

Warszawa, 15.05.2023

**Recenzja osiągnięcia habilitacyjnego „Rozszyfrowanie maszynerii molekularnej, oddziaływań fizycznych, transdukcji sygnału oraz inhibicji procesu ferroptozy” dr Karoliny Mikulskiej-Rumińskiej**

Przedstawione osiągnięcie habilitacyjne to cykl 8 prac (H1-H8). Prace H1-H3 zostały wykonane podczas stażu podoktorskiego habilitantki w grupie prof. Ivet Bahar w School of Medicine na Uniwersytecie w Pittsburghu, USA, natomiast prace H4-H8 podczas jej pracy jako adiunkta na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Prace H1-H8 opowiadają bardzo ciekawą i spójną historię jako cykl badań nad mechanizmem ferroptozy, jednej ze ścieżek biochemicznych wyzwalających śmierć komórki. Są to prace wieloautorskie, opierające się na wielości metod eksperymentalnych i teoretycznych. Habilitantka specjalizuje się w biofizycznym modelowaniu obliczeniowym, toteż wykorzystwała w tych pracach między innymi dokowanie molekularne, symulacje dynamiki molekularnej, modele sieci elastycznych. W dużej części jej praca opierała się na wykorzystaniu gotowego software'u. Jednak habilitantka miała także wkład programistyczny w kod pakietu ProDy, służącego do analizy strukturalnej i dynamicznej białek.

**Analiza parametryczna prac H1-H8**

Prace H1-H8 opublikowano w latach 2017–2021 w czasopiśmie: Cell (IF 66.85), Journal of the American Chemical Society (IF 16.383), The Journal of Clinical Investigation (IF 19.486), Journal of Chemical Information and Modeling (IF 6.162), Nature Chemical Biology (2 prace; IF 16.29), International Journal of Molecular Sciences (IF 6.208), Redox Biology (IF 10.8). Wszystkie te czasopisma są na liście filadelfijskiej. Cell i Nature Chemical Biology uważane są za czasopisma z najwyższej półki. Journal of the American Chemical Society jest także bardzo prestiżowy. Prawie wszystkie pozostałe to znakomite czasopisma o wysokim impact factorze. Jedynie co do International Journal of Molecular Sciences, mimo wysokiego impact factora (IF 6.208), należy zwrócić uwagę, że są kontrowersje wokół jego macierzystego wydawnictwa MDPI. Część środowiska naukowego sugeruje, że czasopisma z tego wydawnictwa mogą być uważane za "predatory journals". Jednak opinie na temat tego wydawnictwa są zarówno pozytywne, jak i negatywne – można je prześledzić np. w szeregu artykułów w Forum Akademickim. Tak czy inaczej, moim zdaniem ważna jest tutaj wartość merytoryczna konkretnego artykułu (H6).

Cykl prac H1-H8 dorobił się w tej chwili 889 cytowań bez autocytowań według Web of Science.

**Ocena wkładu habilitantki w prace H1-H8**

Przedstawiony cykl stanowią prace wieloautorskie (od 8 do 30 autorów). Tak duże interdyscyplinarne zespoły są koniecznością w badaniach związanych z biologią. Autorzy prac H1-H8 należą do kilku grup badawczych. Kierownicy tych grup są, zgodnie ze zwyczajem, ostatnimi autorami tych prac. Habilitantka jest pierwszą autorką oraz jednocześnie autorką korespondencyjną dwóch prac: H4 (jako jedna z dwóch pierwszych autorek o równym wkładzie) i H6.

W pracach H4 i H6 habilitantka była autorką koncepcji badań (w przypadku H4 świadczy o tym deklaracja w przedstawionych dokumentach habilitacyjnych, a artykuł H6 zawiera notkę o wkładzie autorów). W pracach H6, H7 i H8 habilitantka zarządzała grantem NCN, z którego sfinansowano część badań, a którego partnerem był Uniwersytet w Pittsburghu, USA. Kierownicy grup badawczych, w których pracowała lub z którymi współpracowała habilitantka, w swoich deklaracjach potwierdzają wagę jej wkładu. Nie wszyscy współautorzy wszystkich prac H1-H8 dostarczyli oświadczenia o swoim wkładzie. Jednak brakujące oświadczenia nie dotyczą autorów zajmujących się pracami obliczeniowymi (z wyjątkiem brakującego oświadczenia B. Liu w pracy H5).

