

nanowska s.c.

Ewa Nanowska, Ewa Nanowska-Szmyt
80-153 Gdańsk, ul. Płowce 34
NIP 583-27-16-303, REGON 192472129
tel. 58 302 08 27



University
of Gdańsk



International Centre for
Cancer Vaccine
Science

TŁUMACZENIE Z JĘZYKA ANGIELSKIEGO

Rozwijanie koncepcji farmakoforów w celu zbadania strukturalnych podstaw sieci białek zaangażowanych w procesy nowotworowe lub odpowiedź immunologiczną

Podsumowanie osiągnięć zawodowych

dr inż. Monikaben Padariya

Dziedzina: nauki ścisłe i przyrodnicze

Dyscyplina: biotechnologia

Międzynarodowe Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi
Uniwersytet Gdański
ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk
Polska

Gdańsk 2023 r.

Ewa Nanowska


Tłumacz przysięgły j. angielskiego
Nr rej. TP/36/05

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych1. **Imię i Nazwisko:** Monikaben Padariya2. **Dyplomy, stopnie naukowe nadane w określonych dziedzinach nauki lub sztuki, zawierające nazwę instytucji, która nadała stopień, rok nadania stopnia, tytuł rozprawy doktorskiej**2018 Doktor (dr inż.) nauk chemicznych w zakresie biotechnologii, Katedra Technologii Farmaceutycznej i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Polska. Tytuł rozprawy doktorskiej: *Structural and dynamic insights on the EmrE protein in apo-form and with TPP⁺ related substrates [Wgląd w strukturę i dynamikę białka EmrE w formie apo przy podłożach związanych z TPP⁺]*, promotor: prof. dr. hab. inż. Maciej Bagiński.2012 Magister inżynier (mgr inż.) na kierunku biotechnologia/bioinformatyka, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wrocław, Polska. Tytuł rozprawy magisterkiej: *Computer-aided design of Organophosphorus inhibitors of Urease [Komputerowo wspomagane projektowanie fosfotoorganicznych inhibitorów ureazy]*, promotorzy: prof. dr hab. inż. Wacław Andrzej Sokalski i prof. dr hab. inż. Łukasz Berlicki.3. **Informacje o zatrudnieniu w instytutach badawczych lub wydziałach/katedrach lub szkole artystycznej**

Od 2019- obecnie Adiunkt / Badacz postdoktorancki, Międzynarodowe Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi, Uniwersytet Gdański, Polska.

2018-2019 Badacz naukowy, Katedra Technologii Farmaceutycznej i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Polska.

4. **Opis osiągnięć, o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy**

Mój dorobek naukowy obejmuje osiem artykułów naukowych (sześć prac naukowych i dwie publikacje przeglądowe), które stanowią zbiór jednotematycznej serii publikacji, prezentującej modele farmakoforowe różnorodnych zestawów białek lub enzymów biorących udział w procesach nowotworowych lub odpowiedzi immunologicznej. Farmakofory zostały wygenerowane w oparciu o sieci białko-białko, albo mRNA lub DNA, które zapewniają wgląd w miejsca aktywne lub allosteryczne. Prace te zostały opublikowane w latach 2019-2022 i dotyczą nauk podstawowych wraz z badaniami stosowanymi. Są one efektem współpracy z różnymi akademickimi uczelniami badawczymi. Punkty za publikacje zostały przyznane zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. We wszystkich ośmiu publikacjach reprezentujących mój dorobek naukowy jestem pierwszym autorem, a w pięciu z nich jestem autorem korespondencyjnym. Prace te mają sumaryczny współczynnik Impact Factor (IF) wynoszący 56,524 oraz 910 punktów MEiN (Ministerstwa Edukacji i Nauki Rzeczypospolitej Polskiej) łącznie.

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych**a) Tytuł osiągnięcia naukowego**

Rozwijanie koncepcji farmakoforów w celu zbadania strukturalnych podstaw sieci białek zaangażowanych w procesy nowotworowe lub odpowiedź immunologiczną.

b) Publikacje badawcze wchodzące w skład Osiągnięć Naukowych

4.1. Padariya, M., Jooste, M. L., Hupp, T., Fähræus, R., Wojtesek, B., Vollrath, F., Kalathiya, U., & Karakostis, K. (2022). The elephant evolved p53 isoforms that escape mdm2-mediated repression and cancer. *Molecular biology and evolution*, 39(7), msac149. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac149> (IF₂₀₂₀ **16.24**; MEiN₂₀₂₀ = **200**).

4.2. Padariya, M., Kote, S., Mayordomo, M., Dapic, I., Alfaro, J., Hupp, T., Fahraeus, R., & Kalathiya, U. (2021). Structural determinants of peptide-dependent TAP1-TAP2 transit passage targeted by viral proteins and altered by cancer-associated mutations. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 5072–5091. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.09.006> (IF₂₀₂₀ **7.27**; MEiN₂₀₂₁ = **100**).

4.3. Padariya, M., Kalathiya, U., Mikac, S., Dziubek, K., Tovar Fernandez, M. C., Sroka, E., Fahraeus, R., & Sznarkowska, A. (2021). Viruses, cancer and non-self recognition. *Open biology*, 11(3), 200348. <https://doi.org/10.1098/rsob.200348>; (IF₂₀₂₀ **6.41**; MEiN₂₀₂₁ = **100**).

4.4. Padariya, M., Fahraeus, R., Hupp, T., & Kalathiya, U. (2021). Molecular determinants and specificity of mRNA with alternatively-spliced UPF1 isoforms, influenced by an insertion in the 'regulatory loop'. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12744. <https://doi.org/10.3390/ijms222312744> (IF₂₀₂₀ **5.92**; MEiN₂₀₂₁ = **140**).

4.5. Padariya, M., & Kalathiya, U. (2022). The binding specificity of pab1 with poly(A) mRNA, regulated by its structural folding. *Biomedicines*, 10(11), 2981. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112981> (IF₂₀₂₁ **4.757**; MEiN₂₀₂₁ = **100**).

4.6. Padariya, M., Daniels, A., Tait-Burkard, C., Hupp, T., & Kalathiya, U. (2022). Self-derived peptides from the SARS-CoV-2 spike glycoprotein disrupting shaping and stability of the homotrimer unit. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 151, 113190. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113190> (IF₂₀₂₁ **7.419**; MEiN₂₀₂₁ = **100**).

4.7. Padariya, M., Sznarkowska, A., Kote, S., Gómez-Herranz, M., Mikac, S., Pilch, M., Alfaro, J., Fahraeus, R., Hupp, T., & Kalathiya, U. (2021). Functional interfaces, biological pathways, and regulations of interferon-related DNA damage resistance signature (IRDS) genes. *Biomolecules*, 11(5), 622. <https://doi.org/10.3390/biom11050622> (IF₂₀₂₀ **4.88**; MEiN₂₀₂₁ = **100**).

4.8. Padariya, M., Baginski, M., Babak, M., & Kalathiya, U. (2022). Organic solvents aggregating and shaping structural folding of protein, a case study of the protease enzyme. *Biophysical chemistry*, 291, 106909. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2022.106909> (IF₂₀₂₁ **3.628**; MEiN₂₀₂₁ = **70**).

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

IF – impact factor z roku publikacji pracy, a w przypadku braku IF dla danego roku, zastosowano IF z roku poprzedniego, **MEiN** – punktacja czasopism według Ministerstwa Edukacji i Nauki. Publikacje z poprzednich punktacji **MEiN** były punktowane zgodnie z nową punktacją **MEiN**.


Tłumacz przysięgły j. angielskiego
Nr rej. 1703/00

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych**c) Omówienie celu naukowego pracy i uzyskanych wyników wraz z omówieniem ich zastosowania****Wstęp**

Choroby związane z procesem starzenia, łącznie z nowotworami, stwarzają poważne obciążenia zdrowotne na całym świecie, dlatego też ogromną potrzebą jest opracowanie nowych leków terapeutycznych lub szczepionek, które mogą wpłynąć na rokowania pacjentów, a jednocześnie są pilnie potrzebne dla poprawy opieki zdrowotnej nad społecznością globalną. Nasz układ odpornościowy wykazuje dużą skuteczność w wykrywaniu i eliminowaniu różnych patogenów oraz komórek nowotworowych. Utrzymywanie lub wzmacnianie reakcji odpornościowej może być istotne w terapii nowotworów. Dodatkowo, medycyna precyzyjna lub medycyna personalizowana, poprawiając terapie ukierunkowane na konkretne grupy pacjentów onkologicznych, łączy różne kierunki naukowe, takie jak analiza dużych zbiorów danych, biologia strukturalna itp., co wymaga ciągłego opracowywania nowych potencjalnych leków. W tym kontekście moje działania naukowe obejmują opracowywanie modeli farmakoforowych różnych zestawów białek lub enzymów, opartych na interakcjach białko-białko, bądź na sieciach mRNA lub DNA. Szczegółowe zrozumienie strukturalnych perspektyw różnych składników zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną lub tłumienie nowotworów stanowi istotny krok w leczeniu nowotworów i infekcji wirusowych.

Gen p53 to czynnik transkrypcyjny, którego główną funkcją jest utrzymanie homeostazy komórkowej w odpowiedzi na sygnały stresu genotoksycznego. Zmutowany lub nadmiernie ekspresjonowany w ponad 30% typów nowotworów, jest jedną z najczęstszych zmian w nowotworach. Zwykle, po aktywacji gen p53 może powodować zatrzymanie cyklu komórkowego, starzenie się komórki lub apoptozę, w zależności od warunków i stresu [1]. Gen ten odgrywa kluczową rolę w chemioterapii i radioterapii różnych nowotworów. Z uwagi na tak ważne funkcje, jest oczywistym, dlaczego tak wiele ludzkich nowotworów wymaga utraty funkcji genu p53, by przejść w pełni złośliwy fenotyp. Aktywność tego genu jest różna w zależności od gatunku. Na przykład, konfiguracja genetyczna słonia z natury zapewnia różnorodność funkcjonalną mechanizmom zależnym od p53 znacząco przyczyniając się do precyzyjnej regulacji białka. Stanowi to wyraźny kontrast z organizmem ludzkim, gdzie w odpowiedzi na stres aktywowane są alternatywne izoformy jednego genu. Istnienie u słonia wielu form p53 o potencjalnie różnych aktywnościach dostarcza idealnego modelu do zrozumienia, w jaki sposób wykonywane i regulowane są aktywności tego genu. Faktycznie, badano substytucje dokonane przez izoformy retro genu, zmieniające domenę wiążącą DNA p53 i jego funkcje w powiązaniu z długowiecznością gatunku [2].

Ważne dla zrozumienia różnorodności genu p53 u słonia było badanie przeprowadzone przez Sulaka i współpracowników [3]. Badacze skupili się na rolach izoform retro genu (TP53RTGs), które tworzą "pulę chronionego p53" działając tym samym jako elementy przyczyniające się do zwiększonej wrażliwości komórek słonia na uszkodzenia DNA. Dwa modele (model "strażnika" lub model "oszusta") badają potencjalne role TP53RTGs w ułatwianiu stabilizacji kanonicznego p53 poprzez uczestnictwo w dimeryzacji z kanonicznym p53 lub poprzez działanie jako antagoniści rywalizujący o interakcję z mdm2 [3]. Badaliśmy ten, jak się wydaje, wyjątkowy system słonia głębiej skupiając się na interakcji p53–mdm2. Te interakcje są


dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

kluczowe, ponieważ p53 jest głównie regulowany przez mdm2, a ich interakcja zależy od motywu BOX 1 (znajdującego się w domenie aktywacyjnej TAD 1) [4], który jest wewnętrznie nieuporządkowany, co z kolei implikuje większe prawdopodobieństwo zmian ewolucyjnych [5]. Sugeruje to, że zidentyfikowane w sekwencjach BOX 1 słoni wariacje mogą potencjalnie modyfikować epitop wiążący mdm2, co z kolei zmienia poziomy ekspresji i aktywacji p53. Pomimo dużych rozmiarów ciała i długiego okresu życia, słonie wykazują dużą odporność na nowotwory. Umieralność z powodu raka szacuje się na <5%, gdzie u ludzi osiąga ona nawet 25%. Wykorzystując swoją wiedzę w dziedzinie biologii strukturalnej badałam właściwości strukturalne izoform p53 u słoni, aby przetestować hipotezę, że izoformy p53 indukują odrębne grupy białek p53 z wariacjami na epitopach oddziałujących z mdm2.

Wiele mutacji genów występujących w chorobach genetycznych, w tym w raku, prowadzi do wczesnych kodonów terminacyjnych (PTC) i szybkiego degradowania ich mRNA w mechanizmie degradacji mRNA, wywołanym przez kodony nonsensowne (terminacyjne) (NMD) [6]. Choroby genetyczne u ludzi są wywołane różnymi rodzajami mutacji, w tym mutacjami nonsensownymi, mutacjami zmiany ramki odczytu i mutacjami powodującymi alternatywne zdarzenia splicingowe, co prowadzi do pojawienia się kodonów terminacyjnych [PTC]. Szacuje się, że aż do 30% wszystkich mutacji wiążących się z chorobami genetycznymi u ludzi prowadzi do PTC [7]. Dodatkowo, wiele nabytych mutacji w raku, łącznie z tymi, które dezaktywują p53, prowadzi do pojawienia się PTC, (PTC) [8]. Transkrypty zawierające PTC są kierowane do szybkiej degradacji przed ich translacją na białko poprzez wieloetapowy proces zwany mechanizmem degradacji mRNA (NMD)). Molekularny mechanizm NMD nie został w pełni opisany, choć istnieją proponowane modele jego działania. Gdy kompleks translacyjny zatrzymuje się na kodonie terminacyjnym przed zespołem białkowym kompleksu łączącego egzony (EJC), czynniki uwolnienia eukariotycznego rekrutują helikazę RNA UPF1, kluczowy składnik mechanizmu NMD [9]. Wiadomo, że hamowanie NMD można osiągnąć za pomocą innych mechanizmów [8] i stwierdzono, że umiarkowane obniżenie poziomu UPF1 o 80% może tłumić aktywność NMD bez wpływu na proliferację i przeżycie komórek.

UPF1, RNA-zależna ATPaza, jest głównym regulatorem mechanizmu NMD, a jej zdolność do selektywnego wykrywania mRNA zawierającego PTC zależy od aktywności jej ATPazy i helikazy, a także od fosforylacji domen N- i C-końcowych. Biorąc pod uwagę wpływ "pętli regulacyjnej" w genie UPF1 oraz jej kontroli nad aktywnością katalityczną i/lub ATPazy, badałam interakcje obu izoform UPF1 w obecności lub braku mRNA poli(U) korzystając z zestawów danych uzyskanych techniką symulacji dynamiki molekularnej (MDS). Ponadto, stwierdzono, że UPF1 może skutecznie wiązać się z różnymi mRNA zawierającymi PTC, ale szczegóły molekularne pozostają wciąż niejasne. Dlatego też brałam udział w badaniu interakcji izoformy_1 UPF1 (posiadającej dłuższą "pętlę regulacyjną") z modelami transkryptów mRNA, zawierających PTC. Szczegółowo omówiono również istotne zmiany w wiązaniu izoformy_1 UPF1 z mRNA w przypadku wstawienia najczęściej występujących mutacji nowotworowych. Białko PAB1 jest sugerowane jako antagonistą UPF1 wobec aktywności jego mRNA, dlatego wzorzec wiązania obu tych białek z mRNA staje się bardzo istotny. Jednakże, praca autorstwa Chana i in. [10] wykazała, że usunięcie UPF1 lub PAB1 indukuje produkcję nowych peptydów (około 6-8-krotne zwiększenie) poprzez "przesunięcie ramki odczytu". Dlatego białka UPF1 i PAB1 zostały zbadane odpowiednio w obecności lub braku mRNA poli(U) i poli(A). Te nowatorskie perspektywy wynikające ze zidentyfikowanych


Tłumacz przysięgły j. angielskiego
Nr rej. TP/35/05

Strona | 6

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

par wiążących mRNA-białko mogą przyczynić się do zrozumienia selektywności odnośnych partnerów oraz do rozwijania dynamiki strukturalnej związanej z mechanizmem NMD.

Usunięcie genu UPF1 lub PAB1 prowadzi do powstania nowych peptydów odczytujących (read-through), które mogą wywołać odpowiedź immunologiczną lub aktywować układ odpornościowy. Te degradowane proteasomalnie peptydy są przenoszone przez transportery TAP1-TAP2. Transportery TAP należą do nadrodziny transporterów ABC (z kasetą wiążącą ATP). Te transportowane białkowe antygeny są prezentowane na cząsteczkach złożonych z kompleksu głównego zgodności tkankowej klasy I (MHC-I). Mutacje związane z rakiem oraz białka wirusowe mogą mieć wspólną tendencję wobec transportujących TAP, polegającą na osłabieniu ich aktywności. Podejmowane są znaczne wysiłki, aby zrozumieć peptydy przenoszone przez transportery TAP1-TAP2. Osłabiona funkcja TAP prowadzi do zmniejszonej ekspresji MHC-I na powierzchni komórek, ponieważ puste cząsteczki MHC-I nie są w stanie prezentować antygenów układowi odpornościowemu stanowiąc powszechny obiekt unikania odpowiedzi immunologicznej przez wirusy oraz nowotwory [11]. Około 15–20% wszystkich ludzkich nowotworów na świecie jest związanych z wirusami, przy czym odsetek ten może rosnąć w przyszłości. Kilka wirusów wykształciło czynniki blokujące funkcję TAP [12], w tym wirusy opryszczki, takie jak wirus Epsteina-Barr, ludzki wirus cytomegalii i wirus opryszczki typu 1, które utrzymują się przez całe życie w organizmie gospodarza [13]. Udowodniono związek tych wirusów z pewnymi typami nowotworów lub chorobami nowotworowymi u ludzi, a wiedza na temat celowanych przez nie obiektów oraz mechanizmów działania może być przydatna w opracowywaniu przyszłych strategii leczenia przeciwwirusowego [14]. W związku z tym, prowadziłam badania nad transporterami TAP1-TAP2 na poziomie atomowym skupiając się na tym, jak wirusy hamują przenoszenie peptydów przez TAP na poziomie molekularnym.

