

Praga, 26 kwietnia 2021

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Bożeny Augustyn

zatytułowanej: „**Charakterystyka nanodysków oraz wpływu analogów cholesterolu na ich właściwości z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego**”

Recenzja przygotowana została na zlecenie Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego, prof. dr. hab. inż. Andrzeja Kozika, z dnia 27 stycznia 2021 r. Recenzowana rozprawa doktorska powstała pod kierunkiem dr hab. Anny Wiśniewskiej-Becker oraz dra Tomasza Roga.

1. Tematyka, cel i zakres rozprawy.

W ramach badań wchodzących w skład recenzowanej rozprawy doktorskiej, pani mgr Bożena Augustyn przeprowadziła wnikliwą analizę modelowych układów lipidowych – nanodysków wykorzystując przy tym metodę komputerowych symulacji dynamiki molekularnej na poziomie atomowym. Błony lipidowe stanowią jeden z zasadniczych elementów komórek. Strukturalnie, są one dwuwarstwami lipidowymi, których podstawowy budulec stanowią amfifilowe lipidy. Ich podstawową rolą jest selektywna izolacja komórki od otoczenia, jak również tworzenie i separacja struktur wewnątrzkomórkowych. Druga, ale nie mniej ważna, rola błon lipidowych związana jest w występującymi w nich różnorodnymi białkami błonowymi, pełniącymi specyficzne funkcje kluczowe dla biologii komórki.

Na przestrzeni wielu lat badania błon biologicznych skupiały się na aspekcie lipidowym. W ostatnim dziesięcioleciu widać natomiast znaczny wzrost zainteresowania kontekstem białkowym, a przede wszystkim kwestią oddziaływania lipidy-białka oraz modulacji struktury i funkcji białek przez środowisko lipidowe. Badania eksperymentalne błon prowadzone są zazwyczaj z wykorzystaniem układów modelowych, przede wszystkim liposomów, wliczając w to liposomy zawierające białka błonowe. Celem wyeliminowania części niedogodności związanych z liposomami w ostatnich latach zaproponowano

ciekawy układ modelowy – nanodyski lipidowe. Układy te składają się z fragmentu dwuwarstwy lipidowej o, w przybliżeniu, kolistym kształcie ograniczonej helikalnym białkiem MSP1. Ich średnice wahają się od kilku do kilkunastu nanometrów. Co istotne, w nanodyskach lipidowych wbudować można białka błonowe, przez co powstaje stosunkowo dobrze zdefiniowany model białka w błonie w skali nanometrycznej. Ponadto, skład lipidowy takich nanodysków można ściśle kontrolować, co pozwala na przykład na bezpośrednie badanie oddziaływań lipid-białko. Modyfikacje składu lipidowego w badaniach modelowych idą często w kierunku naśladowania naturalnego składu lipidowego poszczególnych błon biologicznych, na przykład poprzez wprowadzanie lipidów o ujemnym ładunku oraz cząsteczek cholesterolu.

Oprócz badań eksperymentalnych, błony lipidowe od lat są również obiektem biofizycznych badań teoretycznych i symulacyjnych. Wiodącą techniką są tutaj symulacje metodą dynamiki molekularnej (MD). Postęp metod obliczeniowych oraz gwałtowny wzrost dostępnej mocy obliczeniowej sprawił, że na dzień dzisiejszy symulacje MD pozwalają na badanie błon w rozdzielczości atomowej, w skalach odległości rzędu kilkunastu nanometrów oraz skalach czasowych sięgających wielu mikrosekund. Dodatkowo, symulacje takie pozwalają na badanie błon zawierających białka, przez co symulacje MD są na dzień dzisiejszy komplementarna metoda dla badań eksperymentalnych wykorzystujących modelowe układy lipidowo-białkowe.

O ile właściwości błon lipidowych *per se* są stosunkowo dobrze poznane, właściwości nanodysków lipidowych są nadal obiektem intensywnych badań. Dotyczy to głównie eksperymentów, które wskazują na przykład na heterogeniczność lipidów w dyskach czy zależności właściwości błony od rozmiaru i struktury białka MSP1. Brakującym ogniwem jest nieznanostwo właściwości nanodysków na poziomie molekularnym i atomowym. Problem ten był główną motywacją Doktorantki, która w ramach swojej dysertacji przeprowadziła nowatorskie badania dotyczące molekularnej struktury i właściwości błon lipidowych zamkniętych w nanodyskach, wykorzystując po raz pierwszy w takim zakresie symulacje metodą dynamiki molekularnej. Poza samą charakterystyką struktury i dynamiki dwuwarstw lipidowych, badania te objęły również takie zagadnienia jak wpływ różnych wariantów białka MSP1, obecność ujemnie naładowanych lipidów oraz wpływ cholesterolu oraz jego dwu pochodnych.

2. Omówienie i ocena zawartości rozprawy.

Dysertacja otwiera wstęp teoretyczny obejmujący zarówno krótki i przejrzysty ogólny opis błon biologicznych oraz bardziej szczegółowe informacje na temat roli poszczególnych typów lipidów, steroli i białek błonowych. Następuje po nim dłuższy rozdział dotyczący zastosowania modeli błon biologicznych w badaniach strukturalnych. Doktorantka prezentuje w nim w interesujący sposób różne modele błon (micele, bicele, liposomy i wreszcie nanodyski), które na przestrzeni lat były i nadal są wykorzystywane w badaniach błon. Należy podkreślić, że bardzo mocną stroną tej części pracy jest obszernie cytowana literatura. Zwróciłem uwagę, że w rozdziale tym brak odniesienia do monowarstw lipidowych – bliskich moim zainteresowaniom naukowym, nie umniejsza to jednak wartości tej części pracy. W kolejnych podrozdziałach omówione zostają analogi cholesterolu, bursztynian i DC-cholesterol, których rola w nanodyskach stanowi bardzo istotną część badań Doktorantki. Wstęp zamyka krótki rozdział omawiający

metody modelowania molekularnego w badaniach strukturalnych. Tu z kolei wytknąłbym brak wzmianki o symulacjach w większych skalach odległości, wykorzystujących podejście gruboziarniste (coarse-grain).

