

dr hab. Piotr Setny  
Centrum Nowych Technologii  
Uniwersytetu Warszawskiego  
ul. Banacha 2c, 02-097 Warszawa

## **Ocena osiągnięcia naukowego doktor nauk fizycznych Karoliny Anny Mikulskiej-Rumińskiej w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego**

### **Sylwetka Habilitantki**

Pani doktor Karolina Mikulska-Rumińska uzyskała tytuł magistra fizyki w 2009 roku na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (UMK). Na tym samym wydziale w 2014 roku obroniła z wyróżnieniem rozprawę doktorską, której promotorem był prof. Wiesław Nowak. Poruszana tematyka obejmowała właściwości mechaniczne białek adhezyjnych, a badania prowadzone były w oparciu o symulacje dynamiki molekularnej i mikroskopię sił atomowych. Od 2013 roku Habilitantka pozostaje zatrudniona na UMK, obecnie zajmując stanowisko adiunkta. W latach 2016 – 2018 odbyła staż podoktorski w grupie prof. Ivet Bahar na Uniwersytecie Pittsburskim.

Zainteresowania badawcze pani dr Mikulskiej-Rumińskiej dotyczą podstaw fizycznych funkcjonowania wybranych układów biomolekularnych. Jej prace opierają się o wykorzystanie metod bioinformatyki i biofizyki obliczeniowej do analizy właściwości mechanicznych i dynamicznych badanych białek, efektów allosterycznych oraz mechanizmów kształtowania specyficzności substratowej. Główna część badań poświęcona jest białkom biorącym udział w przemianach lipidów, w szczególności związanych z procesem ferroptozy. Inne wątki dotyczą białek adhezyjnych oraz receptorów muskarynowych w kontekście ich oddziaływania z repelentami owadów. Odrębnym kierunkiem jest udział w rozwijaniu metod opartych o zastosowanie modeli sieci elastycznych do przewidywania właściwości struktur makromolekularnych.

Pani dr Mikulska-Rumińska jest współautorką w sumie 23 publikacji naukowych o wysokiej łącznej liczbie 1024 cytowań (bez autocytowań) wg bazy *Web of Science* na chwilę obecną. Indeks Hirscha Habilitantki w oparciu o dane z WoS wynosi 13.

### **Ocena osiągnięcia naukowego**

Pani doktor Mikulska-Rumińska przedstawiła osiągnięcie naukowe pt. „Rozszyfrowanie maszynerii molekularnej, oddziaływań fizycznych, transdukcji sygnału oraz inhibicji procesu ferroptozy”. Składa się na nie 8 artykułów naukowych opublikowanych w latach 2017 - 2021. Obejmują one wyniki badań dotyczących ferroptozy, stosunkowo niedawno odkrytej formy regulowanej śmierci komórki, związanej z zależną od żelaza akumulacją nadtlenu lipidów. Przedmiotem zainteresowania Habilitantki jest funkcja kompleksu lipooksygenazy 15LOX z białkiem PEBP1 (ang. *Phosphatidylethanolamine-binding protein 1*) polegająca na specyficznej oksydacji pochodnych kwasu arachidonowego, jak również mechanizmy regulacji ferroptozy realizowane poprzez oddziaływanie z tym kompleksem bądź jego produktami.

Przedłożone prace powstały w ścisłej współpracy z grupami doświadczalnymi i klinicznymi, przede wszystkim z Uniwersytetu Pittsburskiego w USA. Prezentują one szerokie, interdyscyplinarne podejście do badanego problemu umożliwiające uzyskanie kompletnych, wysokiej jakości wyników. Znajduje to odzwierciedlenie w fakcie, iż wszystkie prace zostały opublikowane w

najwyższej klasy czasopismach i osiągają znaczące liczby cytowań. W dwóch artykułach Habilitantka jest pierwszym i zarazem korespondencyjnym autorem. Odmienność podjętej tematyki od tej, która była przedmiotem rozpraw doktorskiej i magisterskiej, jak również brak na listach autorów współpracowników z okresu poprzedzającego uzyskanie stopnia doktora, świadczą o tym iż pani dr Mikulska-Rumińska z powodzeniem wkroczyła na samodzielną ścieżkę naukową.