Dodatkowo, w rodzinie koronawirusów SARS stwierdzono białko szczytowe (S) w formie homotrimeru, w której poszczególne monomery odgrywają ważną rolę w składaniu funkcjonalnej struktury [15]. Zidentyfikowano dwie konformacje dla formy homotrimeru S, tj. pre-fuzję i post-fuzję [16]. Białko S w formie pre-fuzji jest stosunkowo mniej stabilne, domeny wiążące receptor (RBD) zmieniają się między konformacjami „górną” (otwartą) i „dolną” (zamkniętą) [17]. Pomimo różnych podejść do celowania w wirusa SARS-CoV-2, brakuje szczegółowego zrozumienia kierunku, który by blokował formację homotrimeru białka SARS-CoV-2 S. Biorąc pod uwagę niedawne badania nad mechanizmami fuzji białka S, postanowiliśmy zablokować formację homotrimeru lub uwięzienie ustabilizowanej konformacji pre-fuzji za pomocą peptydów S pochodzenia spontanicznego lub motywów liniowych. Ponieważ homotrimer jest jednostką funkcjonalną białka szczytowego, zakłócenie tej formacji homotrimeru mogłoby zablokować wejście wirusa do komórki gospodarza. Idąc za tą myślą zaproponowałam motywy liniowe, które, jak stwierdzono, są zaangażowane w oddziaływania białko-białko między monomerami homotrimeru S wewnątrz cząsteczki białka. Zoptymalizowana struktura białka SARS-CoV-2 [18] została wykorzystana do zidentyfikowania interakcji między monomerami i zaprojektowania liniowych motywów peptydów pochodzenia spontanicznego. W przypadku powodzenia, zablokowanie jednostki funkcjonalnej trimeru mogłoby mieć kilka istotnych skutków dla zrozumienia SARS-CoV-2; może on wywołać odpowiedź immunologiczną, a więc kluczowy składnik dla wakcynologii, a zablokowany monomer lub ustabilizowany homotrimer może wywołać produkcję przeciwciał o konformacji innej niż "otwarta".

Ewa NanowskaTłumacz przysięgły j. angielskiego
Nr rej. TP/36/05

Strona | 7

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

Moje kierunki badawcze w dużej mierze obejmują **optymalizację i rozwój ścieżek** umożliwiających badanie modeli farmakoforów, w oparciu o **strukturalne podstawy sieci białkowych lub enzymatycznych, zaangażowanych w procesy nowotworowe lub odpowiedź immunologiczną**. Publikacja numer 4.1. podkreśla strukturalne i funkcjonalne aspekty różnych izoform p53, które zachowują interakcję z mdm2 łącząc modelowanie *in silico* z badaniami *in vitro*. Strukturalna podstawa interfejsów p53-mdm2 może być wykorzystana do opracowywania wysoce specyficznych przeciwciał do celowania w neoantygeny i mutacje nowotworowe, trudne do celowania w tradycyjny sposób. Zestaw mutacji nowotworowych i składników wirusowych zadokowanych do kompleksu ładującego peptydy, w szczególności MHC-I i transporterów TAP, jest omówiony w publikacji nr 4.2. i 4.3. Inaczej, niż w przypadku TAP2, białka wirusowe destabilizują głównie białko TAP1. Cytosolowy "otwarty kanał" transportu białek TAP może przyjmować peptydy z cytozolu w kierunku ER i być celem dla białek wirusowych. **Większość białek wirusowych oddziałuje z regionami w PLC, które w nowotworach są silnie zmutowane**. Publikacje nr 4.4. i 4.5. dotyczą właściwości strukturalnych i selektywności białek UPF1 i PAB1, odpowiednio w interakcji z poli(U) i poli(A) mRNA. Modele farmakoforów zostały skonstruowane tak, by śledzić interakcje mRNA, które mogą mieć potencjalne zastosowanie **do przesiewania małych cząsteczek blokujących aktywność białka UPF1 lub w końcu szlaku NMD**. Liniowe motywy peptydowe zidentyfikowane podczas interakcji wewnątrzcząsteczkowej białko-białko pomiędzy monomerami szczytowego homotrimeru SARS-CoV-2, których celem było zablokowanie formacji homotrimeru, są przedstawione w publikacji 4.6. Równolegle, publikacje nr 4.7. i 4.8. wyjaśniają, odpowiednio, funkcjonalne interfejsy genów IRDS oraz wpływ głębokich rozpuszczalników eutektycznych na reszty aminokwasowe w miejscu aktywnym.

Szczegółowy opis publikacji zawartych w osiągnięciach naukowych

(i) Padariya, M., Jooste, M. L., Hupp, T., Fähræus, R., Vojtesek, B., Vollrath, F., Kalathiya, U., & Karakostis, K. (2022). The elephant evolved p53 isoforms that escape mdm2-mediated repression and cancer. *Molecular biology and evolution*, 39(7), msac149.

Cele pracy

U ssaków, gen p53 wyewoluował z genu p53/p63/p73, który dał początek trzem genom związanym z p53, o różnych rolach [19, 20]. Czynnikiem transkrypcyjny TP53 jest supresorem nowotworu o kluczowych rolach w onkogenezie. **Pełnej długości gen p53 obejmuje TAD I, który jest konieczny do indukcji docelowych genów p53 i czynników proapoptotycznych prowadząc do zatrzymania cyklu komórkowego (G1) lub apoptozy**. Jedno z ciekawych badań ujawniło, że słonie mają 20 kopii, czyli 40 alleli genów TP53, w porównaniu z typową liczbą jednej kopii stwierdzonej (do tej pory) u wszystkich innych ssaków [3]. Pomimo dużych rozmiarów ciała i długiego życia, słonie wykazują dużą odporność na raka, a śmiertelność wśród nich szacuje się na <5%, w porównaniu z ludźmi, u których sięga ona nawet 25% [21]. Zmienność lub skracanie **sekwencji izoform p53 słonia wskazuje na zwiększoną funkcjonalną różnorodność** oraz na tworzenie się różnorodnych pul funkcjonalnych białek p53. Zwiększałaby ona konkretne cechy strukturalne, nadające specjalizowane interfejsy interakcji kluczowym białkom funkcjonalnym, takim jak mdm2 i białka aktywujące.

Ewa Nanowska

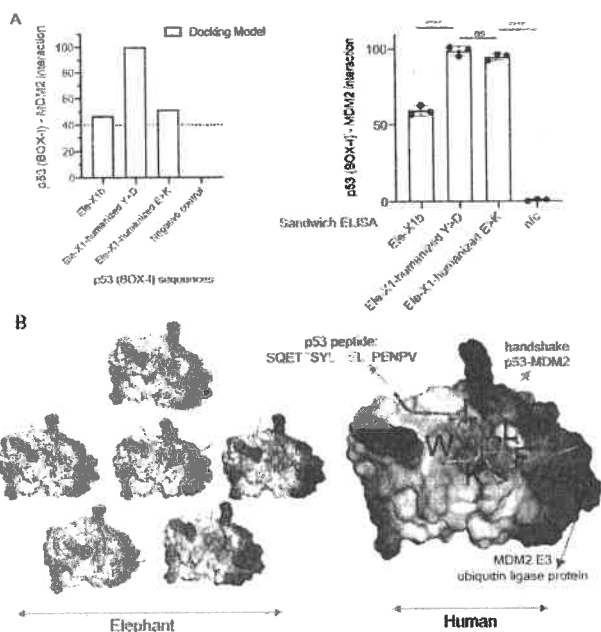
Tłumacz przysięgły j. angielskiego
Nr rej. TP/36/05

Strona | 8

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

W normalnych warunkach, ligaza E3 ubikwityny mdm2 wiąże białko p53 przez motyw BOX-I i katalizuje poliubikwytynację p53 kierując ją do degradacji przez szlak proteasomalny 26S [5]. Sugeruje to, że warianty zidentyfikowane na sekwencjach BOX I słonia potencjalnie modyfikują epitop wiążący mdm2, a tym samym zmieniają poziomy ekspresji i aktywacji p53. Badając molekularną ewolucję systemu p53-mdm2 zbadaliśmy strukturalne i funkcjonalne aspekty izoform p53 zachowujących interakcję z mdm2 łącząc modelowanie *in silico* i badania *in vitro*. We współpracy z dr hab. inż. Umeshem Kalathiya (z Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk) stworzyłam wstępne struktury motywów BOX-I izoform p53 słonia, aby przetestować hipotezę, że izoformy p53 indukują odrębne pule białek p53 z wariantami na epitopach oddziałujących z mdm2. Niesie to istotne implikacje dla różnorodności funkcjonalnej i integracji różnorodnych wyników sygnalizacji. Ponadto, mając na względzie strukturę ludzkiego mdm2 jako szablonu, zastosowałam technikę modelowania homologii i skonstruowałam strukturę białka mdm2 słonia. Konkretny zestaw izoform p53 słonia został przeze mnie zadokowany do ligazy ubikwityny E3 mdm2, aby zidentyfikować powinowactwo wiązania i wzór konformacji genu p53 (słoń *L. african*). Porównując nasze wyniki z wcześniejszymi modelami, omówiliśmy potencjalne spostrzeżenia dotyczące translacji, a wynikające z ewolucji molekularnej (międzygatunkowej) osi p53-mdm2 i wyewoluowanych modułów strukturalnych. Dodatkowo, zastosowaliśmy peptydy syntetyzowane *in vitro* i rekombinowane wersje ludzkiego mdm2, aby eksperymentalnie potwierdzić interakcje *in vitro* stosując kanapkowy test ELISA (Rys. 1).



Rysunek 1. Interakcja N' terminalna (BOX-I) mdm2-p53 z obliczonymi wartościami dokowania GBVI/WSA dG (-kcal/mol) i znormalizowanymi odczytami ELISA. (A) Model dokowania interakcji MDM2 ze zmutowanym p53 słonia Typu A: humanizowany Y>D lub E>K. Humanizowane sekwencje p53 słonia wykazują zwiększoną zdolność dokowania w porównaniu z wt p53 X1 słonia. Wartości powinowactwa wiązania zostały znormalizowane, przy czym najwyższą wartość ustawiono na 100. (B) Ilustracja modeli dokowania peptydów mdm2-p53, wyjaśniająca związek każdego peptydu p53 z mdm2 u ludzi i słoni. Hydrofobowość zwizualizowano na niebiesko dla hydrofilowych i na brązowo dla hydrofobowych.

Opis wyników

Zapobieganie zdolności izoform p53 do wiązania się z mdm2 bezpośrednio promuje stabilizację, aktywację oraz funkcje sygnałowe p53. Interakcje p53-mdm2 służą nie tylko do kontrolowania ekspresji p53, ale również jako ligandy do kontrolowania ich odpowiednich

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

konformacji i funkcji. Wprowadziliśmy izoformy p53 ze słoni jako interesujący system modelowy do badań strukturalnych interakcji p53–mdm2 (Rys. 1). Retrogen 12 wraz z retrogenami 14, 15, 16 i 18 tworzą grupę "Typ F", która wykazuje słabe wiązanie z mdm2, co silnie wskazuje na to, że te putatywne białka unikają regulacji zależnej od mdm2. Ponadto, nasza analiza *in silico* oraz eksperymentalne wyniki ELISA pokazują, że wszystkie peptydy zawierające wariant W>G wykazują zmniejszoną aktywność wiązania z mdm2 (Rys. 1). Dopasowanie sekwencji słonia BOX-I kanonicznych p53 i TP53RTG ilustruje co najmniej dwa istotne podstawienia, które są konserwatywne we wszystkich TP53RTG (W>G i N>K). Fakt ten wskazuje, że te sekwencje pochodzą z początkowej, wspólnej duplikacji. Słoniowa izoforma BOX-I Typ F ma wariant E do G w reszcie 17. Zauważyliśmy, że warianty na E17 w ludzkim p53 to mutacje nowotworowe, często związane z nowotworami żeńskich narządów płciowych. Ponadto, mutacje międzygatunkowe Y>D i E>K wykazały zwiększoną efektywność dokowania. Te warianty przyczyniają się do tworzenia zmienionych struktur p53 BOX-I, co skutkuje różnorodnością zdolności interakcji tych izoform.

Znaczenie wyników

Naturalnie wyewoluowany system genomu słonia, który endogennie ekspresuje różne skrócone i zmienne sekwencje p53, stanowi idealny model do badania wieloaspektowych funkcji p53. Nasze odkrycie dostarcza strukturalnych podstaw interfejsów p53–mdm2, które mogą być wykorzystane do tworzenia wysoce specyficznych przeciwciał kierowanych przeciwko neoantygenom i mutacjom nowotworowym, trudnym do celowania w tradycyjny sposób. Wgląd w modyfikacje strukturalne i aktywację w kierunku mechanizmów sygnałowych rzuca światło na czynniki zapobiegające lub promujące karcynogenezę. Nasze ustalenia dotyczące izoform p53 mogą pomóc zrozumieć, jak ich odpowiednie aktywności są regulowane w odpowiedzi na uszkodzenia komórkowe i infekcje patogenami. Przyczyni się to do lepszego zrozumienia ról i regulacji p53 u słoni oraz jego roli w ochronie słoni przed nowotworami oraz prawdopodobnie innymi „dolegliwościami”, takimi jak pasożyty. Dodatkowo, ułatwi to rozwój nowych strategii terapeutycznych dla ludzi, opartych na strukturalnych danych molekularnych. Przewidujemy, że nasze obserwacje i wnioski będą stanowić solidną podstawę do dalszych eksperymentów mających na celu ustalenie, jak każda izoforma przyczynia się do aktywacji p53 z powodu zmienności strukturalnej (Rys. 1). Po raz pierwszy taka metodyka pokazuje, jak symulacje dokowania *in silico* mogą być zastosowane do badania funkcjonalnych aspektów izoform p53, co stanowi podstawę dla perspektywicznych badań mających na celu zbadanie dynamiki interakcji z mdm2 w warunkach indukujących stres. Podsumowując, nasze badanie dotyczy mechanizmów, dzięki którym geny supresorowe nowotworów i duplikacje regulują starzenie się komórek wpływając na długość życia i masę ciała.

(ii) Padariya, M., Kote, S., Mayordomo, M., Dapic, I., Alfaro, J., Hupp, T., Fahraeus, R., Kalathiya, U. (2021). Structural determinants of peptide-dependent TAP1-TAP2 transit passage targeted by viral proteins and altered by cancer-associated mutations. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 5072–5091.

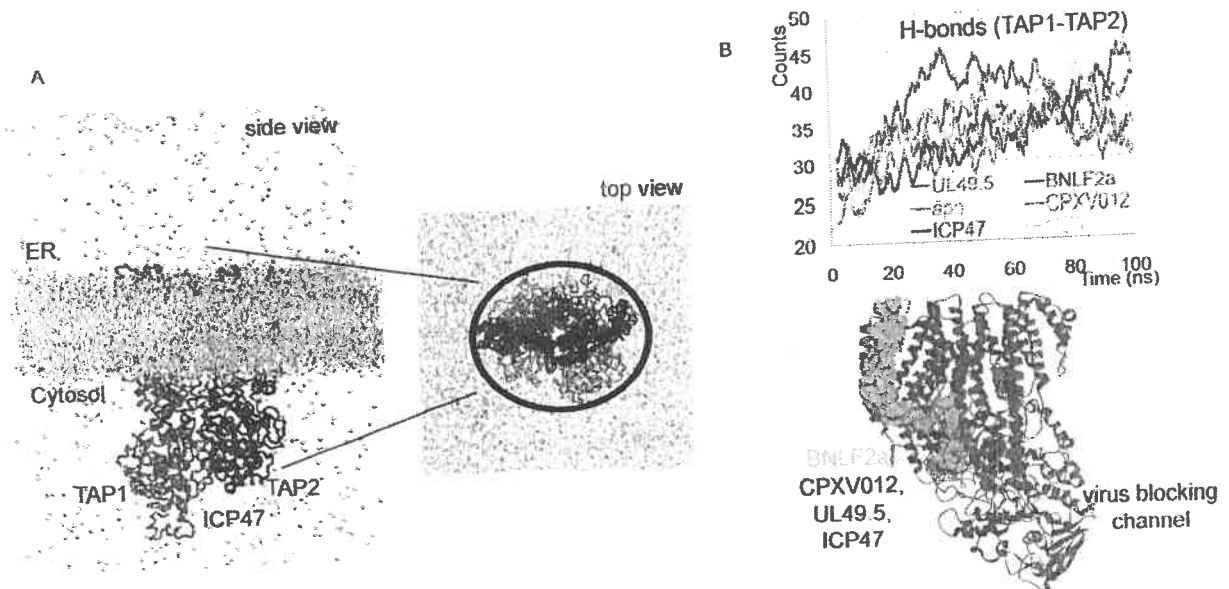
Cele pracy

Większość peptydów prezentowanych przez MHC-I jest wytwarzana w cytozolu przez proteasom i transportowana do światła retikulum endoplazmatycznego (ER) w celu dalszej obróbki przez aminopeptydazy ERAP, zanim zostaną one załadowane na cząsteczki MHC-I

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

przez dynamiczny wieloskładnikowy kompleks łądzący peptyd (PLC) [22]. Transportery TAP stanowią kluczowe funkcjonalne składniki ścieżki prezentacji antygenów, ponieważ łączą cytozolową pulę peptydów z PLC oraz cząsteczkami MHC-I mieszczącymi się w ER [22]. Niefunkcyjalny TAP prowadzi do zmniejszonej ekspresji MHC-I na powierzchni, ponieważ puste cząsteczki MHC-I nie są w stanie prezentować antygenów układowi odpornościowemu i stanowią częsty cel unikania odporności wirusowej, jak i nowotworowej [11]. Zmniejszona odpowiedź immunologiczna została powiązana z osłabioną ekspresją TAP, co mogło być wynikiem zmian strukturalnych lub dysregulacji [23]. Kilka wirusów wyewoluowało czynniki blokujące funkcję TAP [12], w tym herpeswirusy, takie jak wirus Epsteina-Barr, ludzki cytomegalowirus i wirus opryszczki pospolitej typu 1, które trwale bytują w gospodarzu. Wykazano związek tych wirusów z pewnymi typami raków lub nowotworów u ludzi, a wiedza o ich celach, jak również mechanizmach działania, może być przydatna w rozwoju przyszłych strategii leczenia przeciwwirusowego. W związku z tym, badałam transportery TAP1-TAP2 na poziomie atomowym skupiając się w szczególności na tym, jak wirusy hamują translokację peptydów za pośrednictwem TAP na poziomie molekularnym. Badania objęły symulacje dynamiki molekularnej następujących białek wirusowych unikających odporności atakujących TAP: BNLF2a z wirusa Epsteina-Barr, CPXV012 z wirusa krowianki, ICP47 z wirusa opryszczki pospolitej typu 1, US6 z ludzkiego cytomegalowirusa i UL49.5 kodowanego przez varicellovirusa. Ponadto, badaliśmy selektywność transportu peptydów przez TAP, wśród których znajdują się peptydy pochodzące z zestawów danych immunopeptydomu po leczeniu IFN-gamma w komórkach czerniaka. We współpracy z dr hab. inż. Umeshem Kalathiyą (z Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk), uczestniczyłam w konstruowaniu modelowanych struktur dla peptydów oraz przewidywaniu ich powinowactwa / wzorów dokowania z transporterami TAP.



Rysunek 2. Interfejsy wiążące różnych białek wirusowych (BNLF2a, CPXV012, ICP47, US6, and UL49.5) z transporterami TAP1-TAP2. **(A)** Jedna komórka dynamiki molekularnej w okresowych warunkach brzegowych (na przykład oddziaływania wodorowe (prawy panel), zawiera białka, wodę i jony. **(B)** Międzycząsteczkowe oddziaływania wodorowe (prawy panel), powstałe pomiędzy białkami TAP1 i TAP2 podczas symulacji dynamiki molekularnej i o obłożeniu >10%, w obecności i przy braku różnych białek wirusowych. Dolny panel pokazuje konformację białek wirusowych blokujących kanał transportowy transporterów TAP1/2.

