



Prof. dr hab. Tomasz Borowski
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk

**Recenzja rozprawy doktorskiej przedstawionej
przez Panią mgr Bożenę Augustyn**

Pani mgr Bożena Augustyn przedstawiła rozprawę doktorską zatytułowaną „Charakterystyka nanodysków oraz wpływu analogów cholesterolu na ich właściwości z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego”, wykonaną pod kierunkiem dr hab. Anny Wiśniewskiej-Becker, prof. UJ z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie oraz dr Tomasza Roga z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Helsińskiego.

Praca składa się z czterech głównych części: Wstęp teoretyczny (15 str.), Metody (24 str.), Wyniki (54 str.) i Dyskusja wyników (23 str.) oraz rozdziałów opisujących cel pracy, podsumowanie i wnioski końcowe. Na początku pracy Autorka umieściła skrupulatnie przygotowaną listę używanych skrótów, a na końcu pracy spis literatury zawierający 260 pozycji.

Sformułowane główne cele pracy to: (1) porównanie wpływu wywieranego przez cholesterol i dwóch jego analogów na właściwości dwuwarstwy lipidowej w tradycyjnym modelu błony biologicznej („płaskiej dwuwarstwy”) i w nanodyskach oraz (2) dokładne scharakteryzowanie nanodysków zawierających cholesterol (CHL) lub jego analogi. Oba cele, częściowo powiązane ze sobą, są ambitne i dotyczą ważnych i aktualnych problemów z frontu współczesnych badań nad błonami biologicznymi. W badaniach doświadczalnych cholesterol często zastępuje się bursztynianem cholesterolu (CHS) lub DC-cholesterolem (3 β -[N-(N',N'-dimetyloaminoetan)-karbamilo]-cholesterol, DC-CHL) przyjmując założenie, że analogi te zachowują się w błonach biologicznych tak samo jak



cholesterol. Autorka pracy bierze pod lupę to założenie i ustala istotne różnice w zachowaniach porównywanych steroli. Drugi, nie mniej ważny cel dotyczy pytania w jakim zakresie nanodyski lipidowe stabilizowane białkiem MSP1 stanowią wiarygodny model dwuwarstwy lipidowej błony biologicznej.

Pierwsza część Wstępu poświęcona jest błonom biologicznym oraz ich składnikom budulcowym, takim jak fosfoglicerydy, sfingolipidy, sterole oraz białka błonowe; kolejna część opisuje wpływ lipidów na właściwości błony oraz na aktywność białek błonowych. Następnie, obszerny fragment (8 str.) traktuje o modelach błon biologicznych stosowanych w badaniach doświadczalnych (micele, bicele, liposomy oraz nanodyski) oraz o dwóch analogach cholesterolu badanych w tej pracy (bursztynian cholesterolu i DC-cholesterol). Metodą modelowania molekularnego poświęcono jedynie jedną stronę i bardzo brakuje mi tutaj chociażby skrótowego omówienia modeli błon biologicznych stosowanych w badaniach obliczeniowych.

Po Wstępie i Celach pracy przychodzi czas na rozdział dotyczący metod badawczych. Bardzo podobał mi się styl i szczegółowość tego rozdziału, w którym Autorka omawia najpierw podstawy teoretyczne metod modelowania molekularnego, algorytmy i przybliżenia stosowane w symulacjach układów makromolekularnych, następnie prezentuje wykorzystane modele badawcze wraz z parametrami obliczeń i kończy wyczerpującym przedstawieniem w jaki sposób i jakimi narzędziami wykonano analizę uzyskanych wyników. Na pochwałę bardzo zasługują również czytelne i informatywne rysunki przedstawiające struktury początkowe nanodysków i tradycyjnych modeli błon. Pewien niedosyt zostawia jedynie brak uzasadnienia lub zakotwiczenia w literaturze przedmiotu dla proporcji oraz całkowitej liczby cząsteczek lipidów w poszczególnych modelach nanodysków (Tabla 1, str. 39). Nie jest dla mnie jasne, np. skąd wiadomo, że cząsteczek POPC w modelu MSP1D1 POPC powinno być 172, a cząsteczek DMPC 182 w analogicznym modelu. Podobnie, skąd wiemy, że przy 56 cząsteczkach cholesterolu w nanodysku MSP1D1 zmieści się jeszcze 168 cząsteczek innych lipidów (126 POPC i 42 POPG).