Pierwszy artykuł z cyklu, opublikowany w czołowej rangi czasopiśmie *Cell*, dotyczy badania roli białka PEBP1 w regulacji procesu ferroptozy. Wykazano w nim, iż proferroptotyczne działanie tego białka może wynikać z oddziaływania z lipooksygenazą 15LOX, prowadzącego do zmiany specyficzności substratowej enzymu w kierunku zestryfikowanych pochodnych kwasu arachidonowego (SA-PE). Ich utlenianie, w odróżnieniu od utleniania standardowego substratu, tj. wolnej formy kwasu arachidonowego, prowadzi od powstawania wodoronadtlenków fosfolipidów odgrywających rolę sygnału śmierci komórkowej w mechanizmie ferroptozy. W sposób typowy dla prac publikowanych we flagowych czasopismach z dziedziny biologii doświadczalnej, artykuł jest wynikiem współpracy wielu grup badawczych, a główna argumentacja oparta jest o wyniki badań eksperymentalnych. Niemniej jednak wkład Habilitantki uzyskany dzięki zastosowaniu metod modelowania molekularnego uznać należy za bardzo istotny dla interpretacji całości wyników. Po pierwsze, obejmuje on zaproponowanie geometrii kompleksu 15LOX z PEBP1 na podstawie dokowania i symulacji gruboziarnistej dynamiki molekularnej. Co istotne, geometria ta została uwiarygodniona eksperymentalnie poprzez wykazanie, iż mutacja punktowa, wytypowana na podstawie analizy kluczowych oddziaływań w kompleksie, faktycznie prowadzi do osłabienia wiązania pomiędzy białkami i zmniejszenia obserwowanej aktywności enzymatycznej wobec SA-PE. Po drugie, wykonane przez Habilitantkę badania oparte o analizę drgań własnych białek w modelu sieci elastycznej wskazały, iż po utworzeniu kompleksu z PEBP1 lipooksygenaza 15LOX uzyskuje dostęp do nowego zbioru konformacji oferujących dodatkowe miejsca wiążące SA-PE. Jakkolwiek ich faktyczna rola nie została bezpośrednio potwierdzona eksperymentalnie ani poprzez teoretyczną ocenę parametrów wiązania, poczynione obserwacje pozwoliły zasugerować bardzo ciekawy mechanizm allosteryczny mogący leżeć u podstaw modyfikacji specyficzności substratowej 15LOX w wyniku związania PEBP1.

Analiza szczegółów oddziaływania 15LOX z SA-PE została podjęta w pracy H2. Głównym problemem badawczym było tu wyjaśnienie specyficzności enzymu względem tego konkretnego substratu wobec mnogości w komórce innych, podobnych wielonienasyconych fosfolipidów. Ponownie, praca powstała przy większościowym udziale grup doświadczalnych, jednakże zrealizowane przez panią dr Mikulską-Rumińską modelowanie pozwoliło na interpretację, moim zdaniem najciekawszego z uzyskanych wyników. Było nim ustalenie, iż utworzenie przez 15LOX kompleksu z PEBP1 powoduje selektywne zwiększenie wydajności utleniania lipidów zawierających fosfatydyloetanoloaminę (PE). W oparciu o analizę drgań normalnych w modelu sieci elastycznej oraz dokowanie molekularne Habilitantka wskazała, że przyłączenie PEBP1 do 15LOX powoduje zmniejszenie rozmiarów tej części kieszeni wiążącej substrat, która oddziałuje z polarnym fragmentem cząsteczki fosfolipidu. W tej sytuacji, PE, najmniejsza z rozważanych grup polarnych, jako jedyna okazała się być w stanie zapewnić przyłączenie lipidu w konfiguracji potencjalnie umożliwiającej oksydację wielonienasyconego łańcucha acylowego.