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

Opis wyników

Białka wirusowe (BNLF2a, CPXV012, ICP47, US6, UL49.5 itp.) mogą znacząco manipulować procesem transportu peptydów łącząc się bezpośrednio z transporterami TAP1 lub TAP2. Dane dynamiki molekularnej ujawniły, że większość białka wirusowego destabilizuje głównie TAP1, a nie sam TAP2 (Rys. 2). Konkretnie, dla TAP1 taką widoczną różnicę wykryto dla UL49.5 i BNLF2a, podczas gdy w przypadku TAP2 największą fluktuację wywołał UL49.5, a najmniejszą BNLF2a. Dynamika strukturalna kompleksu TAP1-TAP2 w obecności i przy braku białka wirusowego wykazała, że we wszystkich **symulowanych systemach domeny TAP NBD tworzyły ruch wychylenia w kierunku błony cytozolu**. Takie przemieszczenie domen TAP NBD tworzy przejście w kanale transportowym tworzonym przez TAP1 i TAP2, otwarte w kierunku cytozolu. Z tych danych można wysunąć wniosek, że **otwarcie lub zamknięcie cytozolowego przejścia przez transportery TAP (domeny TAP NBD) może być związane z hydrolizą ATP**, a tym samym skutkować bezpośrednią prezentacją peptydów kompleksowi PLC. Ten **cytozolowy kanał transportowy białek TAP w stanie otwartym może przyjmować peptydy z cytozolu w kierunku ER i był celem 4 (BNLF2a, CPXV012, ICP47 i UL49.5) z 5 badanych białek wirusowych blokujących transport kanałem** (Rys. 2). Międzycząsteczkowe oddziaływania transporter-wirus w połączeniu z danymi SNPs i mutacjami nowotworowymi sugerują, że w przypadku białka TAP1 regiony o niższej częstotliwości SNPs oraz kilka wariantów nowotworowych wykazywało wyższe oddziaływania z czynnikami wirusowymi. Przeciwnie też, czynniki wirusowe wiążą się ze silnie zmutowanymi regionami TAP2, a większa liczba reszt z **TAP1 uczestniczyła w oddziaływaniach z komponentami wirusowymi** niż to ma miejsce w przypadku genu TAP2. Aminokwasy TAP1 z helis 4-6, a także z zakresu reszt 1-50 aa, znajdujące się blisko kanału transportowego, okazały się oddziaływać z czynnikami wirusowymi.

Znaczenie wyników

Nasza praca daje wgląd w strukturalne i funkcjonalne aspekty architektury molekularnej transportu peptydów przez transportery TAP1 i TAP2 oraz mutacje nowotworowe, a także w różne czynniki wirusowe celujące w białka TAP, które mogą hamować ścieżkę klasy MHC I. Skutkuje to uniknięciem odpowiedzi immunologicznej przez komórkę nowotworową i/lub przenoszącą wirus. Aby zbadać kinetykę procesu transportu peptydów, przeanalizowano różne zestawy danych immunopeptydomowych (peptydy związane z MHC-I, prezentowane przez komórki czerniaka A375). Białka wirusowe destabilizują przede wszystkim białko TAP1, nie TAP2, zwłaszcza w przypadku UL49.5 i BNLF2a. Spośród badanych białek wirusowych białko **UL49.5 wykazywało największe fluktuacje, zaś BNLF2a było najbardziej stabilne**. Dynamika strukturalna kompleksu TAP1-TAP2 w obecności i pod nieobecność białka wirusowego w kompleksie ujawniła, że we wszystkich symulowanych systemach **domeny TAP NBD tworzyły ruch wychylenia w kierunku cytozolu, co generuje przejście, czyli otwarcie kanału transportowego w kierunku cytozolu**. Ten cytozolowy kanał był celem dla 4 (BNLF2a, CPXV012, ICP47 i UL49.5) spośród 5 badanych białek wirusowych (Rys. 2). Białka wirusowe BNLF2a, CPXV012 i ICP47 tworzyły większą liczbę oddziaływań z TAP1, podczas gdy UL49.5 i US6 wykazywały stosunkowo jednakowe oddziaływania z oboma białkami TAP. Ponadto, regiony TAP1 o **niższej częstotliwości SNP i warianty nowotworowe tworzyły wyższe oddziaływania z czynnikami wirusowymi**, podczas gdy białko wirusowe wiązało się z regionem TAP2, który jest silnie zmutowany. Wyjątkowo, białko US6 wchodziło w unikalne oddziaływania z transporterami, podczas gdy inne czynniki

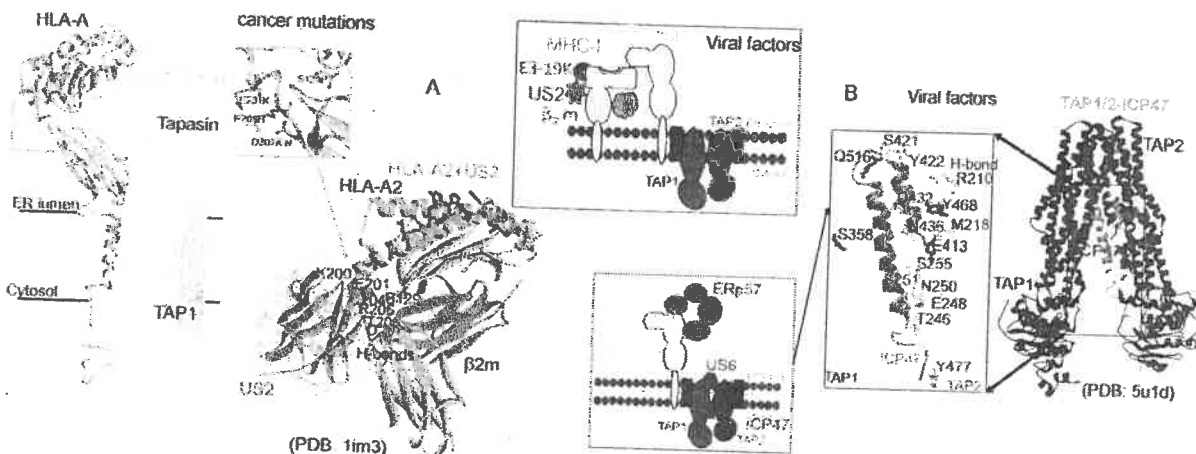
dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

wirusowe, BNLF2a/CPXV012/ICP47/ UL49.5, miały kilka wspólnych aminokwasów wiążąc się z białkami TAP. Wyniki te dostarczają modelu sposobu, w jaki wirusy i mutacje związane z rakiem, celujące w interfejsy TAP mogą wpływać na prezentację antygeny MHC-I, a także jak szlak IFN-gamma modyfikuje prezentację antygeny MHC-I poprzez kinetykę transportu peptydów.

(iii) Padariya, M., Kalathiya, U., Mikac, S., Dziubek, K., Tovar Fernandez, M. C., Sroka, E., Fahraeus, R., & Sznarkowska, A. (2021). Viruses, cancer and non-self recognition. Open biology, 11(3), 200348.

Wirusy były i nadal są nieocenionym źródłem wiedzy na temat różnych aspektów biologii komórkowej. Wirus mięsaka Rousa wykazał onkogenezę wirusową, podczas gdy wirusy małop, ludzkie adenowirusy (HAdV) i wirusy brodawczaka ludzkiego (HPV) otworzyły drogę do identyfikacji białek supresorowych nowotworów p53 i białka siatkówczaka (pRB) [24]. Podobnie, wirusy odegrały ważną rolę w naszym zrozumieniu, jak układ odpornościowy rozróżnia własne białko od obcych, zarówno pod względem tego, jak wrodzona odpowiedź wykrywa wzorce patogenów oraz w jaki sposób odpowiedź odpornościowa swoista specyficznie wykrywa obecność neoantygenów na cząsteczkach MHC. Wirusy funkcjonalne, które utrzymują się przez całe życie (latencję) u ludzi, takie jak herpeswirus gamma wirus Epsteina-Barr, ludzki wirus cytomegalii, czy herpeswirus związany z mięsakiem Kaposiego, są obecne u większości populacji, przy czym każdy wirus wyewoluował równowagę z określonym typem komórek gospodarza [25]. Strategie unikania odpowiedzi immunologicznej przez wirusy również ilustrują, że procesy, w których komórki wykrywają i prezentują obcy materiał genetyczny układowi odpornościowemu, są powiązane z innymi szlakami komórkowymi. Unikanie odpowiedzi immunologicznej jest także celem komórek nowotworowych, a bardziej szczegółowe spojrzenie na interfejsy między czynnikami wirusowymi a składnikami kompleksu ładowania peptydów klasy MHC I wskazuje, że interfejsy te są również celem mutacji nowotworowych. Pod względem punktu kontrolnego układu odpornościowego strategie wirusowe i nowotworowe wydają się jednak różne.



Rysunek 3. Wiązanie białek wirusowych z różnymi regionami kompleksu ładującego peptydy w porównaniu z wariantami aminokwasów (pobranymi z cBioPortal) z różnych typów nowotworów. (A) Mutacje w HLA-A różnych typów nowotworów (mutacje zaznaczone kolorem zielonym) w porównaniu z powierzchnią interakcji wirusa z HLA-A2. Interakcje wiązań wodorowych pomiędzy białkami wirusowymi US2, US3 i E3/19k z HLA-A2 zaznaczone na

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

strukturze białka kolorem czerwonym. **(B)** Mutacje nowotworowe TAP1 i TAP2 przedstawiono odpowiednio na czerwono i żółto. Reszty białka wirusowego ICP47, zaangażowane w interakcję wiązań H z ICP47 z TAP1 i TAP2 są przedstawione jako pałeczki oznaczone odpowiednio kolorem niebieskim i fioletowym.

Aby wykryć i zniszczyć komórki przenoszące wirusa, nasz układ odpornościowy eliminuje komórki uszkodzone lub szkodliwe. **W przypadku unikania odporności zarówno przez wirusy, jak i nowotwory, ekspresja neoantygenów na cząsteczkach MHC-I odgrywa kluczową rolę (Rys. 3)**, dlatego można oczekiwać, że cele unikania odporności przez wirusy i nowotwory są podobne. Rzeczywiście, **obniżenie poziomu cząsteczek MHC-I jest częste w przypadku nowotworów, aw przypadku wirusów jest powszechnym celem**. Kompleks TAP jest celem kilku czynników wirusowych, a ICP47 z wirusa opryszczki pospolitej blokuje TAP w nieaktywnej konformacji uniemożliwiając spełnienie przezeń jego roli w PLC [26]. Podobnie, glikoproteina US6 kodowana przez HCMV wchodzi w interakcję z podjednostką TAP1 i blokuje wejście peptydu do ER. Ponadto, celem US2 są zmiany konformacyjne TAP1, związane z ATP, a konieczne dla transportu peptydów z cytozolu do ER [27]. Aby dokładniej przyjrzeć się **interfejsom między białkami wirusów a mutacjami nowotworowymi, skonstruowałam kompletne struktury komponentów ładowania peptydu (MHC I, β 2m, kalretikulina, ERp57, tapasyna, TAP1 i TAP2; Rys. 3)**, które **ilustrują wspólne strategie wirusów i nowotworów**. Ludzki cytomegalowirus US3 wiąże się z MHC-I w ER i zakłóca zależne od tapasyny ładowanie peptydu. Dla czynnika wirusowego US6 skonstruowałam model struktury przy użyciu podejścia modelowania homologicznego, po czym czynnik ten został następnie dokowany z transportem TAP1/TAP2.

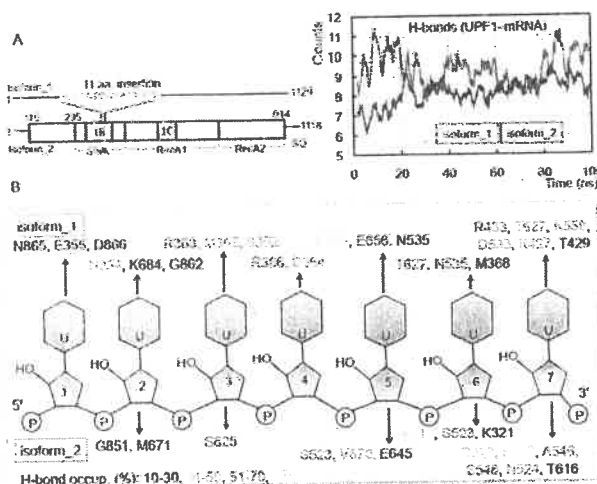
Aby zlokalizować mutacje pochodzące od nowotworów w różnych strukturach typów HLA (HLA-A, HLA-B i HLA-C), zebrałam zbiory danych z atlasu genomu nowotworowego (TCGA) oraz baz danych cBioPortal (Rys. 3). Mutacje nowotworowe sugerują, że mimo istnienia podobieństw między typami HLA, kilka mutacji występuje tylko w konkretnej cząsteczce HLA oraz w domenie α 3 i domenach transbłonowych. Co więcej, **cząsteczki HLA-A mają ogólnie więcej zmutowanych reszt niż HLA-B i -C**. Z kolei HLA-C wykazuje więcej mutacji w rowku wiążącym peptydy, i – co ciekawe – HLA-C jest głównym hamującym ligandem dla receptorów immunoglobulinopodobnych (KIRs), co może pomóc wyjaśnić, dlaczego wirusy i nowotwory różnie atakują ten haplotyp. **Większość białek wirusowych wchodzi w interakcje z regionami w PLC silnie zmutowanymi w nowotworach**. Na przykład, czynniki wirusowe US2 i E3/19K, tworzą interakcje wiązań wodorowych z resztami HLA-A2 zmutowanymi w różnych typach nowotworów. Podobnie, czynniki wirusowe UL18 wiążą się z resztami β 2m, które są najczęściej zmutowane w różnych typach nowotworów. W szczególności, patrząc na transportery TAP z kompleksu PLC, białko wirusowe ICP47 tworzy wiązania wodorowe z czterema aminokwasami (S358, E413, Y468 i Q516) białka TAP1, z których dwie reszty (S358F i Q516K) są zmutowane w nowotworze. Na podstawie obserwacji białek wirusowych (US2, E3/19K, ICP47 i UL18) oraz mutacji nowotworowych można sugerować, że mają wspólny interfejs do ingerowania w PLC.

(iv) Padariya, M., Fahraeus, R., Hupp, T., & Kalathiya, U. (2021). Molecular determinants and specificity of mRNA with alternatively-spliced UPF1 isoforms, influenced by an insertion in the 'regulatory loop'. International journal of molecular sciences, 22(23), 12744.

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych**Cele pracy**

Nieprawidłowe, niepoprawnie sfałdowane i źle ułożone białka są niebezpieczne dla żywotności komórek z powodu ich toksyczności. Takie białka mogą być przyczyną wielu chorób u ludzi, takich jak choroba Parkinsona i Alzheimerera, otępienie czołowo-skroniowe, mukowiscydoza i kilka innych [28]. Szczególnie na poziomie mRNA obserwuje się dwie kluczowe cechy: albo (i) mRNA zawiera poprawny zestaw białek związanych z konkretnym mRNA, albo (ii) potencjał kodujący mRNA jest nienaruszony. W tym miejscu, szlak NMD (nonsense-mediated mRNA decay) radzi sobie z tym drugim, degradując mRNA zawierające PTC, co w konsekwencji zmniejsza akumulację potencjalnie toksycznych, skróconych białek [29]. Ze względu na zdolność wykrywania PTC w celu przyspieszenia degradacji nieprawidłowego mRNA, NMD jest ważnym modulatorem fenotypów chorób genetycznych u ludzi [30]. Białko UPF1 jest kluczowym składnikiem szlaku NMD, nazywanym również głównym regulatorem. Poprzez biochemiczne i jednocząsteczkowe testy wykazano, że pewien element strukturalny moduluje aktywność katalityczną UPF1, nazywany "pętlą regulacyjną". Co ciekawe, u ssaków istnieją dwie alternatywnie splicowane izoformy UPF1, które różnią się jedynie długością "pętli regulacyjnej" [31]. Izoforma UPF1_1 zawiera insercję 11 aa (aminokwasów) (353-GNEDLVIIWLR-363) w domenie 1B, co przedłuża "pętlę regulacyjną" do 22 aa. Uwzględniając taki wpływ "pętli regulacyjnej" na dynamikę strukturalną UPF1 i jej kontrolę aktywności katalitycznej i/lub ATPazy, zbadaliśmy obie izoformy UPF1 w obecności lub pod nieobecność poli(U) mRNA stosując technikę symulacji dynamiki molekularnej. W trajektoriach wygenerowanych we współpracy z dr. hab. inż. Umeshem Kalathiyą (z Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk), śledziłam interakcje wiązań wodorowych i stabilność obu izoform UPF1 (insercja 11aa) z poli(U)-mRNA. Ponadto, brałam udział w analizie mutacji nowotworowych UPF1 A839T i UPF1 P533/LT wpływających na wiązanie UPF1-mRNA (Rys. 4). W pracy tej zbadaliśmy różne motywy mRNA bogate w AU lub GC z białkiem UPF1, a ja uczestniczyłam w wygenerowaniu zestawu kilku modeli struktury mRNA, koniecznych dla projektu.



Rysunek 4. Przyjęte wzory wiązania przez UPF1 (izoforma_1) z różnymi motywami mRNA. (A) Częstotliwość liczby interakcji wiązań wodorowych, tworzonych między UPF1 (izoforma_1) a różnymi motywami bogatymi w GC lub AU. (B) Różnorodność w wiązaniu izoform UPF1 z poli(U) mRNA, odzwierciedlona w ich dynamice strukturalnej. Poszczególne aminokwasy UPF1 tworzą trwałe interakcje z nukleotydami o zajętości $\geq 10\%/ns$.

Opis wyników

Interfejsy wiązania oraz liczba interakcji białko-mRNA (wiązań wodorowych; H-bond) sugerują, że izoforma_1 UPF1 ma większą liczbę interakcji z poli(U) mRNA niż izoforma_2 UPF1 (Rys. 4). Śledziłam reszty skutkujące stabilnym wiązaniem wodorowym z indywidualnym mRNA (zajętość $> 10\%/ns$). Okazało się, że izoforma_1 UPF1 tworzy interakcje z każdym nukleotydem poli(U) mRNA, podczas gdy izoforma_2 nie ma takiego

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

wzoru wiązania. Oprócz wielu specyficznych dla izoformy interakcji UPF1-mRNA, następujące aminokwasy (izoforma_2/izoforma_1) były wspólne dla interakcji z mRNA w obu izoformach UPF1: G851/G862, E645/E656, D622/D633, R422/R433, N524/N535 i T616/T627 (Rys. 4). **Obecność insercji 11 aa w „pętli regulacyjnej” dla izoformy_1 UPF1 stworzyła interfejs dla kilku reszt do tworzenia interakcji H-bond z motywami mRNA – szczególnie reszty E355, N354 i R363 były zaangażowane w takie wiązanie.** Dynamika różnych izoform UPF1 w trakcie symulacji MD (100 ns) pokazuje, że insercja 11 aa w „pętli regulacyjnej” indukuje ruchy między domenami 1B i RecA2. Mutacja punktowa często zmienia normalne funkcjonowanie białek. Z tego powodu, uczestniczyłam w badaniu takiego wpływu na aktywność helikazy UPF1 (izoforma_1) po **wprowadzeniu powszechnie występujących wariantów nowotworowych UPF1 w obecności poli(U) mRNA (A839T i P533LT; cBioPortal)** umieszczonych na interfejsie wiązania mRNA. Po wprowadzeniu mutacji do białka UPF1 zaobserwowano zmniejszenie wiązań białko-mRNA, przy czym takie znaczące zmiany zostały zarejestrowane dla systemu UPF1 P533T.