Ponieważ w pracach H1-H8 nie tylko habilitantka pełniła rolę autora zajmującego się modelowaniem obliczeniowym, przeanalizowałam jej wkład na tle oświadczeń o wkładach innych współautorów wykonujących modelowanie obliczeniowe. Na podstawie tej analizy podzieliłam prace H1-H8 na trzy kategorie:

- w 3 pracach z przedstawionego cyklu wkład habilitantki był istotny – gdy habilitantka deklaruje wykonanie konkretnej pracy obliczeniowej, oraz inny współautor/współautorzy także deklaruje wykonanie konkretnej pracy obliczeniowej,
- w 3 pracach z przedstawionego cyklu wkład habilitantki był znaczny – gdy habilitantka deklaruje wykonanie konkretnej pracy obliczeniowej, natomiast inny współautor/współautorzy deklaruje pewien wkład w prace obliczeniowe, ale nie określony konkretnie,

- w 2 pracach z przedstawionego cyklu (H4 i H6) wkład habilitantki był kluczowy – gdy habilitantka grała wiodącą rolę w przeprowadzaniu całych badań.

W przypadku pracy H4 zwróciłam uwagę, że udziały dwóch pierwszych autorek zostały opisane w tekście artykułu: „K.M.R. [habilitantka – przyp. mój] and I.S. [Indira Shrivastava] contributed equally.” Jednak nie wiem, jak interpretować tę deklarację równego wkładu, bo jednocześnie to habilitantka jest autorką korespondencyjną, a w załączonym do dokumentów habilitacyjnych oświadczeniu Indira Shrivastava opisuje swój wkład jako: „participation in the discussions of different aspects of the project (simulation approaches, data selection, analysis and interpretation of the results), writing/editing/reviewing the text of the manuscript and figures”. Natomiast opisywany w załączniku do autoreferatu wkład habilitantki wydaje mi się znacznie większy: zawiera m.in. koncepcję badań, wykonanie modelowania obliczeniowego i programowanie, a także „Zarządzanie projektem grantowym, w ramach którego sfinansowano część badań” oraz „Przygotowanie pierwszej wersji artykułu, korekty i korespondencja z wydawcą.” Jednak na podstawie opisu udziału dwóch pierwszych autorek w tekście artykułu, deklaracji współautorów zaangażowanych w część obliczeniową pracy, oraz deklaracji habilitantki wyciągam wnioski, że wkład habilitantki w pracę H4 jest kluczowy, ze względu na deklarowaną przez nią dużą ilość konkretnej pracy obliczeniowej, programistycznej i autorstwo koncepcji badań.

## Wyniki zaprezentowane w pracach H1-H8

**H1.** W tej pracy autorzy wykazali, że do ferroptozy oprócz lipooksygenazy jest jeszcze potrzebne białko PEBP1: Steruje ono specyficznością lipooksygenaz 15LOX, tak żeby wybierały katalizowanie reakcji utleniającej pewien konkretny kwas tłuszczowy. Z kolei jeśli poziom utlenionego produktu jest zbyt słabo kontrolowany przez komórkę, to staje się on sygnałem do ferroptozy. Habilitantka pokazała, jak wygląda wiązanie 15LOX z PEBP1 i jak to się dzieje, że 15LOX nie związany z PEBP1 woli się wiązać z innymi cząsteczkami niż po związaniu z PEBP1.

**H2.** W tej pracy zbadano, jak 15LOX-2 wybiera pewien konkretny fosfolipid spośród wielu innych fosfolipidów błonowych. Symulacje wykonane przez habilitantkę, pokazały, że przy związanym PEBP1, 15LOX-2 ma węższe wejście do miejsca aktywnego, przez co łatwo wiąże wybrany substrat, a inne fosfolipidy nie mieszczą się w miejscu aktywnym, bo mają za duże głowy.