Kolejna praca, H3, poświęcona jest wykazaniu zdolności indukowania przez bakterię *Pseudomonas aeruginosa* ferroptozy w komórkach gospodarza, w mechanizmie zależnym od utleniania SA-PE. Poza potencjalnym znaczeniem praktycznym, implikowanym przez możliwe zastosowania kliniczne hamowania ferroptozy, problem jest dodatkowo interesujący ze względu na fakt, iż *P. aeruginosa* nie posiada własnych SA-PE. Sugeruje to, iż aktywność produkowanej przez nią specyficznej lipooksygenazy, pLoxA, jest zachowana ewolucyjnie ściśle na potrzeby oddziaływania na komórki gospodarza. Znaczna część tej bardzo ciekawej pracy poświęcona jest wykazaniu, iż w tkankach objętych infekcją *P. aeruginosa* faktycznie dochodzi do uruchomienia sygnału proferroptotycznego, zależnego od działania lipooksygenazy bakteryjnej na SA-PE gospodarza. Wkład Habilitantki polegał z jednej strony na przeprowadzeniu analizy filogenetycznej sekwencji lipooksygenaz i ustaleniu dużego stopnia zachowania aminokwasów w obrębie miejsca katalitycz-

nego, wskazującego presję na zachowanie czynności enzymatycznej u bakterii. Z drugiej strony, wykonana przez panią dr Mikulską-Rumińską analiza porównawcza struktur pLoxA i 15LOX pozwoliła wyjaśnić dlaczego lipooksygenaza bakteryjna jest w stanie katalizować utlenianie SA-PE bez obecności białka PEBP1, w odróżnieniu od enzymów ssaczych. Dwie  $\alpha$ -helisy występujące dodatkowo w białku bakteryjnym, okazały się pełnić rolę PEBP1 zarówno w zakresie modelowania architektury miejsca wiążącego w kierunku specyficznych oddziaływań z SA-PE, jak i funkcjonalnym, powodując odtworzenie najniższego modu drgającego charakterystycznego dla kompleksu 15LOX z PEBP1.

Wydaje się, że ciekawe obserwacje poczynione w ramach pracy H3 były inspiracją dla Habilitantki do systematycznego zbadania różnic i podobieństw w obrębie pełnej rodziny lipooksygenaz. Zagadnieniu temu poświęcona jest bowiem ściśle obliczeniowa praca H4, której pani dr Mikulska-Rumińska jest pierwszą i zarazem korespondencyjną autorką. Przedstawiono w niej wyniki skrupulatnych analiz odnoszących się do sekwencji, struktur oraz dynamiki możliwie szeroko wybranych lipooksygenaz. Szczególnie interesujące są dane dotyczące tzw. profili sygnowych dla prawie 90 dostępnych struktur krystalicznych, ilustrujących amplitudy fluktuacji poszczególnych aminokwasów w ramach modelu sieci elastycznych. Pozwalają one wnioskować o rejonach białek bezpośrednio zaangażowanych w aktywność enzymatyczną (obszary o stosunkowo niskiej amplitudzie fluktuacji, zachowanej dla wszystkich przypadków) oraz potencjalnie odpowiedzialnych za specyficzność oddziaływań z ligandami (obszary o ponadstandardowo dużym rozrzucie wyników dla poszczególnych białek). Na uznanie zasługują także trudne w realizacji i interpretacji analizy sprzężeń allosterycznych, które zostały przeprowadzone i systematycznie porównane w obrębie dostępnych struktur.