Znaczenie wyników

Insercja może indukować aktywność katalityczną i/lub ATPazową, jak ustalono doświadczalnie; jednakże kinetyka i informacje na poziomie molekularnym nie są w pełni rozumiane. Alternatywnie splatające się izoformy UPF1 mogą się łączyć z różnymi motywami mRNA i dlatego przeanalizowano dynamikę strukturalną przez wstawienie mutacji nowotworowych w kieszeń wiążącą mRNA UPF1. Ponadto, **skonstruowałam model farmakoforu śledzącego interakcje UPF1-poli(U) mRNA, które mogłyby być potencjalnie użyte do przesiewania małych cząsteczek blokujących aktywność białka UPF1, albo ostatecznie przy szlaku NMD (Rys. 4).** W związku z tym, nasze ustalenia sugerują, że insercja 11 aa (353-GNEDLVIIWLR-363) w „pętli regulacyjnej” może być odpowiedzialna za konformacje „otwarte (izoforma_2), i „zamknięte (izoforma_1),” pomiędzy domenami 1B i RecA2, co może wpływać na katalityczną aktywność helikazy UPF1. Stwierdzono, że aminokwas znajdujący się na pozycji 533 w białku izoformy_1 UPF1 wchodzi w interakcję z mRNA zarówno w zmutowanym systemie (UPF1 P533L/T), jak i w systemach typu dzikiego, podczas gdy systemy UPF1 A839T wchodzi w charakterystyczne interakcje z motywem mRNA. **Szczególnie w zmutowanych systemach związanych z nowotworem, motyw mRNA z UPF1 P533T nie ma interakcji układających się, przez co odległość między domenami 1B-RecA2 wzrasta, a międzycząsteczkowe interakcje białko-mRNA wykazują trend spadkowy.** Na podstawie tych danych można postawić hipotezę, że zwiększone powinowactwo między składnikami UPF1-mRNA powinno przyczyniać się do zwiększonej aktywności ATPazy/helikazy zależnej od RNA białka UPF1, która jest niezbędna dla szlaku NMD. Te nowatorskie spojrzenia, wynikające ze identyfikowanych par wiążących mRNA-UPF1 mogą przyczynić się do zrozumienia selektywności odnośnych partnerów, a także do rozwoju dynamiki i kinetyki związanej z NMD.

(v) Padariya, M., & Kalathiya, U. (2022). The binding specificity of PAB1 with poly(A) mRNA, regulated by its structural folding. *Biomedicines*, 10(11), 2981.

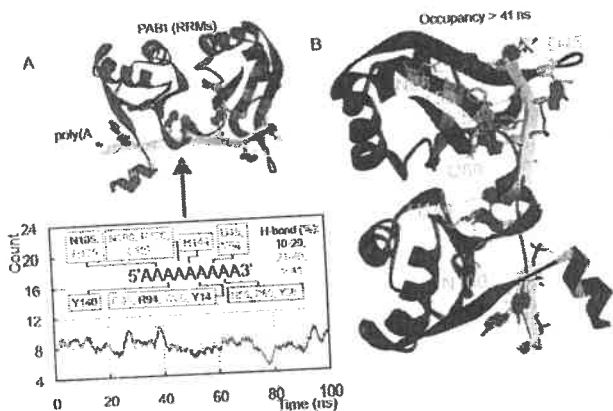
Cele pracy

Eukariotyczne mRNA z ogonami poli(A) wiążą się z białkami wiążącymi poli(A), specyficznymi dla sekwencji pośrednicząc w syntezie tych ogonów [32]. Jednym z takich białek jest **białko wiążące poli(A) cytoplazmatyczne 1 (PAB1 lub PABPC1), związane z długimi ogonami**

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

mRNA poli(A) i indukujące jego stabilność. Przełącznik konformacyjny genu eIF4G zależy od ekspresji PAB1, tj. w normalnych komórkach o niskiej ekspresji PAB1 brakuje wiązania eIF4G-PAB1, podczas gdy w komórkach nowotworowych o wysokiej ekspresji PAB1 wiązanie między tymi białkami jest indukowane [33]. Kluczowe role białka wiążącego poli(A) w regulowaniu terminacji translacji zostały zbadane. Nieskuteczna terminacja może prowadzić do aktywacji procesu NMD (rozpoczynającego degradację mRNA). Różne badania biochemiczne i strukturalne wskazują wzory wiązania między motywami rozpoznawania RNA z mRNA poli(A), jak również interakcje z różnymi komponentami. Nadal jednak potrzebny jest szczegółowy wgląd w składanie strukturalne i dynamikę pełnej długości ludzkiego białka PABPC1. Ze względu na znaczącą korelację między degradacją mRNA a stabilizacją, w niniejszej pracy zbadalam dynamikę białka PABPC1 jednocześnie śledząc specyfikę wiązania mRNA. Ponadto, uwzględniając różne mutacje nowotworowe białka PABPC1, przedstawiłam przegląd różnych punktów krytycznych [34] wraz z pomiarami zmiany stabilności struktury po wprowadzeniu punktowych mutacji (Rys. 5). W celu monitorowania selektywności mRNA dla pełnej struktury PAB1, skonstruowałam modele z mRNA poli(A) implementując podejście modelowania homologicznego/dynamiki molekularnej (Rys. 5).



Rysunek 5. Wzory wiązania PABPC1 z mRNA poli(A). (A) Interakcje międzycząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy mRNA PAB1-poli(A), a także poszczególnych aminokwasów oddziałujących z nukleotydami o obłożeniu $\geq 10\%$ lub nanosekundach (ns) zostały podkreślone. (B) Pozycja reszt o dużym obłożeniu ($> 41\%$) i wzór ich wiązania z mRNA poli(A), reprezentowany przez strukturę PABPC1.

Opis wyników

Poli(A)mRNA oddziałuje z PABPC1, co indukuje stabilność reszt białkowych. Ponadto, modelowana struktura PAB1 (8–408 aa; domeny RRM1–4) uzyskuje wzór fluktuacji podobny do innych symulowanych struktur krystalicznych, składających się z domen RRM1–2 (10–184 aa; Rys. 5). W szczególności stwierdzono, że poli(A) mRNA zmienia swoje konformacje, które stabilizują się pod koniec czasu symulacji MD (Rys. 5). W modelowanej apo-formie PAB1 reszty R176–Y408 utworzyły złożoną strukturę po dużym przemieszczeniu, podczas gdy domeny RRM1–2 okazały się konserwatywne i mniej elastyczne, ustawione prawie tak, jak te w strukturze krystalicznej. Region PAB1 wiążący się z poli(A) mRNA był bardziej stabilny i przyjął nieco inną konformację w porównaniu z formą apo. Wzajemne interakcje między poli(A) mRNA a PABPC1 sugerują, że co około nanosekundę (ns) tworzy się ~8 wiązań wodorowych, a aminokwasy PAB1 były rozłożone na przestrzeni mRNA. Pozostałości PAB1 D45, Y54, Y56, N58, Q88 i N100 tworzyły trwałe interakcje z mRNA, o zajętości $>40\%$. Większość mutacji punktowych w białku PABPC1 w nowotworze znajduje się w domenach RRM, przy czym w szczególności obszary w obrębie aminokwasów 300–350 aa (domena RRM4) wykazują wysoką częstotliwość mutacji. Analizując reszty poli(A) mRNA, tworzące wiązania wodorowe zauważono, że aminokwasy biorące udział w trwałych interakcjach

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

były zachowane w różnych typach nowotworu, tzn. żadne z nich nie były zmutowane w pobranym zbiorze danych o nowotworach. Ponadto, mutacje o dużej częstości (>4) były badane w celu śledzenia zmian w stabilności struktury białka.

Znaczenie wyników

Sugeruje się, że PAB1 jest antagonistą czynników NMD podczas celowania w mRNA. Mimo to stwierdzono, że **delecja PAB1 lub UPF1 (NMD) znacząco zwiększa odczyt nowych peptydów**. Może to skutkować zwiększoną produkcją zmutowanych peptydów, które mogą być prezentowane na cząsteczkach HLA i mogą wywołać odpowiedź immunologiczną w nowotworach. Zatem, zastosowanie różnych strategii hamowania celowanego w celu całkowitego lub częściowego zablokowania aktywności PAB1 może prowadzić do indukowanej produkcji peptydów odczytanych przez mRNA, co **ostatecznie spowoduje wytwarzanie zmutowanego peptydu lub neoantygenów w komórkach nowotworowych**. Szczegółowe zrozumienie struktury białka PAB1 może pomóc w projektowaniu eksperymentów w celu zmiany jego aktywności. Zbadaliśmy strukturalne fałdowanie, czyli dynamikę (korelującą z kriomikroskopią elektronową) ludzkiego białka PAB1 i **zaproponowaliśmy kilka kluczowych reszt biorących udział w wiązaniu mRNA, wskazaliśmy też różne miejsca aktywne (Rys. 5)**. Monitorując specyficzną selektywność mRNA dla PAB1 przeanalizowaliśmy aminokwasy aromatyczne (Y lub W) ściśle związane z mRNA poli(A). Z drugiej strony, mRNA poli(A) wykazał unikalny wzorzec w stosunku do białka PAB1. Co drugi nukleotyd z obu końców 50 lub 30 był w "pozycji do wewnątrz" skierowanej ku białku, podczas gdy co trzeci nukleotyd miał konformację "pozycji na zewnątrz" (Rys. 5). Większość mutacji nowotworowych o wysokiej częstotliwości w PAB1 znajduje się w domenach RRM, w szczególności zaś regiony w 300-350 aa (RRM4) wykazują wysoką częstotliwość mutacji. Jednakże, z wyjątkiem **wariantu G123C, większość mutantów pochodzenia nowotworowego zmniejsza stabilność białka**. W naszym przekonaniu szczegóły molekularne uzyskane w tym badaniu umożliwiają dogłębne zrozumienie struktury PABPC1 i mogą pomóc modulować aktywność tego genu w przyszłych eksperymentach *in vitro* lub *in vivo*.

(vi) Padariya, M., Daniels, A., Tait-Burkard, C., Hupp, T., & Kalathiya, U. (2022). Self-derived peptides from the SARS-CoV-2 spike glycoprotein disrupting shaping and stability of the homotrimer unit, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 151, 113190.

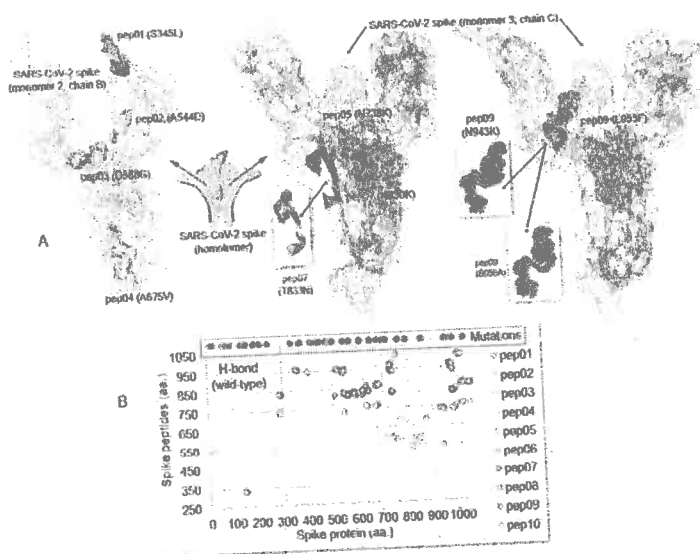
Cele pracy

Gen szczytowy SARS-CoV-2 (S) koduje N-połączoną sekwencję 22 glikanów na protomer, które to glikany odgrywają kluczowe role w zmianach konformacyjnych białka S, odpowiedzialnych za unikanie odpowiedzi immunologicznej [35]. **Białko S w stanie przedfuzyjnym jest stosunkowo bardziej niestabilne, domeny wiążące receptor (RBD) przełączają się między konformacją „w górę” (otwarta) i „w dół” (zamknięta) [17]**. Łącznie, domeny wiążące receptor i domeny N-końcowe (NTD) powodują znaczące zmiany konformacyjne wprowadzając elastyczność w strukturę. Pomimo istnienia różnych strukturalnych podejść do celowania w wirusa SARS-CoV-2, brakuje dogłębnego zrozumienia kierunku, który by blokował formację homotrimeru białka S SARS-CoV-2. Biorąc pod uwagę najnowsze badania nad mechanizmami fuzji białka S **próbowaliśmy zablokować formację homotrimeru lub uwięzić ustabilizowaną konformację przed fuzją za pomocą peptydów S pochodzenia spontanicznego lub motywów liniowych**. Ponieważ homotrimer jest

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

funkcjonalną jednostką białka szczytowego, zakłócenie formacji homotrimeru mogłoby zablokować wnikanie wirusa do komórki gospodarza. W tym kontekście, zaprojektowałam motywy liniowe, które brały udział w wewnątrzcząsteczkowej interakcji białko-białko między monomerami homotrimeru S i przeprowadziłam symulacje dynamiki molekularnej, aby wysledzić powinowactwo kompleksów peptyd-białko (Rys. 6). Skuteczne blokowanie funkcjonalnej jednostki trimeru mogłoby mieć kilka znaczących skutków dla zrozumienia SARS-CoV-2; może indukować odpowiedź immunologiczną, kluczowy element wakcynologii, a zablokowany monomer lub stabilizowany homotrimer mogą indukować produkcję przeciwciał innych niż w konformacji „otwartej”. Ponadto, badałam te peptydy pochodzenia spontanicznego motywu liniowego w odniesieniu do różnych mutacji pochodzących od wariantów wirusa SARS-CoV-2 (Alpha | B.1.1.7, Beta | B.1.351, Delta | B.1.617.2 & B.1.617, Gamma | P.1, Lambda | C.37 i Omicron | B.1.1.529) [36, 37].



Rysunek 6. Badanie wpływu różnych wariantów na białko szczytowe SARS-CoV-2 oraz struktury peptydów. (A) Dynamika konformacji po będącej przedmiotem zainteresowania mutacji punktowej w peptydach S SARS-CoV-2. (B) Reszty oddziałujące białko-peptyd z systemów typu dzikiego w porównaniu z mutacjami pochodzącymi od wariantów SARS-CoV-2; Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2 & B.1.617), Gamma (P.1), Lambda (C.37) i Omicron (B.1.1.529).

Opis wyników

Zestaw peptydów S pochodzenia spontanicznego z monomeru 1 białka S (łańcuch A) został przeskanowany w stosunku do monomeru 2 białka S (łańcuch B) oraz monomeru 3 (łańcuch C). Peptydy należące do kategorii wiążącej się z monomerem 3 wykazały wyższe powinowactwo w porównaniu z peptydami badanymi z monomerem 2 (Rys. 6). Większość badanych mutacji (A544D, D588G, A675V, N738K, N830K, T833N, L955F i S956A) obniża stabilność strukturalną peptydu, za wyjątkiem S371L (pep01) i N943K (pep09), które indukują umiarkowaną stabilność w peptydach S. W obecności białka S mutacja A544D wykazuje największą niestabilność w strukturze peptydu pep02. W szczególności, w przypadku peptydu pep09 konkretne mutacje wykazują różnorodny wpływ na fałdowanie peptydu. Strukturalne fałdowanie różnej wielkości liniowych motywów peptydu S wykazało, że z wyjątkiem peptydów pep02 i pep07, większość badanych peptydów ulega dużemu ruchowi konformacyjnemu w odniesieniu do pozycji początkowych (Rys. 6). Stabilne peptydy (pep02 i pep07) wykazały większą liczbę interakcji z białkiem S, co indukowało stabilne kształtowanie lub fałdowanie struktury białka S. Na przykład, kontrastową konformację w białku S widać w połączeniu z peptydem o niższym powinowactwie wiążącym (pep01) w porównaniu z peptydem pep07. Regiony białka S w zakresie 250–450, 680–760 i 915–1000 indukowały stabilność białka S w obecności peptydów pep02 i pep03, podczas gdy odmienne

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

zachowanie zaobserwowano dla peptydów pep01, pep04 i pep05. Ogólnie rzecz biorąc, w przypadku systemu mutantu peptydowego większa liczba reszt była wiązana z białkiem S, pomimo zwiększonej elastyczności w strukturze białka (Rys. 6). Nakładanie mutacji białka S z wariantów SARS-CoV-2 na interakcje białko-peptyd z systemu typu dzikiego uwidoczniało to, że większość mutacji znajduje się w regionach, gdzie peptydy pochodzenia spontanicznego oddziałują z białkiem S.

Znaczenie wyników

Kilka podejść opartych na strukturze zostało już zastosowanych w celu opracowania szczepionek skierowanych przeciwko wirusowi SARS-CoV-2, jednak brakuje dokładnego zrozumienia kierunku blokowania formacji homotrimeru białka S. W tym miejscu sugerujemy, że zakłócenie formacji homotrimeru może zablokować wejście wirusa do komórki gospodarza lub zmniejszyć kinetykę białka S. Dane dynamiki molekularnej ujawniły, że większy zestaw reszt białka S w zakresie od 550-750 do 950-1050 w systemach typu dzikiego oddziaływał z różnymi peptydami S pochodzenia spontanicznego (Rys. 6). Peptydy pep02 i pep07 w systemach typu dzikiego były wśród ligandów o wysokim powinowactwie do białka S; w szczególności mutacja punktowa w peptydzie pep02 obniżyła liczbę interakcji białko-peptyd. Ponadto, mutacja A544D z peptydu pep02 indukowała niestabilność złożonego białka S, podczas gdy mutacja punktowa N943K z pep09 wykazywała zachowanie umowne. Obecność mutacji w systemie indukowała aktywną konformację "w górę" domen szczytu (RBD), która mogłaby zwiększyć interakcję z receptorem komórki gospodarza. Wprowadzenie mutacji w peptydach destabilizowało złożoną strukturę białka S, co skutkowało efektem allosterycznym w innych, różnych funkcjonalnie regionach białka. Zidentyfikowano częstotliwość mutacji w zmianach powinowactwa wiązania białko-białko w trimerowym białku S. Mutacja A544R (pep02) może mieć znaczący wpływ na powinowactwo wiązania w monomerach szczytowych jednostki homotrimeru. W naszym przekonaniu nasze ustalenia mogą pozwolić na lepsze zrozumienie homotrimeru kolca SARS-CoV-2, a nasze dane mogą pomóc w projektowaniu dalszych eksperymentów w celu opracowania peptydów pochodzenia spontanicznego, zastępujących pojedynczy monomer białka S z trimera blokując funkcjonalną jednostkę homotrimeru lub indukując stabilność.