**H3.** W tej pracy autorzy pokazali, że bakteria *Pseudomonas aeruginosa* sama nie ma lipidu AA-PE, ale ekspresuje lipooksygenazę pLoxA (odpowiednik ludzkiej 15LOX), która może utleniać lipid AA-PE u gospodarza w komórkach nabłonka oskrzeli, co wywołuje ich ferroptozę. Habilitantka brała udział w opracowaniu drzewa filogenetycznego pokazującego m. in., że bakteryjne lipooksygenazy są bardziej podobne do zwierzęcych i roślinnych niż do innych eukariotycznych, np. grzybowych – ciekawa jest sugestia w artykule, że być może wynika to z horyzontalnego transferu genów już po rozejściu się linii bakteryjnych i zwierzęcych oraz roślinnych. Modelowanie wykonane przez habilitantkę pokazało, że pLoxA ma strukturę, która działa jak wieczko zamykające lub otwierające miejsce katalityczne. Wygląda więc na to, że bakteryjna lipooksygenaza nie potrzebuje PEBP1 jako białka zwiększającego jej specyficzność, bo ma własną wbudowaną strukturę, która spełnia tę funkcję. Habilitantka zbadła też, które fragmenty pLoxA poruszają się w sposób anty-skorelowany i pokazała, że miejsce katalityczne leży pomiędzy takimi fragmentami niejako na zasadzie zawiasu. Ten wynik stanowi inspirację do następnej pracy w cyklu, H4.

**H4.** Konsekwentnie, wyciągając wnioski z poprzednich prac H1–H3, habilitantka zaproponowała badania całej rodziny białek LOX, syntetyzowanych przez różne gatunki – aby sprawdzić podobieństwa i różnice w ich działaniu. Jest to praca obliczeniowa. Habilitantka miała kluczowy wkład do tej pracy jako autorka koncepcji badań. Pod względem wkładu habilitantki prace H4 i H6 są najważniejsze w przedstawionym cyklu. Habilitantka zbadła 88 białek z rodziny LOX w kilku różnych gatunkach organizmów. Okazało się, że ich sekwencje mało się pokrywają, ale struktury przestrzenne są podobne. Używając modelu sieci gaussowskich habilitantka przebadła fluktuacje struktury przestrzennej tych białek. Pokazała, że miejsca katalityczne poruszają się mało, co sugeruje, że stabilna struktura przestrzenna jest potrzebna do właściwego działania enzymu. Natomiast różnice w ruchomości struktur pomiędzy różnymi lipooksygenazami mogą sugerować jakiś specyficzny wybór substratu. Analiza sekwencji wykazała małą ruchomość zachowanych ewolucyjnie obszarów białka, a dużą ruchomość obszarów zmiennych ewolucyjnie. Najbardziej nieruchome są miejsca aktywne i/lub miejsca wiązania lipidów.

**H5.** W tej pracy autorzy zwracają uwagę, że komórki układu odpornościowego, np. makrofagi i mikroglej trudniej ulegają ferroptozie, niż inne komórki. Wykazali, że obecność tlenu azotu chroni lipidy przed utlenieniem. Wkładem habilitantki było symulacyjne zbadanie architektury kompleksu 15LOX-2 pod kątem wiązania tlenu azotu: znalezienie dwóch wejść (kanałów tlenowych, którymi mogą wchodzić tlen lub tlenek azotu), wywnioskowanie z symulacji, że zachodzi konkurencja tlenu i tlenu azotu o wiązanie z miejscem katalitycznym, oraz pokazanie, że wiązanie z PEBP1 blokuje jedno z wejść. Zadałam sobie pytanie, czytając, jak wobec tego PEBP1 zmienia odporność na ferroptozę, związaną z tlenkiem azotu? Wydaje mi się, że na to odpowiada praca H6: sugeruje ona, jeśli dobrze rozumiem, że paradoksalnie – PEBP1 zwiększa zależną od tlenu azotu odporność na ferroptozę, mimo że jest ogólnie czynnikiem napędzającym ferroptozę.