Czytając największy i zarazem najważniejszy rozdział, zatytułowany „Wyniki”, uświadomiłem sobie jaki ogrom pracy został wykonany w ramach przygotowanej przez mgr Augustyn rozprawy doktorskiej. Mam na myśli nie tylko aspekty ilościowe, takie jak na przykład przygotowanie, przeprowadzenie oraz szczegółowa i wieloaspektowa analiza wyników symulacji dla 18 różnych modeli błony, lecz również różnorodność zastosowanych narzędzi do analizy i prezentacji wyników numerycznych. Chciałbym tutaj zwrócić uwagę na fakt, iż Autorka korzystała nie tylko z gotowych pakietów oprogramowania naukowego lecz również pisała własne skrypty w języku Python do analizy uzyskanych trajektorii oraz wizualizacji wyników.

Rozdział „Wyniki” podzielony został na trzy podrozdziały. Pierwszy z nich dotyczy charakterystyki nanodysków w zależności od składu lipidowego. W tym jak i w innych przypadkach analizie poddano strukturę i dynamikę białka MSP1, uporządkowanie dwuwarstwy lipidowej, jej grubość i gęstość, parametr uporządkowania w zależności od odległości lipidu od środka nanodysku oraz numeru atomu węgla, ruchliwość lipidów, profile gęstości dla grupy fosforanowej oraz cząsteczek wody w poprzek błony oraz oddziaływania między lipidami a białkiem MSP1. Do najważniejszych wyników tego podrozdziału zaliczyłbym obserwacje iż: a) struktura białka MSP1 jest zachowana, a największym fluktuacjom podlegają początkowe i końcowe aminokwasy monomerów białka MSP1, zwłaszcza w dysku MSP1D1, b) rozkład parametru uporządkowania oraz grubości dwuwarstwy w nanodyskach jest koncentryczny, c) wyższe wartości parametru uporządkowania obserwuje się dla centralnej części nanodysków w porównaniu z klasycznymi modelami błon, oraz d) lipid POPG preferencyjnie lokuje się w pobliżu białka MSP1.

Drugi z podrozdziałów traktuje o wpływie cholesterolu na właściwości nanodysków. Tutaj najważniejsze obserwacje poczynione przez Autorkę to: a) cholesterol wydaje się nieznacznie stabilizować strukturę białka MSP1, b) dodatek cholesterolu powoduje wzrost uporządkowania lipidów (wyjątek to układ MSP1D1 POPC/POPG/CHL), przy czym efekt ten jest mniejszy dla nanodysków w porównaniu z tradycyjnym modelem błony, c) grubość dwuwarstwy lipidowej w tradycyjnym modelu błony wzrasta po dodaniu cholesterolu, a dla nanodysków

tego efektu nie zaobserwowano, oraz c) obecność cholesterolu powoduje wzrost liczby oddziaływań między POPG a białkiem MSP1.

Ostatni z podrozdziałów prezentuje wpływ analogów cholesterolu na właściwości nanodysków. Warto w tym miejscu zaznaczyć, iż Autorka jako pierwsza wykonała te badania i są one unikatowe. Najistotniejsze wyniki tego podrozdziału można streścić w następujących punktach:

- a) grubość dwuwarstwy lipidowej jest największa w centrum dysku, wyjątek to modele POPC/POPG/CHS, gdzie dwuwarstwa jest najgrubsza w pobliżu białka MSP1, a najcieńsza w centrum,
- b) w modelach z analogami cholesterolu parametr uporządkowania lipidów jest niższy niż w odpowiednich modelach z cholesterolem,
- c) w modelach z analogami cholesterolu końcowe fragmenty łańcuchów węglowodorowych POPC wykazują mniejsze uporządkowanie niż w modelach z cholesterolem,
- d) CHS preferencyjnie lokalizuje się w pobliżu białka MSP1, w modelach z cholesterolem POPG i CHL również wykazują powinowactwo do tego białka;
- e) w modelach zawierających DC-CHL, steryd ten i POPG nie wykazują preferencji do lokalizacji w pobliżu białka i są one dość równomiernie rozłożone w całym nanodysku,
- f) analiza liczby wiązań wodorowych ujawniła, iż najwięcej oddziaływań tego typu między lipidem POPG a sterydem tworzy się w układach z DC-CHL, a najmniej w układach z CHS;
- g) liczba wiązań wodorowych między białkiem MSP1 a sterydem jest dużo wyższa dla CHS niż dla CHL i DC-CHL, aminokwasem kluczowym dla tych oddziaływań jest arginina.

W ostatnim dużym rozdziale rozprawy, zatytułowanym „Dyskusja wyników”, Autorka interpretuje uzyskane wyniki sprawnie osadzając je na tle danych z literatury oraz formułuje rekomendacje dotyczące potencjalnego

zastosowania nanodysków jako modeli błon biologicznych oraz CHS i DC-CHL jako modeli cholesterolu.

Praca została napisana bardzo starannie, lecz jako recenzent pracy nie mogę pominąć moich kilku uwag, które z reguły dotyczą drobnych nieścisłości i usterek edytorskich. Do najważniejszych zaliczyłbym:

1. (str. 56), prawdopodobny błąd w opisie osi X na Rysunku 16: „Numer reszty”, chyba powinno być „Numer atomu”,
2. parametr uporządkowania oraz lokalna gęstość są funkcjami 3 współrzędnych przestrzennych, natomiast na rysunkach, np. Rys. 19 (str. 61-62) przedstawione są w funkcji 2 współrzędnych i nigdzie w rozprawie nie mogłem znaleźć wytłumaczenia, jak tą projekcję lub przekrój wykonano, bardzo bym prosił o wytłumaczenie,
3. (str. 81), stwierdzenie „... nie jest możliwe bezpośrednie ilościowe porównanie profilu gęstości dla wody względem gęstości grup fosforanowych” wymaga wytłumaczenia, bardzo o nie proszę,
4. (str. 111), stwierdzenie „Obecność wiązania podwójnego umożliwia wyginanie jednego z łańcuchów węglowodorowych, co może ułatwiać tym lipidom odchylenie się nad helisami białka MSP1.” wymaga dodatkowego komentarza, gdyż generalnie wprowadzenie wiązania podwójnego zmniejsza swobodę konformacyjną łańcucha węglowodorowego.

Pozostałe usterki mają zdecydowanie mniejszą wagę, oto kilka przykładów:

- (str. 30) „... skomplikowanie problemu badawczego nie jest możliwe do opisu wzorami analitycznymi” – niezbyt precyzyjne sformułowanie,
- (str. 32) wzór (4): siła jest ujemną pochodną cząstkową potencjału, nie jego różniczką,
- (str. 48) wzór (16): górną granicą sumowania raczej nie jest „T – krok czasowy symulacji”,

- (str. 50) opis wzoru (18): powinno być „ m_f ”, nie „ n_f ”,
- (str. 112) „...., a więc spadek wpływu tego sterolu na dwuwarstwę lipidową jest jeszcze bardziej wyraźny” - niezbyt jasne sformułowanie,
- (str. 124) „... większy parametr profilu gęstości” - nieprecyzyjne sformułowanie.

Chciałbym, aby moje powyższe uwagi były potraktowane raczej jako głos w dyskusji, ponieważ w żaden sposób nie zmniejszają one wartości naukowej przedstawionej mi do recenzji pracy. Widzę tu ogrom pracy, trafną analizę popartą wiedzą i intuicją, która doprowadziła do naprawdę wartościowych wyników. Z dużą przyjemnością czytałem tę pracę, w której cele były jasno określone i mogłem krok po kroku śledzić w jaki sposób Autorka radzi sobie z problemami naukowymi.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona rozprawa całkowicie spełnia wszystkie warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne UJ o dopuszczenie Pani mgr Bożeny Augustyn do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