(vii) Padariya, M., Sznarkowska, A., Kote, S., Gómez-Herranz, M., Mikac, S., Pilch, M., Alfaro, J., Fahraeus, R., Hupp, T., & Kalathiya, U. (2021). Functional interfaces, biological pathways, and regulations of interferon-related DNA damage resistance signature (IRDS) genes. *Biomolecules*, 11(5), 622.

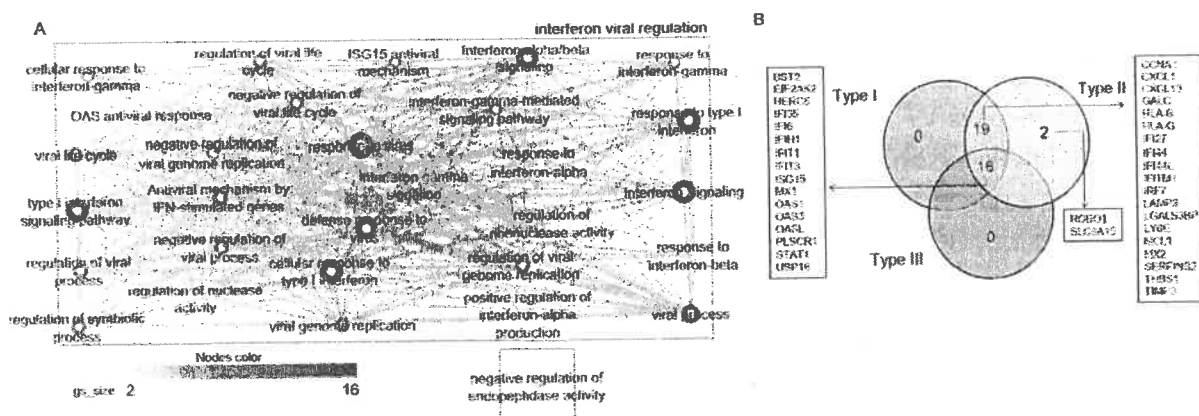
Radioterapia jest skutecznym leczeniem wielu typów nowotworów, stosowanym u około 60% pacjentów z nowotworami, często w połączeniu z chirurgią lub chemioterapią. Dziesięć lat badań wykazało, że system cytokin interferonu typu 1 (IFN-I) odgrywa kluczową rolę w efektywności radioterapii [38]. Uszkodzenie DNA może wywołać wrodzoną odpowiedź immunologiczną przez gromadzenie DNA jądrowego w cytoplazmie - cechą typową dla guzów i linii komórkowych nowotworów przy akumulacji cytoplazmatycznego ssDNA lub dsDNA [39]. Radioterapia i chemioterapia to standardowe metody leczenia nowotworów, ale oporność guzów na te metody budzi poważne obawy. Ekspresja genów stymulowanych przez interferon zawiera sygnaturę odporności na uszkodzenie DNA związaną z IFN, znaną jako IRDS, która jest silnie skorelowana z opornością na radioterapię i chemioterapię w wielu typach nowotworów. Dane kliniczne z różnych badań nad rakiem piersi wskazują na korelację

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

między wrażliwością na chemioterapię a niskim poziomem ekspresji genów IRDS [40], co zostało również potwierdzone w badaniach nad glejakiem [40]. Ponadto, okazuje się, że radioterapia podnosi ekspresję genów IRDS w komórkach raka piersi, prostaty i glejaka [41]. Prowadzonych jest kilka badań mających na celu zrozumienie, w jaki sposób geny IRDS chronią złośliwe komórki przed zniszczeniem. W szczególności, ścieżki STAT1/IFN są wrażliwe na uszkodzenia DNA; w zdrowym organizmie nie ma wolnego DNA, ani RNA w cytozolu, ale podczas ataku patogenu obce DNA jest rozpoznawane przez interferon typu I.

Mechanizmy, dzięki którym interferony poprawiają efektywność standardowych terapii onkologicznych wciąż pozostają przedmiotem intensywnych badań. W świetle ich działania przeciwwirusowego, kilka badań klasyfikuje podtypy interferonów, gdzie IFN α 8 jest często uznawany za najsilniejszy, zaś IFN α 1 bywa aż do 1000 razy słabszy. W tej pracy przeglądowej przedstawiam różne strategie mające na celu hamowanie genów IRDS (np. STAT1, IRF7, rodzina OAS, BST2) w kontekście wrażliwości nowotworów na leczenie (chemio- i radioterapia). Omawiam też metody, jakimi wirusy hamują geny IRDS. Ponadto, identyfikuję główne geny regulujące (IRF7, STAT1, EIF2AK2, IFIH1, USP18, ISG15, DCN, IFIT1, TIMP3) w obrębie zestawu genów IRDS, a także różne interferony wpływające na te geny (Rys. 7). W celu zrozumienia roli genów IRDS w różnych procesach biologicznych przeprowadziłam analizę wzbogacania ścieżek przy użyciu narzędzi g:Profiler i Cytoscape (Rys. 7). Ogółem zidentyfikowanych zostało trzydzieści ścieżek biologicznych, związanych z genami IRDS, z czego 29 zostało sklasyfikowanych jako „interferonowa regulacja wirusowa”. Wśród nich zidentyfikowano siedem ścieżek z największą liczbą genów IRDS uwzględniając często powiązane z nimi geny (IFIT1/3, IFITM1, IRF7, ISG15, MX1/2 oraz OAS1/3/L; Rys. 7).



Rysunek 7. Rozróżnienie genów IRDS, powiązanych z istotnymi ścieżkami biologicznymi. (A) Analiza wzbogacania ścieżki dla genów IRDS została wykonana za pomocą g:Profiler, a następnie wyniki zostały zwizualizowane przy użyciu platformy "Enrichment Map" w pakiecie Cytoscape. (B) Większość genów IRDS była regulowana zarówno przez interferony typu I jak i II, bądź przez wszystkie trzy typy interferonów, podczas gdy jedynie kilka genów jest regulowanych wyłącznie przez interferon jednego typu, typu II IFN. Wykres kołowy został stworzony na podstawie danych eksperymentalnych z bazy Interferome.

Dodatkowo, w celu zidentyfikowania głównych czynników regulacyjnych wśród genów IRDS, przeprowadziliśmy analizę głównych regulatorów korzystając z protokołów z aplikacji ingenuity pathway analysis (QIAGEN-IPA). Dane ujawniły następujące geny jako główne regulatory:

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

IRF7, STAT1, EIF2AK2, IFIH1, USP18 (peptydazę 18 specyficzną dla ubikwityny), ISG15, DCN (decorin), IFIT1 oraz TIMP3. Zarówno interferony typu I, jak i II regulują 19 genów IRDS, a 16 genów jest regulowanych przez wszystkie trzy typy interferonów. Tymczasem, geny ROBO1 i SLC6A15 są regulowane jedynie przez interferon typu II (Rys. 7). Te geny IRDS są identyfikowane jako indukowane w różnych liniach komórek nowotworowych w odpowiedzi na chemio- i radioterapię, bądź pośredniczą w oporności eksperymentalnej. Ponadto, zidentyfikowano je również w próbkach od pacjentów z nowotworami, które korelują z opornością. Wyłączenie tych genów powoduje wzrost wrażliwości komórek raka piersi typu TNBC na chemio- i radioterapię zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, co ilustruje potencjalne znaczenie terapeutyczne modulacji tej odpowiedzi [42]. Mając na uwadze znaczenie takich aktywnych aminokwasów, w niniejszym raporcie **przedstawiam różne potencjalne miejsca aktywne genów IRDS na podstawie dostępnych nam ich struktur trzeciorzędowych** lub proponuję je przyjmując podejście modelowania homologicznego (Molecular Operating Environment, MOE; Chemical Computing Group Inc., Montreal, QC, Kanada).

Geny IRDS klasyfikuje się jako wiążące DNA lub RNA oraz jako niezbędne do wiązania cząsteczek nukleotydów ATP/GTP/NADP. W celu zgłębienia wiedzy o **genach IRDS, przeanalizowaliśmy ich struktury trzeciorzędowe uzyskując wgląd w interfejsy funkcjonalne**. Na przykład, białka STAT1 i IRF7 formują dobrze zdefiniowane miejsce aktywne z dsDNA, podczas gdy geny OAS1, OAS3 i IFIH1 definiują swoje miejsce aktywne z dsRNA. Reszta Lys była wspólna dla wszystkich trzech genów (OAS1, EIF2AK2, i IFIH1) wiążących się z grupami fosforanowymi cząsteczki ATP. Ponadto, geny MX1 i HSD17B1 prezentują zachowany model miejsca aktywnego, odpowiednio, z cząsteczkami GDP i NADP⁺. Te szczegóły obrazujące **geny IRDS mogą być niezwykle ważne, ponieważ predefiniowane miejsce aktywne jest zawsze kluczowe dla identyfikacji specyficznych cząsteczek docelowych**. Szczególnie wiedza strukturalna może wspierać różne strategie mające na celu ukierunkowanie identyfikowanych miejsc funkcjonalnych w genach IRDS i otwierać nowe możliwości dla kilku genów, które nie były dotychczas badane w tym kontekście.

(viii) Padariya, M., Baginski, M., Babak, M., & Kalathiya, U. (2022). Organic solvents aggregating and shaping structural folding of protein, a case study of the protease enzyme. *Biophysical chemistry*, 291, 106909.

Cele pracy

Rozpuszczalniki odgrywają ważną rolę w strukturze, dynamice i funkcjonowaniu systemów biologicznych. Struktura i dynamika cząsteczek wody w pobliżu białek zależy bezpośrednio od ich właściwości, takich jak hydrofilowość lub hydrofobowość, które są głównym czynnikiem stabilności termodynamicznej złożonych białek w roztworach wodnych [43]. Głębsze zrozumienie zjawisk solwatacji biomolekuł w roztworach wodnych i nie-wodnych jest kluczowe. Większość **reakcji katalizy enzymatycznej zachodzi w roztworach wodnych, jednak niektóre mogą mieć miejsce w nie-wodnych roztworach rozpuszczalników organicznych (OS), cieczy jonowych (ILs), czy głębokich rozpuszczalnikach eutektycznych (DEs)** ze względu na niską rozpuszczalność reagentów lub produktów w roztworach wodnych [44]. W tej pracy, na przykład, **skoncentrowałam się na mierzeniu zmian w miejscu aktywnym proteazy** [45], spowodowanych brakiem cząsteczek wody solwatacyjnych, kiedy enzymy zostają umieszczone w stężonych roztworach OS i ILs. Rola

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

cząsteczek wody w strukturze, dynamice i funkcji systemów biomolekularnych jest istotna, zwłaszcza w roztworach o niskiej zawartości wody, dlatego zbadaliśmy, ile wody jest potrzebne w reakcjach katalitycznych enzymów w roztworach wodnych mediów organicznych. **Skonstruowałam różne modele *in silico* dla enzymu proteazy w obecności lub bez leku Darunawir, przeprowadziłam też szereg symulacji dynamiki molekularnej, w których rozpuszczalniki gęboko eutektyczne (DESs) różniły się rozpuszczalnikami organicznymi lub stężeniem.** Rozważane były następujące cztery rozpuszczalniki organiczne: chlorek choliny (CHL), etylen glikolu (EG), glicerol i mocznik, pod kątem zachowania miejsca aktywnego proteazy oraz zmian w wiązaniu ligandów w różnych środowiskach rozpuszczalników.

Opis wyników

Symulacje MD na różnych systemach modelowych proteazy pozwoliły zrozumieć wpływ roztworów wodnych rozpuszczalników organicznych na aktywność strukturalną enzymu proteazy. **W symulowanych warunkach enzymu proteazy w środowiskach różnych rozpuszczalników organicznych (chlorku cholinowego / etylenu glikolu / glicerolu / mocznika) zmierzyłam stabilność poszczególnych monomerów homodimeru proteazy z cząsteczką Darunawiru.** Enzym proteazy w roztworze wodnym chlorku cholinowego + mocznika wykazał większą stabilność w porównaniu z jego obecnością w innych badanych rozpuszczalnikach. Enzym z Darunawirem wykazywał stabilną strukturę w porównaniu do formy apo (CHL + mocznik). Podobne zachowanie zaobserwowano dla Darunawiru, czyli ligand jest mniej elastyczny w CHL + moczniku w porównaniu z innymi badanymi roztworami wodnymi. Charakterystyczne zachowanie proteazy wyjaśnia wpływ rozpuszczalnika organicznego na składanie struktury, podczas gdy oba monomery proteazy z Darunawirem miały większą liczbę stabilnych aminokwasów w porównaniu z systemami bez ligandów w roztworze wodnym CHL + mocznik. Szczególnie, **reszty od 45 do 55 aminokwasów z "kłapy" okazały się być bardziej elastyczne w systemie bez ligandów.** Ogólnie rzecz biorąc, obecność Darunawiru wywołała interakcje międzycząsteczkowe białko-białko pomiędzy dwoma monomerami proteazy w różnych roztworach wodnych. W systemach modelowych z CHL + EG i CHL + organicznymi rozpuszczalnikami glikolowymi zaobserwowano spadek interakcji białko-białko w ciągu 500 ns czasu symulacji MD. Skupienie rozpuszczalników organicznych zaobserwowano w systemach zawierających chlorek choliny + glikol etylenowy lub chlorek choliny + glicerol. W szczególności glikol etylenowy i glicerol tworzyły skupienia w obecności chlorku cholinowego (w stosunku 1:2 tworząc 20% rozpuszczalnika w boksie symulacyjnym) oraz cząsteczek wody. To samo-skupienie indukowało "otwartą" konformację dla domen kłapy proteazy, w obecności lub pod nieobecność liganda. W roztworze wodnym CHL + mocznik, w którym nie występuje agregacja, enzym proteazy wykazał konwencjonalne składanie strukturalne.

Znaczenie wyników

Zmiana aktywności enzymatycznej, selektywności biokatalizy lub stabilności enzymatycznej może być uzyskana poprzez zmianę mikrośrodowiska solwatacyjnego enzymów lub przez rozpuszczalniki inne niż naturalne. **Proteazy w roztworze wodnym CHL + mocznik wykazały większą stabilność w porównaniu do innych rozpuszczalników (CHL + EG lub CHL + glicerol).** Ligand Darunawir indukował interakcje białko-białko pomiędzy monomerami proteazy w różnych roztworach wodnych. Większość reszt uczestniczących w tych interakcjach pochodziła z domen wąsów, oka i nosa enzymu proteazy. Tylko w systemach

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

zawierających mocznik ILs, oba monomery były aktywnie zaangażowane w interakcje z cząsteczką Darunawiru. W systemach z CHL i mocznikiem, aminokwasy D25 i G27, zachowane wśród enzymów proteazy asparaginowej wiązały się z Darunawirem. Ponadto, reszty R8, D30, G48 i I50 okazały się powszechnie wiązać ligand Darunawir w obecności różnych rozpuszczalników organicznych. Nasze wyniki sugerują, że samo-agregacja w określonym rodzaju rozpuszczalnika organicznego ma znaczący wpływ na składanie proteazy i jej wiązanie z Darunawirem. Dlatego, rozpuszczalniki organiczne mogą mieć znaczący wpływ na utrzymanie takiej aktywności inhibitora niepeptydowego wobec enzymu proteazy, a nasze aktualne wyniki mogą nadal ten kierunek dalszym eksperymentom *in vitro* lub *in vivo*. Wierzymy, że nasze nowatorskie odkrycia pomogą lepiej zrozumieć cykl życia HIV-1, utrzymywany przez enzymy proteazowe i ich interakcje z inhibitorami, które mogą być kontrolowane przez głębokie rozpuszczalniki eutektyczne.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć

1. Badanie aspektów funkcjonalnych izoform p53 i dynamiki ich interakcji z mdm2

Szlak p53-mdm2 współewoluował, przy czym mdm2 zachowało się w dużej mierze w niezmienionej formie, natomiast gen TP53 przekształcił się w różne izoformy. Modelowałam początkowe struktury motywów BOX-1 izoform p53 słonia w celu sprawdzenia hipotezy, że izoformy p53 indukują określone pule białek p53 odmianami epitopów wchodzących w interakcję z mdm2. Zastosowałam podejście modelowania homologicznego i skonstruowałam strukturę mdm2 słonia. Dokowałam określony zestaw izoform p53 słonia do ligazy ubikwitinowej E3 mdm2, aby zidentyfikować powinowactwo wiązania i wzorzec konformacji genu p53 (słoń L. *african*). Retrogen 12 wraz z retrogenami 14, 15, 16 i 18 tworzy grupę "Typ F", która wykazuje słabe powinowactwo do mdm2, co silnie wskazuje, że te putatywne białka unikają regulacji zależnej od mdm2. Co więcej, zarówno nasza analiza *in silico*, jak i wyniki eksperymentalne z użyciem testu ELISA, wskazują, że wszystkie peptydy zawierające mutację W>G wykazują zmniejszone powinowactwo wiązania z mdm2. Natomiast mutacje międzygatunkowe Y>D i E>K wykazują zwiększoną efektywność dokowania.

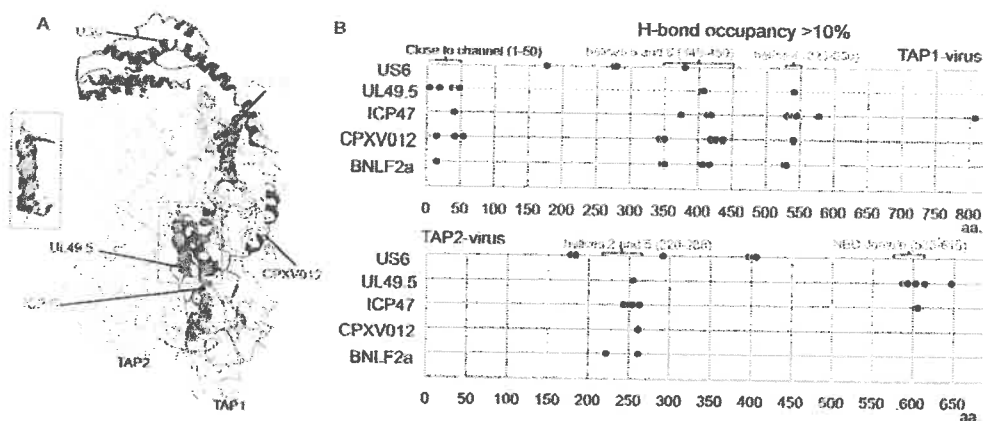
2. Badanie czynników wirusowych, ukierunkowanych na różne miejsca transporterów TAP1-TAP2 wraz ze zbadaniem, jak wirusy hamują translokację peptydów za pośrednictwem TAP na poziomie molekularnym.