**H6.** Ta praca jest obok pracy H4 jedną z dwóch najważniejszych w przedstawionym cyklu pod względem wkładu habilitantki. W autoreferacie habilitantka wymienia pytania zadane w tej pracy, szkoda jednak, że nie streszcza tam odpowiedzi, bo ułatwiłoby mi to przegryzanie się przez ten artykuł.

Habilitantka bada kompleks 15LOX-2 z PEBP1 oraz jego stan związany z lipidem, a także wpływ tlenu azotu na utlenianie lipidów przez ten kompleks. W pracy H5 pokazano, że tlen i tlenek azotu konkurują w dostępie do miejsca katalitycznego lipooksygenazy. W pracy H6 habilitantka wykazała, że są co najmniej dwa mechanizmy zapobiegania utlenianiu lipidów przez tlenek azotu: i) reakcja tlenu azotu z lipidem, ii) „zatkanie” lipooksygenazy przez tlenek azotu. Symulacje pokazały 3 wejścia, którymi tlen cząsteczkowy lub tlenek azotu mogą dostawać się do centrum aktywnego lipooksygenazy. Wejście E2 jest zablokowane przez lipid-substrat, E1 jest określone jako główne, a E3 alternatywne.

Zastanowiło mnie, skąd autorzy wiedzą, które wejście jest główne? Jak rozumiem – z symulacji dynamiki molekularnej. Ale w tabeli S1 widać, że wykonali tylko po 2 do 5 symulacji każdego układu, więc zastanawiałam się, czy to nie za mało, żeby stwierdzać, które reakcje zachodzą łatwiej, które trudniej. To dotyczy także rozdziału o konkurencji tlenu i tlenu azotu. Opisane są tam interakcje trwające kilkadziesiąt nanosekund, a cały pojedynczy przebieg symulacji trwa 150 ns. Rys. 2e pokazuje trajektorie „during a typical MD run”, ale co oznacza typowa trajektoria, jeśli było tylko 2 do 5 symulacji? Jednak z drugiej strony – w tabeli S1 jest podano, że symulowano naraz od 5 do 15 cząsteczek tlenu lub tlenu azotu, więc może to wystarcza? W podpisie rys. 4 autorzy podają, że rys. S5 pokazuje wyniki drugiej symulacji, która reprodukuje wyniki pierwszej, więc to poprawia zaufanie do tych wyników.

Zaciekawiło mnie, że na rysunku 4b w podpisie jest napisane, iż bez PEBP1 tylko tlen potrafi wejść w pobliże miejsca katalitycznego lipooksygenazy, a w obecności PEBP1 może tam wejść również dobrze tlenek azotu i zablokować miejsce katalityczne. Wynikałoby z tego, że z jednej strony PEBP1 ułatwia utlenianie lipidów przez lipooksygenazę, ale z drugiej strony ułatwia też blokowanie przez tlenek azotu tego utleniania. Czy to adaptacja, czy przypadek?

Zwróciłam uwagę na zdanie we wstępie artykułu H6: „The role of 15LOX in the onset of ferroptosis is now well-established [3–6].” Artykuły 3–5 to prace zespołów, w których pracowała lub z którymi współpracowała habilitantka. Pomyślałam, że może nieco przedwczesne jest przedstawianie jako „well-established” wyników tylko jednej szkoły. Zwłaszcza że z kolei praca 6 [Shah et al., ACS Cent. Sci. 2018, 4, 3, 387–396] to artykuł przeglądowy, który jest nieco krytyczny wobec hipotezy o ważnej roli 15LOX, stawianej przez tę szkołę. Ale uwaga! W pracy H7 następuje zwrot akcji, bo szkoła, której współpracowniczką jest habilitantka, rozprawia się z tą krytyką.

**H7.** Ta praca odpowiada na kontrowersję, o której mowa wyżej. Ferrostatyna-1 to znany inhibitor ferroptozy, jednak pewne badania wskazują, że nie wpływa ona na 15LOX. Stąd badacze wysnuwali hipotezę, że to nie 15LOX powoduje ferroptozę [Shah et al., ACS Cent. Sci. 2018, 4, 3, 387–396]. W pracy H7 autorzy pokazali jednak metodami obliczeniowymi, że ferrostatyna-1, owszem, hamuje utlenianie lipidów przez 15LOX, ale tylko wtedy, gdy 15LOX współpracuje z PEBP1. Z symulacji dynamiki molekularnej wykonanych przez habilitantkę wynika, że gdy białko 15LOX wiąże ferrostatynę-1, to PEBP1 nie może się z nim związać, przez co zdolność lipooksygenazy do utleniania lipidów jest znacznie obniżona.