Druga część cyklu prac koncentruje się na mechanizmach kontroli ferroptozy. Pierwszym jej wątkiem, podjętym w artykułach H5 i H6, jest modulacja aktywności kompleksu 15LOX z PEBP1 przez tlenek azotu. Punktem wyjścia jest tu obserwacja makrofagów i komórek mikrogleju wskazująca, iż stopień uwrażliwienia na ferroptozę jest odwrotnie skorelowany z aktywnością indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS). Większość pracy H5 poświęcona jest eksperymentalnemu wykazaniu tej zależności i ustaleniu jej możliwych mechanizmów molekularnych. Rola Habilitantki polegała na wykazaniu, iż tlenek azotu jest w stanie przeniknąć do centrum aktywnego kompleksu 15LOX-PEBP1 i kompetycyjnie hamować reakcję zachodzącą z udziałem cząsteczek tlenu. Wykorzystane do tego celu pełnoatomowe symulacje dynamiki molekularnej pozwoliły z powodzeniem scharakteryzować ścieżki dyfuzji obu gazów wewnątrz enzymu oraz ich zależność od obecności PEBP1, uwiarygadniając tym samym hipotezę o specyficznym oddziaływaniu tlenu azotu na aktywność kompleksu 15LOX-PEBP1. Badania te zostały uszczegółowione w pracy H6, w której wiodący udział pani dr Mikulskej-Rumińskiej podkreślony jest przez pierwsze miejsce na liście autorów i status autora korespondencyjnego. Symulacje dostarczyły obszernych informacji o rezydualnych tworzących kanały dostępu dla NO i O<sub>2</sub> do centrum aktywnego, pozycjonowaniu obu molekuł względem podlegających reakcji atomów SA-PE oraz wskazały na pozytywny efekt obecności PEBP1 dla dyfuzji NO do wnętrza enzymu. Uzyskane wyniki są bardzo interesujące i w wysokim stopniu uprawdopodobniają hipotezę, iż specyficzne oddziaływanie tlenu azotu na oksydację SA-PE przez kompleks 15LOX-PEBP1 jest jednym z istotnych mechanizmów regulacji ferroptozy. Odrobinię szkoda, iż nie pokuszono się o interpretację fizyczną przyczyn obserwowanych różnic w dystrybucji NO i O<sub>2</sub> w obrębie struktur białkowych. Niestety, nie doszukałem się też informacji o parametrach pola siłowego przyjętych dla tych molekuł ani innych niestandardowych elementów symulowanych układów.

Praca H7 poświęcona jest z kolei ferrostatynie-1 (fer-1), jednemu z bardziej znanych, niskocząsteczkowych inhibitorów procesu ferroptozy. Autorzy dowodzą, iż oprócz przyjmowanego mechanizmu działania opartego o nieenzymatyczną aktywność antyoksydacyjną, fer-1 może także specyficznie hamować kompleks 15LOX-PEBP1. Wsparciem dla prezentowanych tu wyników badań doświadczalnych są wykonane przez Habilitantkę obszernie pełnoatomowe symulacje dynamiki molekularnej oraz dokowania. Pozwoliły one ustalić, iż wiązanie fer-1 do 15LOX uniemożliwia utworzenie funkcjonalnego kompleksu z PEBP1. Zdaje się to przekonywująco tłumaczyć

wcześniejszy brak dowodów na specyficzne hamowanie enzymatycznego tworzenia wodoronadtlenków lipidów przez fer-1, wskazując, iż uprzednie badania oparte były jedynie o analizę funkcji samej lipooksygenazy 15LOX i nie uwzględniały konieczności rekrutacji PEBP1 do wygenerowania sygnału proferroptotycznego.