Białka wirusowe mogą znacząco manipulować procesem transportu peptydów łącząc się bezpośrednio z transporterami TAP1 lub TAP2. W związku z tym, aby zrozumieć molekularne rozpoznawanie TAP1-Wirus-TAP2, w szczególności różnych białek wirusowych, symulowałam ich interakcje z transporterem TAP. Białka wirusowe destabilizują głównie białko TAP1, inaczej niż w przypadku TAP2, zwłaszcza UL49.5 i BNLF2a (Rys. 2 i 8). Spośród badanych białek wirusowych, białko UL49.5 wykazało największe strukturalne fluktuacje, zaś BNLF2a było najbardziej stabilną strukturą białkową. Obszary białka TAP1 o niższej częstości SNP, a także kilka wariantów nowotworowych, wykazały wyższe interakcje z czynnikami wirusowymi. Czynniki wirusowe natomiast wiążą się z obszarami TAP2, które uległy dużej mutacji. Zidentyfikowane zostały długotrwałe interakcje (>10 ns) między białkami TAP a białkami wirusowymi określając model farmakoforu (Rys. 8). Cytosolowy kanał transportowy "stanu otwartego" białek TAP może pobierać peptydy z cytozolu w kierunku ER i był celem

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

badanych białek wirusowych (Rys. 8). Ponadto, brałam udział w stworzeniu modelowanych struktur dla peptydów i przewidywaniu ich wzorców ich dokowania / powinowactwa z transporterami TAP.



Rysunek 8. Przesiewanie białek wirusowych, peptydów i mutacji nowotworowych na transporterach TAP1-TAP2. (A) Białka wirusowe (BNLF2a, CPXV012, ICP47, US6 i UL49.5) dokowane z transporterami TAP i konformacje wiązania dla każdego badanego składnika wirusowego przypominają prawie stan komplementarny. (B) Reszty z TAP1 lub TAP2 uczestniczą w wiązaniu białek wirusowych z wykorzystaniem 10%, a prawy panel przedstawia pozycję tych regionów w odniesieniu do struktury białka.

3. Budowanie modelu farmakoforu na podstawie interakcji dwóch izoform UPF1 z poli(U)-mRNA.

Ze względu na zdolność wykrywania PTC przez NMD w celu przyspieszenia degradacji nieprawidłowego mRNA, NMD jest ważnym modulatorem fenotypów chorób genetycznych u ludzi. Białko UPF1 jest kluczowym składnikiem szlaku NMD, określanym również jako główny regulator. Co ciekawe, u ssaków występują dwie alternatywnie splicowane izoformy UPF1, które różnią się tylko długością "pętli regulacyjnej". Śledziłam interakcje wiązań wodorowych oraz stabilność obu izoform UPF1 (z insercją 11 aa) z poli(U)-mRNA. Obecność insercji 11 aa w „pętli regulacyjnej” izoformy_1 UPF1 utworzyła interfejs dla kilku reszt, umożliwiając utworzenie interakcji wiązań H z motywami mRNA - w takim wiązaniu brały udział zwłaszcza reszty E355, N354 i R363. Aminokwasy G851/G862, E645/E656, D622/D633, R422/R433, N524/N535 i T616/T627 (izoforma_2/izoforma_1) często wchodziły w interakcje z mRNA. Ponadto, zajmowałam się analizą mutantów nowotworowych UPF1 A839T i UPF1 P533L/T wpływających na wiązanie UPF1-mRNA.

4. Identyfikacja zestawu zakonserwowanych białek-mRNA w różnych nowotworach przy okazji badania specyficzności wiązania białka PABPC1 za pomocą śledzenia poli(A)-mRNA

Białko cytoplazmatyczne 1 wiążące poli(A) (PAB1 lub PABPC1) jest związane z długimi ogonami mRNA poli(A), indukującymi stabilność. Ze względu na istotną korelację między degradacją mRNA a stabilizacją, badałam dynamikę białka PABPC1 śledząc jednocześnie specyficzność wiązania mRNA. Aby monitorować selektywność mRNA względem pełnej struktury PAB1, zbudowałam modele z mRNA poli(A) wykorzystując modelowanie homologiczne. Stwierdziliśmy, że mRNA poli(A) zmienia swoje konformacje, które stabilizują się pod koniec czasu symulacji MD. W modelowanej apo-formie PAB1 reszty R176-Y408

Ewa Nanowska
Tłumacz przyjeleży j. angielskiego
Nr rej. TP/36/05

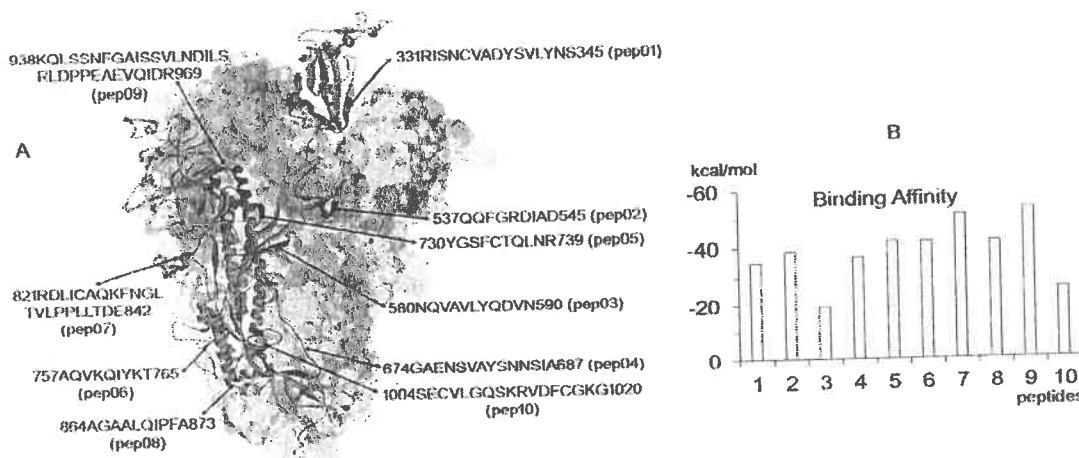
dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

utworzyły pofalowaną strukturę po dużym przemieszczeniu, podczas gdy domeny RRM1–2 okazały się konserwatywne i mniej elastyczne. Wiązanie regionu PAB1 z mRNA poli(A) było bardziej stabilne i uzyskało nieco inną konformację w porównaniu z formą apo. Stwierdziliśmy, że długotrwałe interakcje są zachowane w przypadku różnych typów nowotworów, tj. w pobranym zbiorze danych dotyczących nowotworów nie stwierdzono mutacji żadnego z nich. Z wyjątkiem wariantu G123C, większość mutantów pochodzenia nowotworowego zmniejsza stabilność białka.

5. Samoistne motywy liniowe, oparte na interakcjach wewnątrzcząsteczkowych między monomerami homotrimeru szczytowego SARS-CoV-2

Strukturalne białko szczytowe z β -koronawirusa SARS-CoV-2 tworzy różne konformacje przed i po fuzji w obrębie swojej jednostki homotrimeru (Rys. 9). Aby wesprzeć trwające nowe strategie projektowania i rozwoju szczepionek oraz blokować tworzenie się homotrimerów lub wychwytywanie ustabilizowanej konformacji przed fuzją, zaprojektowałam samoistne peptydy S lub motywy liniowe. Większość badanych mutacji (A544D, D588G, A675V, N738K, N830K, T833N, L955F i S956A) zmniejsza stabilność strukturalną peptydu, z wyjątkiem S371L (pep01) i N943K (pep09), które indukowały umiarkowaną stabilność w obrębie peptydów S (Rys. 9). W obecności białka S mutacja A544D uzyskała największą niestabilność w swojej strukturze peptydu pep02. Stwierdziliśmy, że stabilne peptydy (pep02 i pep07) wykazują większą liczbę interakcji z białkiem S, które indukują stabilne kształtowanie lub fałdowanie struktury białka S. Dodatkowo zbadalam te peptydy pochodzenia samoistnego motywu liniowego w odniesieniu do różnych mutacji pochodzących od wariantów wirusa SARS-CoV-2. W zmutowanym układzie peptydowym stwierdzono większą liczbę reszt wiążących białko S, pomimo zwiększonej elastyczności struktury białka.



Rysunek 9. Rozpoznane motywy liniowe peptydów szczytowych SARS-CoV-2 i ich powinowactwo wiązania z białkiem szczytowym (monomery) (A) Biorąc pod uwagę różne możliwe interakcje międzycząsteczkowe pomiędzy monomerami szczytowymi jednostki homotrimeru, skonstruowano zestaw 10 różnych peptydów pochodzenia samoistnego. (B) Powinowactwa wiązania 10 peptydów z motywem liniowym (z monomeru 1; łańcuch A) z ich odpowiednim monomerem białka S.

6. Różne interfejsy funkcjonalne genów IRDS, dające wgląd w ich udział w różnych procesach biologicznych

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

Dane kliniczne z różnych baz danych, dotyczących raka piersi wskazują na korelację między wrażliwością na chemioterapię a niskim poziomem ekspresji genów IRDS. Biorąc pod uwagę znaczenie tych genów, przedstawiłam różne strategie przyjęte w celu tłumienia genów IRDS (na przykład STAT1, IRF7, rodzina OAS i BST2), w przypadku wrażliwości na raka. Ponadto, zidentyfikowane zostały główne regulatory (IRF7, STAT1, EIF2AK2, IFIH1, USP18, ISG15, DCN, IFIT1 i TIMP3) z zestawu genów IRDS. Sklasyfikowano trzydzieści różnych szlaków biologicznych, związanych z jednym z tych genów IRDS, gdzie 29 szlaków zostało sklasyfikowanych jako "regulacja wirusowa interferonu". Opisałam różne możliwe czynne miejsca funkcjonalne genów IRDS na podstawie ich dostępnych struktur trzeciorzędowych lub zaproponowałam je przy użyciu metody modelowania homologicznego.

7. Pomiar zmian miejsca aktywnego enzymu w wysoko stężonych roztworach rozpuszczalników głęboko eutektycznych

Reakcje katalizy enzymatycznej zachodzą w roztworach wodnych, choć niektóre mogą mieć miejsce w roztworach nie-wodnych, takich jak rozpuszczalniki organiczne, cieczki jonowe, czy głębokie rozpuszczalniki eutektyczne ze względu na niską rozpuszczalność reagentów lub produktów w roztworach wodnych. Jako przykład, skupiłam się na pomiarze zmian w miejscu aktywnym proteazy. Skonstruowałam różne modelowe systemy *in silico* dla enzymu proteazy w obecności lub pod nieobecność leku Darunawir, przeprowadziłam też szereg symulacji dynamiki molekularnej, w których głębokie rozpuszczalniki eutektyczne (DESS) różniły się rodzajem rozpuszczalnika organicznego lub jego stężeniem. Enzym proteazy w roztworze wodnym chlorku choliney + mocznika wykazał większą stabilność w porównaniu z obecnością innych badanych rozpuszczalników. Dla rozpuszczalników organicznych CHL + EG i CHL + glicerol zaobserwowano malejącą tendencję interakcji białko-białko. Reszty R8, D30, G48 i I50 okazały się tak samo wiązać z ligandem Darunawiru w obecności różnych rozpuszczalników organicznych.

Plany naukowe

Aktywnie uczestniczę w projekcie zatytułowanym: "The impact of UPF1 ATP mimetics on the mutant immunopeptidome" [*Wpływ mimetyków UPF1 ATP na zmodyfikowany immunopeptydom*], finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (w 2021 roku) w ramach programu OPUS, prowadzonym przez prof. Teda Huppa na Uniwersytecie Gdańskim. Dane wygenerowane w moich publikacjach 4.2, 4.3 i 4.4 stały się podstawą dla tego projektu i wniosku grantowego. Inhibitory małowadności, które mogą modulować aktywność NMD, oferują kluczowe narzędzia do zrozumienia mechanizmu i funkcji fizjologicznych szlaku NMD, mają też potencjał leczenia pewnych chorób genetycznych i nowotworów. Innowacyjne aspekty proponowanego projektu polegają na opracowywaniu nowych inhibitorów/molekuł przeciwnowotworowych, które będą działać na zupełnie nowy cel, mianowicie hUPF1. Ponadto, projekt powstał z niespełnionej potrzeby klinicznej, wynikającej z nieskuteczności istniejących terapii przeciwnowotworowych, jak również wysokich i nieadekwatnych kosztów terapii biologicznych, w tym wysokich kosztów szczepionek genetycznych, dostosowanych do pacjenta. W przeciwieństwie do powyższego, hamowanie hUPF1 małą cząsteczką powodującą odczyt translacji tworzy neoantygen dzięki aminokwasowi dodanemu w kodonie stop, co w pewnym sensie stymuluje komórkę nowotworową do wytworzenia własnej

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

szczepionki neoantygenowej. Będę wdrażać metody modelowania molekularnego i wirtualnego przesiewania opartego na strukturze (SBVS), aby wybrać obiecujące związki z dostępnych chemicznych baz danych i zaprojektować pochodne aktywne wobec genu UPF1. Ponadto, będę uczestniczyć w analizie zbiorów danych proteomicznych i danych immunopeptydomu, uzyskanych z masowego spektrometru, aby przewidzieć ich powinowadztwo wiązania, albo kinetykę z transporterami TAP.

W roku 2023 uczestniczyłam jako współbadacz w projekcie pod tytułem: "Specificity in detection of PTCs in mRNA by NMD and its network, insights from cancer perspective and cross-linking (XL-MS)" [*Specyficzność wykrywania PTC w mRNA przez NMD i jego sieć, spostrzeżenia z perspektywy raka i sieciowanie (XL-MS)*] prowadzonym przez dr hab. inż. Umesh Kalathiya (w ramach programu SONATINA, Narodowe Centrum Nauki). Badałam składniki kompleksu SURF (SMG1-UPF1-eRF1-eRF3) modelując białka SMG1, SMG8, SMG9, eRF3a, eRF1 oraz UPF1 oraz badając ich dynamikę molekularną i sieci interakcji. Kompleks SURF wiąże się z UPF2, UPF3b oraz EJC w dół od PTC tworząc kompleks DECID (decay-inducing complex [*kompleks indukujący zanik*]). Wspólnie z białkami UPF, kompleks SURF promuje fosforylację UPF1 przez SMG1. Ponadto, zidentyfikowałam specyfikę wiązania eIF4A3 do mRNA przeprowadzając dokowanie EIF4A3 z odrębnymi fragmentami mRNA. Jako kontynuację mojego udziału w tym projekcie, będę uczestniczyła na różnych etapach analizy danych, które zostaną uzyskane z dynamiki molekularnej i spektrometrii masowej.

W przypadku nowotworu, gen p53 wykazuje pewne klasyczne cechy supresora nowotworu, w tym utratę heterozygotyczności, a wyróżnia się częstotliwością mutacji zmiany sensu, występujących w genie. Faktem jest, że większość mutacji (>70%) to pojedyncze zmiany aminokwasów (mutacje nonsensowne), które generują dużo wadliwego białka. Ma to ogromne znaczenie dla badaczy zajmujących się lekami przeciwnowotworowymi, ponieważ pozwala potencjalnie celować w p53. Około 80% mutacji w p53 to mutacje punktowe, z kilkoma głównymi mutacjami w miejscach "hotspot", które wywierają dominujący, negatywny wpływ na działanie dzikiego typu p53. Poza tym, mutanty p53 nabywają też nowe funkcje onkogenne. Mutacje z nowo nabytą funkcją są silnie związane z zaawansowanymi stadiami nowotworu, opornością na leki i chemiopornością, na przykład poprzez celowanie przez p53 w gen MDR1 (gen wielolekowej oporności 1) [46]. Co więcej, ligaza ubikwitynowa E3 mdm2 oddziałuje z p53 jako negatywny regulator supresora nowotworu p53. W tym kierunku będę pracować nad identyfikacją nowych cząsteczek leku, blokujących sieć p53-mdm2 poprzez celowanie w miejsca aktywne mdm2. Ponadto planuję i tworzę projekt/wniosek o grant, którego celem będzie optymalizacja nowych oligonukleotydów wiążących mdm2, które mogą indukować allosteryczną regulację interakcji mdm2-p53. Dodatkowo zbadane zostanie strukturalne fałdowanie różnych mRNA p53 za pomocą genu mdm2 wraz ze śledzeniem ich dynamiki.

Kontynuując moje zainteresowania białkami wirusowymi, ukierunkowanymi na strukturę i dynamikę składników kompleksu ładującego peptydy (PLC), które powodują osłabienie prezentacji antygeny MHC-I, będę generować kompleksy PLC o pełnej strukturze i przeprowadzać symulacje molekularne z różnymi czynnikami wirusowymi. Hiperpolimorficzne cząsteczki MHC-I są kluczowymi składnikami nabytych odpowiedzi immunologicznych, które charakteryzują się wysoką specyficznością wobec peptydów prezentowanych limfocytom T CD8+ (przypominając projektowanie szczepionek i autoimmunizację). Jednak szersze widzenie różnic strukturalnych (plastyczność ektodomen

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

wraz z regionem transbłonowym) tych genów pozostaje niejasne. Dlatego, stosując konsensusowe podejście modelowania homologicznego 3D, będę zaangażowana w badanie dużego zestawu danych dotyczących polimorficznych struktur HLA-A, -B, -C. Dodatkowo, przeprowadzone zostanie porównanie różnych współrzędnych alleli w skali rodziny, z podkreśleniem zestawu kilku alleli o różnorodności strukturalnej w rowku ładującym peptyd. Mój projekt zatytułowany: "Quantifying binding and interaction dynamics of peptide-loading complex components upon viral interference" [Kwantyfikacja dynamiki wiązania i interakcji składowych kompleksu ładowania peptydów wobec interferencji wirusowej] otrzymał finansowanie w ramach programu UGrants-START. Ten program Uniwersytetu Gdańskiego wspiera realizację badań i pokrywa koszty publikacji.

5. Prezentacja znaczącej działalności naukowej lub artystycznej, prowadzonej na więcej niż jednej uczelni, w instytucji naukowej lub kulturalnej, w szczególności w instytucjach zagranicznych

Opis pracy naukowej

Moja praca magisterska nosi tytuł: „Wspomagane komputerowo projektowanie inhibitorów fosforoorganicznych ureazy”, a pisałam ją pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Łukasza Berlickiego i prof. dr hab. inż. Wacława Andrzeja Sokalskiego. Dyplom magistra inżyniera (mgr inż.) uzyskałam w 2011 roku na kierunku Biotechnologia/Bioinformatyka na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej we Wrocławiu, Polska. Biorąc pod uwagę najsilniejszy inhibitor (diamidofosforan), zaprojektowałam kilka związków z kowalencyjnym wiązaniem węgiel-fosfor lub węgiel-fosfor-węgiel dla poprawy stabilności hydrolytycznej w celu hamowania ureaz drobnoustrojowych.