**H8.** W tej pracy autorzy badają, co się dzieje w kolejnym kroku, gdy już lipid zostanie utleniony i stanowi sygnał do ferroptozy. Sugerują, że fosfolipaza iPLA2 $\beta$  może wyłączać ten sygnał.

W autoreferacie pojawiła się pomyłka językowa: „model Whiskera”, „model Whisker”. Tymczasem nie chodzi o nazwisko, tylko o rzeczownik whisker = wąsy jak u kota. Określenie pochodzi z pracy Greenberg et al., J Biol Chem. 2008, 283(4), 2385-96: „Cell membranes thus „grow whiskers” as phospholipids undergo peroxidation, and many of their oxidized fatty acids protrude at the surface.” Jest to zatem hipoteza, że peroksydowane łańcuchy lipidów w błonie lipidowej chętniej migrują w stronę powierzchni błony i wystają z niej.

Artykuł H8 zawiera wyniki bardzo bogatych symulacji dynamiki molekularnej: Habilitantka zasymulowała dwuwarstwą lipidową złożoną z różnych lipidów. Pokazała, że rzeczywiście peroksydowany lipid 1-SA-2-15-HpETE-PE wystawia fragment swojego łańcucha w okolicy powierzchni błony lipidowej. A to z kolei pozwala zareagować z dimerem iPLA2 $\beta$ , którego końcówki są zanurzone w błonę.

Zastanowiło mnie, dlaczego na rys. 1g wszystkie zaznaczone lipidy 1-SA-2-15-HpETE-PE mają jednakową orientację? Domyślam się, że to stan początkowy symulacji i potem one losowo zmieniają pozycje, gdy układ dochodzi do równowagi w ramach przygotowania do właściwego przebiegu symulacji (opis *equilibration* jest na końcu w rozdziale o metodach) i wtedy są już losowo zorientowane niezależnie od stanu początkowego.

**Znaczenie wyników badań H1-H8.** Jeśli chodzi o ogólną wagę tych wyników, osiągniętych wspólnym wysiłkiem interdyscyplinarnych zespołów: Zrozumienie mechanizmu ferroptozy może okazać się ważne dla medycyny. Pod tym względem zwłaszcza ciekawe są wyniki badań H1, które sugerują związek ferroptozy z astmą u ludzi, a także wyniki badań H3, pokazujące, że bakterie wyewoluowały mechanizm, dzięki któremu potrafią wywoływać ferroptozę w ludzkich oskrzelach. Jeśli natomiast chodzi o część badań wykonaną

indywidualnie przez habilitantkę: Z punktu widzenia fizyki badania obliczeniowe habilitantki w pracach H1-H8 (w szczególności najważniejsze prace H4 i H6) stanowią ważny wkład, ponieważ wyjaśniają strukturę i mechanikę cząsteczek związanych z ferroptozą.

#### **Pozostałe osiągnięcia naukowe**

Przed doktoratem habilitantka opublikowała w czasopismach recenzowanych 7 prac doświadczalnych i obliczeniowych, związanych z biofizyką białek. Po doktoracie, oprócz prac H1-H8, habilitantka opublikowała prace A1, A3-A8. (Praca A2 jest, z tego co widzę, wciąż jeszcze w recenzji.) Są to także prace w czasopismach dobrych, bardzo dobrych, oraz z najwyższej półki (A1 opublikowana w PNAS). Dotyczą biofizyki białek i wkład habilitantki polega na badaniach obliczeniowych struktury i dynamiki białek, jednak w innych układach niż te związane z ferroptozą. Praca A6 prezentuje pakiet ProDy do modelowania i analizy dynamiki białek. Habilitantka miała tu swój wkład programistyczny.