Ostatnia praca z cyklu, H8, dotyczy badania roli fosfolipazy A2 (*Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 $\beta$* , iPLA<sub>2</sub> $\beta$ ) jako enzymu przeciwdziałającego ferroptozie poprzez eliminowanie utlenionych fosfolipidów. Zasadza się ona na obserwacji upośledzenia funkcji iPLA<sub>2</sub> $\beta$  w szeregu chorób neurodegeneracyjnych przebiegających z potencjalnym nasileniem mechanizmów ferroptotycznych. Przedstawione w pracy wyniki badań eksperymentalnych potwierdzają ten związek i demonstrują specyficzną aktywność iPLA<sub>2</sub> $\beta$  w stosunku do wodoronadtlenku SA-PE, jak również zniesienie cytoprotekcyjnej funkcji enzymu przez jedną z mutacji punktowych o znanym związku z chorobą Parkinsona. Modelowanie komputerowe przeprowadzone przez panią dr Mikulską-Rumińską pozwoliło wykazać preferencję peroksydowanych łańcuchów acylowych SA-PE do lokalizowania się przy powierzchni błony lipidowej, co uprawdopodobnia ich eliminację przez powierzchniowo związaną iPLA<sub>2</sub> $\beta$ . Co więcej, Habilitantka wykonała pełnoatomowe symulacje w środowisku błonowym wersji natywnej enzymu oraz rozważanego w eksperymentach mutantu. W przypadku zmodyfikowanego białka wyniki wskazują na zwięźenie kieszeni wiążącej substraty oraz zmianę globalnej konformacji powodującą częściową utratę kontaktu z błoną lipidową. Jakkolwiek obserwacje te mogą wyjaśniać wpływ mutacji na obniżoną aktywność iPLA<sub>2</sub> $\beta$ , nie są one poparte analizą statystyczną. Ze względu na duży rozmiar układu i z natury powolną relaksację błon lipidowych, jestem nieco sceptyczny odnośnie możliwości uzyskania przekonujących dowodów odnośnie efektów mutacji punktowej na podstawie trwających jedynie 100 ns symulacji, nawet przy wykonaniu ich czterokrotnych powtórzeń. Nie umniejsza to jednak istotnej roli wykonanego modelowania dla lepszego zrozumienia generalnych relacji przestrzennych w omawianym układzie.

Podsumowując, cykl prac przedstawiony przez panią dr Mikulską-Rumińską składa się na bardzo solidne osiągnięcie naukowe, wnoszące istotny wkład do badań nad procesem ferroptozy. Duże znaczenie uzyskanych wyników podkreślają bardzo wysokie wskaźniki bibliometryczne: na chwilę obecną artykuły H1-H8 zgromadziły łącznie 906 cytowań wg bazy *Web of Science*. Choć środek ciężkości większości prac przesunięty jest w kierunku badań eksperymentalnych, uzyskane przez Habilitantkę rezultaty oparte o modelowanie molekularne stanowią istotny element całości. Dostarczają one bowiem mechanistycznej interpretacji obserwowanych zależności, co jest szczególnie cenne z punktu widzenia przyszłych badań translacyjnych. Dominujący wkład Habilitantki w część prac związaną z wykorzystaniem metod obliczeniowych jest poparty oświadczeniami współautorów i nie budzi wątpliwości. Należy zaznaczyć, iż pani dr Mikulska-Rumińska biegle opanowała warsztat teoretycznej biofizyki molekularnej i bioinformatyki. Uzyskanie przedstawionych wyników wymagało zastosowania szerokiego spektrum metod, począwszy od analizy sekwencji białek, poprzez modelowanie homologiczne, modele sieci elastycznych, symulacje gruboziarniste i pełnoatomowe, po obliczenia kwantowo-mechaniczne na potrzeby uzyskania parametrów pola siłowego. Na uznanie zasługuje podjęcie analiz sprzężeń allosterycznych i ich interpretacja, co jest zadaniem trudnym i wymagającym zgromadzenia dużej wiedzy o badanych układach. Bardzo pozytywnie oceniam też zdolność Habilitantki do prezentacji rezultatów prowadzonych badań zarówno w zakresie opracowanych przez Nią części artykułów jak i dobrze napisanego autoreferatu.

