnie pozyskiwać środki na realizację badań naukowych ze źródeł zewnętrznych. Mimo 2,5-letniego stażu podoktorskiego oraz trzech odbytych w latach 2014–2020 urlopów macierzyńskich zdobyła na potrzeby swoich badań dwa granty naukowe – Preludium (2013, przed doktoratem) oraz Sonata (2020), z którego to źródła sfinansowane było jej zatrudnienie na UMK od 2020 na stanowisku naukowym. W trakcie stażu podoktorskiego wraz z prof. Bahar uzyskała także roczny grant obliczeniowy na komputerze Anton udostępnionym przez firmę D.E. Shaw Research. Była także wykonawczynią w szeregu innych projektów badawczych w Polsce i za granicą, przede wszystkim o charakterze podstawowym, ale również aplikacyjnym (m.in. współpraca z firmą farmaceutyczną Shire).

Habilitantka zrecenzowała 19 manuskryptów publikacji naukowych nadesłanych do redakcji czasopism międzynarodowych. Aktywnie uczestniczyła też w organizacji kilku warsztatów i szkół naukowych w Polsce i USA. Za swoją działalność naukową otrzymała także wiele wyróżnień, w tym prestiżową nagrodę w międzynarodowym programie L'Oréal-UNESCO *For Women in Science* oraz nagrodę naukową im. Stefana Pieńkowskiego Wydziału III Nauk Ścisłych i Nauk o Ziemi Polskiej Akademii Nauk (PAN).

Wysoko ocenić należy także dorobek dydaktyczny i popularyzatorski pani dr Mikulskiej-Rumińskiej. Mimo przerw w działalności dydaktycznej spowodowanych stażem podoktorskim, urlopami macierzyńskimi oraz zatrudnieniem na stanowisku naukowym

prowadziła on ze studentami zajęcia m.in., z „Analizy matematycznej”, „Podstaw programowania” oraz z przedmiotów specjalistycznych z zakresu biofizyki obliczeniowej. Od roku 2018 Habilitantka sprawowała opiekę merytoryczną nad realizacją dwóch prac doktorskich na UMK (jako promotor pomocniczy). Obecnie pod jej opieką naukową powstaje na UMK jedna praca magisterska i trzy inżynierskie. Habilitantka angażowała się także w działania popularyzujące naukę poprzez autorstwo artykułów o charakterze popularnym oraz udzielenie szeregu wywiadów w ogólnopolskich i lokalnych mediach.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawione mi do oceny osiągnięcie naukowe pani dr Karoliny Mikulskiej-Rumińskiej, jakim jest cykl przełomowych publikacji na temat molekularnych podstaw procesu ferroptozy, stanowi znaczny wkład w rozwój nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne. Realizując swoje badania teoretyczne we współpracy z zespołami doświadczalnymi z czołowych instytucji naukowych, Habilitantka zdobyła uznanie międzynarodowej społeczności badaczy i zdobyła kwalifikacje oraz umiejętności niezbędne do prowadzenia samodzielnej działalności naukowo-badawczej. Wobec spełnienia wymogów określonych w art. 219. ust 1 ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.), popieram wniosek pani dr Mikulskiej-Rumińskiej o nadanie jej stopnia doktora habilitowanego i wnoszę o dopuszczenie jej do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

Jacek Czub