Habilitantka ma godną pozazdrosczenia zdolność międzynarodowego networkingu. Współpracują z nią grupy: Grupa prof. Valeriana Kagana, grupa prof. Hülyi Bayır, grupa prof. İvet Bahar, grupa prof. Sally Wenzel, grupa prof. Andy'ego VanDemarka – w Pittsburghu; grupa prof. Moshego Arditi w Los Angeles; grupa dr. Jamesa M. Kriegera w Madrycie; grupa prof. Patricka van der Wel, w Groningen; grupa prof. Bruna Lapieda w Angers.

Habilitantka z sukcesem kierowała i kieruje kilkoma grantami. Jeden z nich prowadziła w USA, drugi jest we współpracy z partnerami z USA. Brała udział jako beneficjentka i wykonawczyni w kilku akademickich programach europejskich i międzynarodowych. Była wykonawczynią i *Project Manager of in silico studies* w amerykańskim grantie polegającym na współpracy z przemysłem farmaceutycznym.

Habilitantka jest aktywna jako recenzentka dla czasopism naukowych z listy filadelfijskiej. Uczestniczyła w organizacji licznych konferencji naukowych. Jest członkinią amerykańskiego Biophysical Society. Prezentowała swoje prace na licznych konferencjach międzynarodowych i krajowych. Otrzymała liczne nagrody i wyróżnienia za osiągnięcia naukowe. Ma też wkład w popularyzację nauki w mediach. Habilitantka prowadziła zajęcia dydaktyczne na uczelni, związane z matematyką, programowaniem, fizyką i biofizyką. Sprawuje też opiekę nad 4 studentami i 2 doktorantami. Prowadziła także warsztaty naukowe związane z biofizyką obliczeniową. Wart podkreślenia jest ciekawy wkład dydaktyczny habilitantki w tworzenie tutoriali do pakietu ProDy.

#### **Podsumowanie**

Zaprezentowany cykl prac H1-H8 stanowiących osiągnięcie habilitacyjne to w większości artykuły opublikowane w znakomitych czasopismach naukowych, trzy z nich – w czasopismach z najwyższej półki. Zdecydowanie mocną stroną zaprezentowanego wniosku habilitacyjnego jest prowadzenie przez habilitantkę licznych projektów grantowych – wewnątrzuczelnianych (UMK), polskich (NCN) i zagranicznych (National Research Council, USA). Habilitantka zdobywała też nagrody związane z pracą naukową i ma na koncie współpracę z przemysłem. Nie mam wątpliwości, że zgodnie z kryteriami ustawowymi kandydatka do stopnia doktora habilitowanego wykazuje się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.

Jestem pod wrażeniem faktu, że habilitantka rozwijała tę bardzo intensywną aktywność pomimo trzech urlopów macierzyńskich. Naukowczynie (przynajmniej w Polsce) nie mają żon, które dla nich zachodzą w ciążę, rodzą i wychowują dzieci.

W badaniach biologicznych praca w dużych zespołach jest koniecznością. Zespoły takie obejmują badaczy o różnych specjalizacjach. Habilitantka specjalizuje się w modelowaniu obliczeniowym. W tej sytuacji nieco pracochłonne było dla mnie określenie, jak znaczny jest wkład habilitantki w przedstawiony przez nią cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych H1-H8, ponieważ stanowią one prace wieloautorskie. Jednak po przeczytaniu tych artykułów i przeanalizowaniu informacji dotyczących wkładu poszczególnych autorów jestem przekonana, że przedstawione osiągnięcie naukowe spełnia kryteria ustawowe dla nadania stopnia doktora habilitowanego: Cykl H1-H8 stanowi opracowanie wydzielonego zagadnienia, które jest indywidualnym wkładem habilitantki, ponieważ wykonane przez nią modelowanie obliczeniowe struktur cząsteczek i procesów związanych z katalizą utleniania lipidów stanowiło niezbędny udział do opublikowanych w tych pracach wyników badań nad zjawiskiem ferroptozy. Osiągnięcie H1-H8 wnosi znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauk fizycznych, ponieważ wyjaśnia strukturę i mechanikę cząsteczek zaangażowanych w ferroptozę.

*Anna Ochel - Marinich*