### **Pozostały dorobek Habilitantki**

Po uzyskaniu stopnia doktora, pani dr Mikulska-Rumińska była współautorką 8 artykułów niewchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, z których każdy został opublikowany w wysokopunktowanym czasopiśmie. Ich tematyka poświęcona jest badaniom oddziaływań międzycząsteczkowych w wybranych układach o znaczeniu biologicznym (prace A1, A2, A7, A8) oraz analizie właściwości mechanicznych makromolekuł obejmujących sprzężenia allosteryczne oraz odpowiedź na siły zewnętrzne (prace A3, A4, A5). W każdym z nich Habilitantka odpowiedzial-

na była za zastosowanie metod obliczeniowych takich jak modelowanie homologiczne, analizy w oparciu o model sieci elastycznej, symulacje dynamiki molekularnej bądź dokowanie. Jej wiodącą rolę w powstaniu dwóch z tych prac podkreśla status pierwszego i jednocześnie korespondencyjnego autora, jak również fakt, iż zostały one zrealizowane w ramach projektów, w których pełniła ona rolę kierownika zespołu. Na szczególną uwagę, ze względu na odmienny charakter, zasługuje praca A6 opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Bioinformatics*. Jest ona poświęcona pakietowi ProDy, który obejmuje zestaw narzędzi programistycznych dla języka Python, pozwalających na modelowanie i analizę właściwości dynamicznych struktur białkowych. Istotny wkład do niego Habilitantki polegał na zaimplementowaniu modułu *MechStiff* przeznaczonego do oceny odpowiedzi białka na siłę zewnętrzną.

Od momentu uzyskania stopnia doktora Habilitantka wygłosiła 7 referatów konferencyjnych (w tym 4 na zaproszenie) oraz trzykrotnie prezentowała wyniki w postaci plakatów. W omawianym okresie uzyskała status kierownika dwóch projektów naukowych (NCN Sonata i grant obliczeniowy na superkomputerze Anton) i pełniła rolę wykonawcy w 7 projektach. Wysoko należy ocenić jej zaangażowanie w inicjatywy lokalne (udział w 5 grantach w ramach programu IDUB, w tym w 2 w roli kierownika), projekty wspierające wymianę międzynarodową (programy Sciex-NMS<sup>ch</sup>, SPINAKER) jak również działania popularyzujące naukę, obejmujące udział w programie L'Oréal-UNESCO *For Women in Science*, artykuł popularnonaukowy oraz wystąpienia w kilku programach radiowo-telewizyjnych.

Zaangażowanie w działalność dydaktyczną pani dr Mikulskiej-Rumińskiej obejmuje zajęcia prowadzone w trakcie 4 semestrów na uczelni macierzystej oraz opiekę nad dwójką doktorantów i czwórką studentów. Oceniany jedynie na podstawie przytoczonych wskaźników jest to zakres umiarkowany. Należy jednak wziąć pod uwagę, iż w okresie stażu podoktorskiego jak i w trakcie pełnienia obowiązków kierownika grantu Sonata Habilitantka realizowała pracę stricte naukową i nie była zobligowana do prowadzenia zajęć. Okres dostępności dla działalności dydaktycznej był też ograniczony przez trzykrotny urlop macierzysty.

### **Ocena końcowa**

Przedstawione przez panią dr Mikulską-Rumińską osiągnięcie pt. „Rozszyfrowanie maszynerii molekularnej, oddziaływań fizycznych, transdukcji sygnału oraz inhibicji procesu ferroptozy” stanowi spójny tematycznie cykl publikacji o bardzo wysokiej wartości naukowej. Zaprezentowane artykuły są wynikiem udanej, wielokierunkowej współpracy i powstały w ramach działalności Autorki w innej niż macierzysta instytucji naukowej. Nie mam najmniejszych wątpliwości, iż przedstawione osiągnięcie spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego, określone w art. 219 ust. z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Z przekonaniem rekomenduję o dopuszczenie dr Mikulskiej-Rumińskiej do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.