- ❖ Padariya, M., Kalathiya, U., Berlicki, L., & Baginski, M. (2014). Computer-aided design of organophosphorus inhibitors of urease. *International Journal for Computational Biology*, 3(1), 31-38.

W 2013 roku rozpoczęłam studia doktoranckie, a mój projekt nosił tytuł: „Structural and dynamic insights on the EmrE protein in apo-form and with TPP+ related substrates” [Wgląd w strukturę i dynamikę białka EmrE w formie apo z substratami powiązаныmi z TPP+]. Otrzymałam stopień doktora (dr inż.) w listopadzie 2018 roku w dziedzinie nauk chemicznych w zakresie Biotechnologii, w Katedrze Technologii Farmaceutycznej i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, w grupie prof. dr. hab. inż. Macieja Bagińskiego. Prof. Marco Mor (Wydział Chemii Medycznej Żywności i Leków, Uniwersytet w Parmie, Parma, Włochy) i dr hab. Krzysztof Murzyn (Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska) byli recenzentami mojej pracy doktorskiej. W czasie studiów doktoranckich byłam członkiem programu doktoranckiego Europin (2014-2018; <https://www.univie.ac.at/europin>). Moje badania podczas studiów doktoranckich skupiały się na scharakteryzowaniu właściwości molekularnych małego białka MDT EmrE (rozpoznawanie ligandu, zmiana konformacji białka i ruch ligandu) z wykorzystaniem podejścia symulacyjnego MD. Po pierwsze, aby zrozumieć, jak to białko może rozpoznawać ligandy, monomer i asymetryczną formę apo dimeru EmrE osadzono w heterogenicznej błonie fosfolipidowej, a

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

po drugie, białko EmrE badano w kompleksie z substratem lub cząsteczką ligandu TPP+ oraz jego pochodnymi.

- ❖ Padariya, M., Kalathiya, U., & Baginski, M. (2015). Structural and dynamic changes adopted by EmrE, multidrug transporter protein-studies by molecular dynamics simulation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(10), 2065-2074. doi:10.1016/j.bbamem.2015.05.014; (IF₂₀₁₅ 3.687; MEiN₂₀₁₅ = 35, zgodnie z nowymi punktami MEiN MEiN₂₀₂₂ = 100).
- ❖ Padariya, M., Kalathiya, U., & Baginski, M. (2018). Structural and dynamic insights on the EmrE protein with TPP⁺ and related substrates through molecular dynamics simulations. *Chemistry and Physics of Lipids*, 212, 1-11. doi:10.1016/j.chemphyslip.2017.12.004; (IF₂₀₁₈ 2.536; MEiN₂₀₁₈ = 25, zgodnie z nowymi punktami MEiN MEiN₂₀₂₂ = 100).

Niezależnie od projektu doktoranckiego, brałam aktywny udział w kilku innych przedsięwzięciach zespołowych na wydziale. Moje kompetencje w zakresie zastosowania metod obliczeniowych i teoretycznych do analizy systemów biomolekularnych, takich jak: komputerowe projektowanie leków, modelowanie molekularne, dokowanie molekularne oraz symulacje dynamiki molekularnej, przyczyniły się do rozwoju kilku projektów (13 publikacji naukowych) i pomogły w realizacji ich celów badawczych.

- ❖ Kalathiya, U., Padariya, M., & Baginski, M. (2018). The structurally similar TRFH domain of TRF1 and TRF2 dimers shows distinct behaviour towards TIN2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 642, 52-62. doi:10.1016/j.abb.2018.02.005; (IF₂₀₁₈ 3.559; MEiN₂₀₁₈ = 30, zgodnie z nowymi punktami MEiN MEiN₂₀₂₂ = 100).
- ❖ Kalathiya, U., Padariya, M., & Baginski, M. (2018). Extracting functional groups of ALLINI to design derivatives of FDA-approved drugs: inhibition of HIV-1 integrase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(4), 594-607. doi:10.1002/bab.1646; (IF₂₀₁₈ 1.559; MEiN₂₀₁₈ = 20, zgodnie z nowymi punktami MEiN MEiN₂₀₂₂ = 40).
- ❖ Kalathiya, U., Padariya, M., & Baginski, M. (2017). Molecular basis and quantitative assessment of TRF1 and TRF2 protein interactions with TIN2 and Apollo peptides. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 46(2), 171-187. doi:10.1007/s00249-016-1157-7; (IF₂₀₁₇ 1.935; MEiN₂₀₁₇ = 20, zgodnie z nowymi punktami MEiN MEiN₂₀₂₂ = 70).
- ❖ Padariya, M., & Kalathiya, U. (2017). Comparative molecular dynamics study of dimeric and monomeric forms of HIV-1 protease in ligand bound and unbound state. *General Physiology and Biophysics*, 36(2), 141-154. doi:10.4149/gpb_2016028; (IF₂₀₁₇ 1.479; MEiN₂₀₁₇ = 15, zgodnie z nowymi punktami MEiN MEiN₂₀₂₂ = 40).
- ❖ Padariya, M., Kalathiya, U., & Baginski, M. (2017). Molecular basis and potential activity of HIV-1 reverse transcriptase toward trimethylamine-based compounds. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 64(6), 810-826. doi:10.1002/bab.1543; (IF₂₀₁₇ 1.44; MEiN₂₀₁₇ = 20, zgodnie z nowymi punktami MEiN MEiN₂₀₂₂ = 40).

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

- ❖ Kalathiya, U., Padariya, M., & Baginski, M. (2016). Identification of 1H-indene-(1,3,5,6)-tetrol derivatives as potent pancreatic lipase inhibitors using molecular docking and molecular dynamics approach. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63(6), 765-778. doi:10.1002/bab.1432; (IF₂₀₁₆ 1.413; MEiN₂₀₁₆ = 20, zgodnie z nowymi punktami MEiN MEiN₂₀₂₂ = 40).
- ❖ Padariya, M., & Kalathiya, U. (2016). Structure-based design and evaluation of novel N-phenyl-1H-indol-2-amine derivatives for fat mass and obesity-associated (FTO) protein inhibition. *Computational Biology and Chemistry*, 64, 414-425. doi:10.1016/j.compbiolchem.2016.09.008; (IF₂₀₁₆ 1.331; MEiN₂₀₁₆ = 20, zgodnie z nowymi punktami MEiN MEiN₂₀₂₂ = 70).
- ❖ Kalathiya, U., Padariya, M., Baginski, M., & Padariya, C. (2015). SiMiSnoRNA: collection of siRNA, miRNA, and snoRNA database for RNA interference. *Turkish Journal of Biochemistry*, 40(6), 524-532. doi:10.1515/tjb-2015-0044; (IF₂₀₁₅ 0.211; MEiN₂₀₁₅ = 15, zgodnie z nowymi punktami MEiN MEiN₂₀₂₂ = 20).
- ❖ Padariya, M., Kalathiya, U., & Baginski, M. (2014). Docking simulations, molecular properties and ADMET studies of novel chromane-6,7-diol analogues as potential inhibitors of mushroom tyrosinase. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 16, 201-217.; (IF₂₀₁₃ 0.429; MEiN₂₀₁₄ = 15, zgodnie z nowymi punktami MEiN MEiN₂₀₂₂ = 5).
- ❖ Kalathiya, U., Padariya, M., & Baginski, M. (2014). Molecular modeling and evaluation of novel dibenzopyrrole derivatives as telomerase inhibitors and potential drug for cancer therapy. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 11(6), 1196-1207. doi:10.1109/tcbb.2014.2326860; (IF₂₀₁₄ 1.438; MEiN₂₀₁₄ = 25, zgodnie z nowymi punktami MEiN MEiN₂₀₂₂ = 70).
- ❖ Kalathiya, U., & Padariya, M. (2014). Inhibiting activity of HIV-1: protease, reverse transcriptase and integrase all together by novel compounds using computational approaches. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 4(6), 448-457. doi:10.17706/ijbbb.2014.4.6.448-457
- ❖ Kalathiya, U., Padariya, M., Jewginski, M., & Baginski, M. (2014). Molecular docking studies towards development of novel Gly-Phe analogs for potential inhibition of Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I). *International Journal for Computational Biology*, 3(1), 3-26.
- ❖ Padariya, M., Kalathiya, U., & George, J. (2015). Easy access tool for small interfering RNA (siRNA) data. *In proceedings of 8th National Level Science Symposium, Christ College*, 2, 129-133. (ISBN: 9788192952116, Christ Publications, accessed from www.ss.christcollegerajkot.edu.in).

W okresie od czerwca do września 2015 roku odbyłam staż naukowy w laboratorium prof. B. Jayarama w The Supercomputing Facility for Bioinformatics & Computational Biology (SCFBio) [Jednostka Superobliczeniowa dla Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej] przy

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

Indian Institute of Technology (IIT) [*Indyjskim Instytucie Technologii*] w Nowym Delhi, w Indiach (www.scfbio-iitd.res.in). Podczas mojego stażu pracowałam nad projektem zatytułowanym: "Projektowanie nowych związków opartych na strukturze dibenzopirołu w celu zwiększenia ich skuteczności jako inhibitorów telomerazyn z zastosowaniem metod opartych na fragmentach". W laboratorium prof. B. Jayarama w Indian Institute of Technology (Delhi, Indie) zdobyłam doświadczenie w kilku technikach stosowanych do przewidywania struktury białek, projektowania leków oraz dokowania. Ponadto, pracowałam nad udoskonaleniem lub znalezieniem nowych ligandów telomerazy i zastosowałam inny sposób pracy w celu znalezienia potencjalnych inhibitorów telomerazy. Ten nowatorski sposób działania został przetestowany i zweryfikowany na opublikowanych już pochodnych dibenzopirołu jako inhibitorach telomerazy.

Obok głównego projektu doktorskiego, brałam udział jako współwykonawca w różnych finansowanych projektach grupy: (i) Nowe związki o działaniu przeciwnowotworowym, zakłócające funkcje telomerów. Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Polska (TARGETTELO; 2017-2019) oraz (ii) Nowe inhibitory podjednostki katalitycznej telomerazy. OPUS, Narodowe Centrum Nauki, Polska (2015-2016). W ramach tych projektów badałam potencjalne mutacje ludzkiej telomerazy, które zidentyfikowano za pomocą systematycznego podejścia obliczeniowego. Co więcej, do przewidywania wpływu tych mutacji na powinowactwo niektórych ligandów wykorzystano metody dokowania molekularnego. Ponadto, stosując wirtualne przeszukiwanie strukturalne i podejście oparte na fragmentach zaprojektowałam nowe cząsteczki macierzyste i ich pochodne przeciwko białku TRF2 z kompleksu szelteryń. Mając na uwadze kluczowe ustalenia projektu, złożyliśmy wniosek patentowy, w którym zidentyfikowaliśmy nowe inhibitory interakcji pomiędzy białkami telomerowymi TRF1-TIN2 lub TRF2-TIN2, które mogą być zastosowane w terapii przeciwnowotworowej.

- ❖ PZ/8885/RW/PCT, Inhibitors of interactions between TRF1-TIN2 or TRF2-TIN2 telomeric proteins for use in anticancer therapy. Visegrad Patent Institute (ISA/XV), 2022 (aplikacja patentowa).

Nawiązane współprace

Po ukończeniu studiów i uzyskaniu stopnia doktora w listopadzie 2018 roku dołączyłam do Uniwersytetu Gdańskiego jako adiunkt/pracownik naukowy podoktorski w Międzynarodowym Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi, co dało mi możliwość udziału w kilku projektach prowadzonych przez grupę. Współpraca z różnymi badaczami z różnych uczelni akademickich zaowocowała 17 artykułami (po uzyskaniu stopnia doktora) i udziałem w kilku wnioskach o granty. Poza 8 pracami zaliczanymi do dorobku naukowego, 9 innych prac zostało opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora, mianowicie:

- ❖ Padariya, M., Kalathiya, U., Houston, D. R., & Alfaro, J. A. (2020). Recognition dynamics of cancer mutations on the ERp57-Tapasins interface. *Cancers*, 12(3), 737. <https://doi.org/10.3390/cancers12030737> (IF₂₀₂₀ 6.64; MEiN₂₀₂₀ = 140).
- ❖ Brankiewicz, W., Kalathiya, U., Padariya, M., Węgrzyn, K., Prusinowski, M., Zebrowska, J., Zyllich-Stachula, A., Skowron, P., Drab, M., Szajewski, M., Ciesielski, M., Gawrońska, M., Kallingal, A., Makowski, M., & Bagiński, M. (2023). Modified

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

- peptide molecules as potential modulators of shelterin protein functions; TRF1. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, e202300970. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/chem.202300970> (IF₂₀₂₂ **4.30**; MEiN₂₀₂₀ = **140**).
- ❖ Singh, A., Padariya, M., Faktor, J., Kote, S., Mikac, S., Dziadosz, A., Lam, T. W., Brydon, J., Wear, M. A., Ball, K. L., Hupp, T., Sznarkowska, A., Wojtesek, B., & Kalathiya, U. (2022). Identification of novel interferon responsive protein partners of human leukocyte antigen A (HLA-A) using cross-linking mass spectrometry (CLMS) approach. *Scientific reports*, 12(1), 19422; <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21393-z> (IF₂₀₂₁ **4.996**; MEiN₂₀₂₁ = **140**).
 - ❖ Mikac, S., Dziadosz, A., Padariya, M., Kalathiya, U., Fahraeus, R., Marek-Trzonkowska, N., Chruściel, E., Urban-Wójciuk, Z., Papak, I., Arcimowicz, L., Marjanski, T., Rzyman, W., Sznarkowska, A. Keap1-resistant Δ N-Nrf2 isoform does not translocate to the nucleus upon electrophilic stress. *bioRxiv* 2022.06.10.495609; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.06.10.495609>.
 - ❖ Kalathiya, U., Padariya, M., Faktor, J., Coyaud, E., Alfaro, J. A., Fahraeus, R., Hupp, T. R., & Goodlett, D. R. (2021). Interfaces with structure dynamics of the workhorses from cells revealed through cross-linking mass spectrometry (CLMS). *Biomolecules*, 11(3), 382. <https://doi.org/10.3390/biom11030382> (IF₂₀₂₀ **4.88**; MEiN₂₀₂₁ = **100**).
 - ❖ Kalathiya, U., Padariya, M., Fahraeus, R., Chakraborti, S., & Hupp, T. R. (2021). Multivalent display of SARS-CoV-2 Spike (RBD domain) of COVID-19 to nanomaterial, protein ferritin nanocages. *Biomolecules*, 11(2), 297. <https://doi.org/10.3390/biom11020297> (IF₂₀₂₀ **4.88**; MEiN₂₀₂₁ = **100**).
 - ❖ Kalathiya, U., Padariya, M., Mayordomo, M., Lisowska, M., Nicholson, J., Singh, A., Baginski, M., Fahraeus, R., Carragher, N., Ball, K., Haas, J., Daniels, A., Hupp, T. R., & Alfaro, J. A. (2020). Highly conserved homotrimer cavity formed by the SARS-CoV-2 Spike glycoprotein: a novel binding site. *Journal of clinical medicine*, 9(5), 1473. <https://doi.org/10.3390/jcm9051473> (IF₂₀₂₀ **4.24**; MEiN₂₀₂₀ = **140**).
 - ❖ Kalathiya, U., Padariya, M., Pawlicka, K., Verma, C. S., Houston, D., Hupp, T. R., & Alfaro, J. A. (2019). Insights into the effects of cancer associated mutations at the UPF2 and ATP-binding sites of NMD master regulator: UPF1. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5644. doi:10.3390/ijms20225644 (IF₂₀₁₉ **4.556**; MEiN₂₀₁₉ = **140**).
 - ❖ Kalathiya, U., Padariya, M., & Baginski, M. (2019) Structural, functional, and stability change predictions in human telomerase upon specific point mutations, *Scientific Reports*, 9, 8707. doi:10.1038/s41598-019-45206-y (IF₂₀₁₉ **3.998**; MEiN₂₀₁₉ = **140**).

Miałam też zaszczyt i okazję współpracować z kilkoma uznanymi naukowcami w mojej dziedzinie, co pomogło mi nawiązać współpracę z kilkoma badaczami krajowymi i międzynarodowymi, a byli to:

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

- ❖ dr. Konstantinos Karakostis, Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Hiszpania - biologia molekularna i ewolucja.
- ❖ prof. Fritz Vollrath, Katedra Zoologii, Budynek Badań i Administracji Zoologii, Uniwersytet Oksfordzki, Oksford, Wielka Brytania - biologia molekularna i ewolucja.
- ❖ Alison Daniels, Zakład Chorób Zakaźnych, Edynburg, Szkocja EH4 2XR, Wielka Brytania – walidacja leków w komórkach zakażonych SARS-CoV-2.
- ❖ dr. Christine Tait-Burkard, The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, Easter Bush, Midlothian, Wielka Brytania – walidacja leków w komórkach zakażonych SARS-CoV-2.
- ❖ prof. Borek Vojtesek, z RECAMO, Instytut Walki z Rakiem Masaryka, Zlutýkopec 7, 65653 Brno, Czechy – proteomika i spektrometria mas do śledzenia białek.
- ❖ dr. Minofar Babak, z Wydziału Nauk, Uniwersytet Południowych Czech, Branišovská 1760, 37005 Česk é Budějovice, Czechy – ciecze jonowe i biologia strukturalna.
- ❖ dr. Soumyananda Chakraborti, Narodowy Instytut Badań nad Malaria, Dwarka, New Delhi 110077, Indie – nanocząstki ferrytyny i ich implikacje.

Podsumowanie osiągnięć naukowych

Stopień doktora (dr inż.) uzyskałam na Wydziale Chemii Politechniki Gdańskiej, natomiast tytuł magistra (mgr inż.) zdobyłam na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej. Dodatkowo, odbyłam staż naukowy w Indian Institute of Technology (IIT) w Nowym Delhi, pod kierunkiem prof. B. Jayarama w jednostce The Supercomputing Facility for Bioinformatics and Computational Biology. Moje wyniki badań prezentowałam na kilku konferencjach, gdzie wygłosiłam trzy prezentacje ustne oraz przedstawiłam pięć plakatów. W trakcie doktoratu byłam trzykrotnie wyróżniana tytułem najlepszego doktoranta na Politechnice Gdańskiej, a moje badania doktorskie były finansowane przez Polską Narodową Agencję Wymiany Akademickiej (NAWA). W 2015 i 2017 roku zostałam wyróżniona przez Polską Akademię Nauk (PAN) w Gdańsku za „Najlepszą twórczą pracę opublikowaną wśród młodych naukowców”. Mój dorobek naukowy to 33 artykuły w czasopismach naukowych oraz jedno zgłoszenie patentowe. Z tych publikacji, 28 ukazało się w czasopismach z listy JCR, a pięć w czasopismach krajowych lub międzynarodowych. Ponadto 8 artykułów naukowych przedstawionych do oceny prezentuje modele farmakoforowe dla różnych zestawów białek lub enzymów związanych z nowotworami lub odpowiedzią immunologiczną. Jestem pierwszym autorem siedemnastu z opublikowanych artykułów, a łączny wskaźnik oddziaływania (IF) wszystkich moich publikacji wynosi 115,602, przy łącznej liczbie cytowań 240 (dane z bazy Scopus na dzień 22 sierpnia 2023 r.). Łączna liczba punktów według listy

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) wynosi 2640. Z moich 33 publikacji, dziesięć zdobyło 100 punktów MEiN, siedem 140 punktów MEiN, a jedna 200 punktów MEiN.

Oprócz udziału w kilku wnioskach grantowych, aktywnie uczestniczyłam w realizacji finansowanych projektów badawczych, które obejmowały: (i) „Quantifying binding and interaction dynamics of peptide-loading complex components upon viral interference” [Kwantyfikacja dynamiki wiązania i interakcji składowych kompleksu ładowania peptydów wobec interferencji wirusowej], UGrants-START (umowa o grant nr 1220.6010.24.2022), 2022 (byłam głównym badaczem). (ii) Współbadacz: „Specificity in detection of PTCs in mRNA by NMD and its network, insights from cancer perspective and cross-linking (XL-MS)” [Specyficzność wykrywania PTC w mRNA przez NMD i jego sieć, spostrzeżenia z perspektywy raka i sieciowanie (XL-MS)]. SONATINA, Narodowe Centrum Nauki, Polska (umowa grantowa nr 2020/36/C/NZ2/00108), 2020-2023. (iii) Współbadacz: „The impact of UPF1 ATP mimetics on the mutant immunopeptidome” [Wpływ mimetyków UPF1 ATP na zmulowany immunopeptydom]. OPUS, Narodowe Centrum Nauki, Polska (umowa grantowa nr 2020/39/B/NZ7/02677), 2021-2025”. (iv) Współbadacz „New compounds with anticancer activity that disrupt telomere functions” [Nowe związki o działaniu przeciwnowotworowym, zakłócające funkcje telomerów]. Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Polska (TARGETTELO; umowa grantowa nr STRATEGMED3/306853/9/NCBR/2017), 2017-2018. (v) Współbadacz: „New inhibitors of catalytic subunit of telomerase” [Nowe inhibitory podjednostki katalitycznej telomerazy]. OPUS, Narodowe Centrum Nauki, Polska (umowa grantowa nr 2014/13/B/NZ7/02207), 2015-2016. (vi) Współbadacz: „Charakterystyka funkcji i regulacji izoformy 2 czynnika transkrypcyjnego Nrf2”. SONATA, Narodowe Centrum Nauki, Polska (umowa grantowa nr 2021/43/D/NZ1/02059), 2022-2025”. W ramach wkładu w rozwój społeczności naukowej recenzowałam kilka manuskryptów w różnych czasopismach znajdujących się na liście JCR. Ponadto, pełnię funkcję gościnnego redaktora specjalnego wydania „SARS-CoV-2 Spike-Based Vaccines” w czasopiśmie Vaccines.

- ❖ **Łączna liczba publikacji: 33** (przed uzyskaniem stopnia doktora: 16, i po uzyskaniu stopnia doktora: 17).
- ❖ **Osiągnięcia naukowe: 8 prac** (pierwszy autor we wszystkich publikacjach). IF = 56.524, MEiN = 910.
- ❖ **Łączna liczba publikacji bez dorobku naukowego: 25** (pierwszy autor korespondencyjny lub starszy autor korespondencyjny 9 artykułów). IF = 59.078, MEiN = 1730.
 - przed uzyskaniem stopnia doktora: 16 publikacji. IF = 20.588, MEiN = 690.
 - po uzyskaniu stopnia doktora: 9 publikacji. IF = 38.49, MEiN = 1040.
- ❖ **Łączny wskaźnik Impact Factor (IF), według roku publikacji: 115.602** (publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora: IF = 20.588, publikacje po uzyskaniu stopnia doktora: IF = 95.014).
- ❖ **Łączna liczba punktów MEiN: 2640** (publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora: MEiN = 690, publikacje po uzyskaniu stopnia doktora: MEiN = 1950).

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

- ❖ **Liczba cytowań** na podstawie baz danych dostępnych na 22.08.2023): **210** (Web of Science), **240** (Scopus), and **313** (Google Scholar).
- ❖ **Indeks Hirsha** według Web of Science **H = 9**, Scopus **H = 8**, i Google Scholar **H = 10** (dostęp 22.08.2023).
- ❖ **Liczba udziałów w dofinansowanych projektach: 6.**
- ❖ **Prezentacje konferencyjne: 3 wystąpienia ustne i 5 plakatów.**

Literatura uzupełniająca

- [1] C.L. Brooks, W. Gu, New insights into p53 activation, *Cell Res.* 20 (2010) 614–621. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.53>.
- [2] M. Bartas, V. Brázda, A. Volná, J. Červeň, P. Pečinka, J.E. Zawacka-Pankau, The changes in the p53 protein across the animal kingdom point to its involvement in longevity, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 8512. <https://doi.org/10.3390/ijms22168512>.
- [3] M. Sulak, L. Fong, K. Mika, S. Chigurupati, L. Yon, N.P. Mongan, R.D. Emes, V.J. Lynch, TP53 copy number expansion is associated with the evolution of increased body size and an enhanced DNA damage response in elephants, *Elife.* 5 (2016). <https://doi.org/10.7554/elife.11994>.
- [4] M. Gajjar, M.M. Candeias, L. Malbert-Colas, A. Mazars, J. Fujita, V. Olivares-Illana, R. Fähræus, The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage, *Cancer Cell.* 21 (2012) 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.016>.
- [5] C.J. Brown, A.K. Johnson, G.W. Daughdrill, Comparing models of evolution for ordered and disordered proteins, *Mol. Biol. Evol.* 27 (2010) 609–621. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp277>.
- [6] M. Clerici, A. Mourão, I. Gutsche, N.H. Gehring, M.W. Hentze, A. Kulozik, J. Kadlec, M. Sattler, S. Cusack, Unusual bipartite mode of interaction between the nonsense-mediated decay factors, UPF1 and UPF2, *EMBO J.* 28 (2009) 2293–2306. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.175>.
- [7] J.L. Bobadilla, M. Macek, J.P. Fine, P.M. Farrell, Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations? correlation with incidence data and application to screening, *Hum. Mutat.* 19 (2002) 575–606. <https://doi.org/10.1002/humu.10041>.
- [8] L. Martin, A. Grigoryan, D. Wang, J. Wang, L. Breda, S. Rivella, T. Cardozo, L.B. Gardner, Identification and characterization of small molecules that inhibit nonsense-mediated RNA decay and suppress nonsense p53 mutations, *Cancer Res.* 74 (2014) 3104–3113. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-13-2235>.
- [9] J. Lykke-Andersen, M.-D. Shu, J.A. Steitz, Human upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination Codon, *Cell.* 103 (2000) 1121–1131. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00214-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00214-2).
- [10] C. Wu, B. Roy, F. He, K. Yan, A. Jacobson, Poly(A)-binding protein regulates the efficiency of translation termination, *Cell Rep.* 33 (2020) 108399. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108399>.
- [11] S. Eggenberger, R. Tampé, The transporter associated with antigen processing: a key player in adaptive immunity, *Biol. Chem.* 396 (2015) 1059–1072. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0320>.
- [12] M.C. Verweij, D. Horst, B.D. Griffin, R.D. Luteijn, A.J. Davison, M.E. Rensing, E.J.H.J. Wiertz, Viral inhibition of the transporter associated with antigen processing (TAP): A striking example

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

- of functional convergent evolution, PLoS Pathog. 11 (2015) e1004743.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004743>.
- [13] M.T. Vossen, E.M. Westerhout, C. Söderberg-Nauclér, E.J. Wiertz, Viral immune evasion: a masterpiece of evolution, Immunogenetics. 54 (2002) 527–542.
<https://doi.org/10.1007/s00251-002-0493-1>.
- [14] H. Tashiro, M.K. Brenner, Immunotherapy against cancer-related viruses, Cell Res. 27 (2017) 59–73. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.153>.
- [15] Y. Yuan, D. Cao, Y. Zhang, J. Ma, J. Qi, Q. Wang, G. Lu, Y. Wu, J. Yan, Y. Shi, X. Zhang, G.F. Gao, Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains, Nat. Commun. 8 (2017). <https://doi.org/10.1038/ncomms15092>.
- [16] F. Li, Structure, function, and evolution of Coronavirus spike proteins, Annu. Rev. Virol. 3 (2016) 237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>.
- [17] J. Juraszek, L. Rutten, S. Blokland, P. Bouchier, R. Voorzaat, T. Ritschel, M.J.G. Bakkens, L.L.R. Renault, J.P.M. Langedijk, Stabilizing the closed SARS-CoV-2 spike trimer, Nat. Commun. 12 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20321-x>.
- [18] U. Kalathiya, M. Padariya, M. Mayordomo, M. Lisowska, J. Nicholson, A. Singh, M. Baginski, R. Fahraeus, N. Carragher, K. Ball, J. Haas, A. Daniels, T.R. Hupp, J.A. Alfaro, Highly conserved homotrimer cavity formed by the SARS-CoV-2 spike glycoprotein: A novel binding site, J. Clin. Med. 9 (2020) 1473. <https://doi.org/10.3390/jcm9051473>.
- [19] V.A. Belyi, P. Ak, E. Markert, H. Wang, W. Hu, A. Puzio-Kuter, A.J. Levine, The origins and evolution of the p53 family of genes, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2 (2010) a001198–a001198. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001198>.
- [20] R. Rutkowski, K. Hofmann, A. Gartner, Phylogeny and function of the invertebrate p53 superfamily, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2 (2010) a001131–a001131. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001131>.
- [21] L.M. Abegglen, A.F. Caulin, A. Chan, K. Lee, R. Robinson, M.S. Campbell, W.K. Kiso, D.L. Schmitt, P.J. Waddell, S. Bhaskara, S.T. Jensen, C.C. Maley, J.D. Schiffman, Potential mechanisms for cancer resistance in elephants and comparative cellular response to DNA damage in humans, JAMA. 314 (2015) 1850. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.13134>.
- [22] P. Praest, A.M. Liaci, F. Förster, E.J.H.J. Wiertz, New insights into the structure of the MHC class I peptide-loading complex and mechanisms of TAP inhibition by viral immune evasion proteins, Mol. Immunol. 113 (2019) 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.020>.
- [23] U. Ritz, B. Seliger, The transporter associated with antigen processing (TAP): structural integrity, expression, function, and its clinical relevance, Mol. Med. 7 (2001). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11471551/> (accessed August 23, 2023).
- [24] L.P. Villarreal, G. Witzany, Viruses are essential agents within the roots and stem of the tree of life, J. Theor. Biol. 262 (2010) 698–710. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2009.10.014>.
- [25] C.M. Borza, L.M. Hutt-Fletcher, Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein–Barr virus, Nat. Med. 8 (2002) 594–599. <https://doi.org/10.1038/nm0602-594>.
- [26] M.L. Oldham, N. Grigorieff, J. Chen, Structure of the transporter associated with antigen processing trapped by herpes simplex virus, Elife. 5 (2016). <https://doi.org/10.7554/elife.21829>.
- [27] D. Parcej, R. Tampé, ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition, Nat. Chem. Biol. 6 (2010) 572–580. <https://doi.org/10.1038/nchembio.410>.
- [28] M. Stefani, C.M. Dobson, Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution, J. Mol. Med. 81 (2003) 678–699. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0464-5>.
- [29] M.K. Doma, R. Parker, RNA quality control in eukaryotes, Cell. 131 (2007) 660–668. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.041>.
- [30] P.A. Frischmeyer, Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease, Hum. Mol. Genet. 8 (1999) 1893–1900. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.10.1893>.

Ewa Nanowska

Tłumacz przysięgły j. angielskiego
Nr rej. TPZS/16

Strona | 37

dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

- [31] M. Gowravaram, F. Bonneau, J. Kanaan, V.D. Maciej, F. Fiorini, S. Raj, V. Croquette, H. Le Hir, S. Chakrabarti, A conserved structural element in the RNA helicase UPF1 regulates its catalytic activity in an isoform-specific manner, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 2648–2659. <https://doi.org/10.1093/nar/gky040>.
- [32] U. Kühn, E. Wahle, Structure and function of poly(A) binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expression.* 1678 (2004) 67–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.03.008>.
- [33] H. Zhang, C. Sheng, Y. Yin, S. Wen, G. Yang, Z. Cheng, Q. Zhu, PABPC1 interacts with AGO2 and is responsible for the microRNA mediated gene silencing in high grade hepatocellular carcinoma, *Cancer Lett.* 367 (2015) 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.010>.
- [34] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [35] Y. Watanabe, J.D. Allen, D. Wrapp, J.S. McLellan, M. Crispin, Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike, *Science.* 369 (2020) 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>.
- [36] Where proteins and innovation advance biomedicine, *Com.Cn.* (n.d.). <https://acrobiosystems.com.cn/> (accessed August 23, 2023).
- [37] L. Zhang, Z. Cui, Q. Li, B. Wang, Y. Yu, J. Wu, J. Nie, R. Ding, H. Wang, Y. Zhang, S. Liu, Z. Chen, Y. He, X. Su, W. Xu, W. Huang, Y. Wang, Ten emerging SARS-CoV-2 spike variants exhibit variable infectivity, animal tropism, and antibody neutralization, *Commun. Biol.* 4 (2021). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02728-4>.
- [38] B.C. Burnette, H. Liang, Y. Lee, L. Chlewicki, N.N. Khodarev, R.R. Weichselbaum, Y.-X. Fu, S.L. Auh, The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity, *Cancer Res.* 71 (2011) 2488–2496. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-2820>.
- [39] S. Gasser, W.Y.L. Zhang, N.Y.J. Tan, S. Tripathi, M.A. Suter, Z.H. Chew, M. Khatoo, J. Ngeow, F.S.G. Cheung, Sensing of dangerous DNA, *Mech. Ageing Dev.* 165 (2017) 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.09.001>.
- [40] C.W. Duarte, C.D. Willey, D. Zhi, X. Cui, J.J. Harris, L.K. Vaughan, T. Mehta, R.O. McCubrey, N.N. Khodarev, R.R. Weichselbaum, G.Y. Gillespie, Expression signature of IFN/STAT1 signaling genes predicts poor survival outcome in glioblastoma multiforme in a subtype-specific manner, *PLoS One.* 7 (2012) e29653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029653>.
- [41] M.-H. Tsai, J.A. Cook, G.V.R. Chandramouli, W. DeGraff, H. Yan, S. Zhao, C.N. Coleman, J.B. Mitchell, E.Y. Chuang, Gene expression profiling of breast, prostate, and glioma cells following single versus fractionated doses of radiation, *Cancer Res.* 67 (2007) 3845–3852. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-4250>.
- [42] M.C. Boelens, T.J. Wu, B.Y. Nabef, B. Xu, Y. Qiu, T. Yoon, D.J. Azzam, C. Twyman-Saint Victor, B.Z. Wiemann, H. Ishwaran, P.J. ter Brugge, J. Jonkers, J. Slingerland, A.J. Minn, Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways, *Cell.* 159 (2014) 499–513. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.051>.
- [43] K.A. Dill, Dominant forces in protein folding, *Biochemistry.* 29 (1990) 7133–7155. <https://doi.org/10.1021/bi00483a001>.
- [44] P. Halling, Biocatalysis in low-water media: understanding effects of reaction conditions, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4 (2000) 74–80. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(99\)00055-1](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(99)00055-1).
- [45] N.E. Kohl, E.A. Emini, W.A. Schleif, L.J. Davis, J.C. Heimbach, R.A. Dixon, E.M. Scolnick, I.S. Sigal, Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 4686–4690. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.13.4686>.
- [46] X. Zhou, Q. Hao, H. Lu, Mutant p53 in cancer therapy—the barrier or the path, *J. Mol. Cell Biol.* 11 (2019) 293–305. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy072>.

6. Prezentacja osiągnięć dydaktycznych i organizacyjnych oraz osiągnięć w popularyzacji nauki lub sztuki

Ewa Nanowska
AN

Tłumacz przysięgły j. angielskiego
Nr rei. TP/36/05

Strona | 38



dr inż. Monikaben Padariya

Załącznik 3
Podsumowanie osiągnięć zawodowych

Osiągnięcia dydaktyczne i zasługi w upowszechnianiu nauki

Laboratoria z informatyki w Katedrze Chemii Fizycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej (kurs: Ochrona środowiska w języku angielskim) (2014-2016).

Opieka naukowa nad studentami

Jestem promotorem pomocniczym jednego doktoranta w Międzynarodowym Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi Uniwersytetu Gdańskiego.

7. Oprócz informacji określonych w punktach 1-6 powyżej, wnioskodawca może zawrzeć inne informacje dotyczące swojej kariery zawodowej, które uzna za istotne.

Otrzymałam nagrodę PAN (Polska Akademia Nauk) w Gdańsku dla młodych naukowców za najlepszą pracę twórczą opublikowaną w 2015 i 2017 roku za prace: "Padariya, M., Kalathiya, U., & Baginski, M. (2018). Structural and dynamic insights on the EmrE protein with TPP+ and related substrates through molecular dynamics simulations. Chemistry and Physics of Lipids, 212, 1-11" oraz "Padariya, M., Kalathiya, U., & Baginski, M. (2015). Structural and dynamic changes adopted by EmrE, multidrug transporter protein-studies by molecular dynamics simulation. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1848(10), 2065-2074". Ponadto, w trakcie studiów doktoranckich byłam członkiem Programu Doktoranckiego EUROPIN (2014-2018; <https://www.univie.ac.at/europin>). Otrzymałam nagrodę Rektora III stopnia Uniwersytetu Gdańskiego za pracę naukową w roku 2021.

Ponadto, podczas studiów doktoranckich otrzymałam Stypendium im. Ignacego Łukasiewicza ufundowane przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej (NAWA). Otrzymywałam stypendia projakościowe (za osiągnięcia naukowe od Wydziału Chemicznego), dla najlepszych doktorantów (Rektora Politechniki Gdańskiej) oraz stypendium InterPhD za osiągnięcia naukowe Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, Polska.

Szczegółowy wykaz wszystkich moich osiągnięć naukowych znajduje się w Załączniku nr 4.


Monikaben Padariya

.....
(Podpis wnioskodawcy)


Ewa Nanowska
Tłumacz przysięgły j. angielskiego
Nr rej. TF/36/05

Ewa Nanowska

EN
Tłumacz przysięgły j. angielskiego
Nr rej. TP/36/05

Niniejszym poświadczam zgodność, według najlepszej mej wiedzy,
powyższego tłumaczenia z okazanym mi oryginałem/ _____
dokumentu w języku angielskim.

Ewa Nanowska, tłumacz przysięgły języka angielskiego,
Nr rej. Listy Min. Sprawiedliwości TP/36/05

Gdańsk, dnia 15.09., 2023r.

Rep.nr 315 / 2023

pobrano opłatę 1.657,50 + VAT PLN

E. Nanowska



EN