W kolejnym rozdziale jasno i przejrzysto omówione są cele pracy. Jak podaje Doktorantka, dotyczą one właściwości błony lipidowej w nanodyskach oraz wpływu na nie takich czynników jak rodzaj lipidów, zmiany w strukturze białka MSP1 oraz obecności cholesterolu i jego dwu pochodnych. Jednym z celów było też, bardzo celnie, porównywanie właściwości błony w nanodyskach z analogiczną błoną w standardowym („płaskim”) modelu. Wymienione cele przyczynić się mają do lepszego poznania nanodysków a przez to do optymalizacji przy projektowaniu ich użycia w badaniach strukturalnych.

Dalsza część pracy zawiera omówienie wykorzystywanej metodologii, czyli metody symulacji dynamiki molekularnej. Doktorantka klarownie wprowadza tu wszystkie niezbędne podstawowe pojęcia dotyczące tej techniki symulacyjnej. Następnie przedstawia wykorzystane w pracy modele badawcze (układy symulacyjne), wraz z opisem ich przygotowania, zestawem parametrów użytych w symulacjach oraz omówieniem wszystkich metod zastosowanych do analizy obliczonych trajektorii. Za cenny uważam tutaj krótki rozdział opisujący zastosowane oprogramowanie.

Kolejny, obszerny rozdział zawiera omówienie wyników uzyskanych przez Doktorantkę. Podzielony jest na trzy główne części dotyczące poszczególnych badanych zagadnień: wpływ składu lipidowego na błonę w nanodyskach, wpływu cholesterolu oraz wpływu analogów cholesterolu. W ramach każdego podrozdziału omawiana jest szczegółowa budowa modeli symulacyjnych, a następnie wyniki dotyczące szczegółowych aspektów nanodysków (struktura białka MSP1, analiza struktury samej błony, parametry uporządkowania, grubość błony, ruchliwość lateralna lipidów, organizacja lateralna lipidów w błonie, przenikanie wody). Podkreślić należy, że wszystkie wyniki zaprezentowane zostały w sposób bardzo logiczny i w przejrzystej formie, co musiało wymagać od Doktorantki znacznego nakładu pracy, z uwagi na dużą liczbę badanych układów.

Następną i zasadniczą moim zdaniem część pracy stanowi rozdział z dyskusją wyników. Uważam, że Doktorantka bardzo wnikliwie, obszernie i z dojrzałością naukową analizuje tu swoje wyniki oraz konfrontuje je z danymi dostępnymi w literaturze – przede wszystkim z wynikami eksperymentalnymi. Zawarte są tutaj i przedyskutowane kluczowe oryginalne osiągnięcia pracy:

1. Wykazanie, że struktura i właściwości błony lipidowej w nanodyskach jest różna od błon w modelach tradycyjnych. Dotyczy to głównie większego uporządkowania łańcuchów i niehomogenności błony, oraz wpływu średnicy nanodysku na błonę.
2. Udowodnienie wpływu obecności białka MSP1 na właściwości błony w pobliżu białka.
3. Udowodnienie występowania specyficznych oddziaływań ujemnie naładowanych lipidów POPG z białkiem.
4. Wykazanie, że pochodne cholesterolu często wykorzystywane w eksperymentalnych badaniach modeli błon lipidowych, różnią się w swym wpływie na błonę od cholesterolu. Wyniki badań jasno pokazują ograniczenia w stosowalności bursztynianu cholesterolu i DC-cholesterolu, warunkowane na przykład obecnością ujemnie naładowanych lipidów.

Pracę zamyka rozdział z krótkim i przejrzystym podsumowaniem najważniejszych wniosków z przeprowadzonych badań.

Wyniki prezentowane w dysertacji zostały częściowo opublikowane w dwóch artykułach naukowych zamieszczonych w liczących się w dziedzinie impaktowanych czasopismach (Journal of Physical Chemistry B w roku 2019 oraz BBA Biomembranes z roku 2020). Chciałbym podkreślić, że rezultaty pracy, poza walorem czysto poznawczym, mają kluczowe znaczenie dla badań eksperymentalnych z użyciem nanodysków lipidowych. Co szczególnie cenne, Doktorantka nie obawia się w otwarty sposób dyskutować ograniczenia modeli eksperymentalnych oraz przedstawiać oparte na uzyskanych wynikach rekomendacje dotyczące składów lipidowych, które umożliwią wyeliminowanie głównych wad nanodysków w porównaniu z tradycyjnymi modelami błon.

3. Ocena redakcji pracy.

Dysertacja napisana została w języku polskim, w sposób poprawny, bez znaczących błędów, odpowiednio do poziomu wymaganego od rozpraw doktorskich. Poziom edytorski jest bardzo wysoki. Znalazłem niewiele błędów typograficznych. Jedna z nielicznych „literówek” (w zdaniu „Symulacje dynamiki molekularnej przeprowadza się najczęściej w ograniczonej przestrzeni nazywanej pudełkiem symulacyjnym”) bardzo umiliła mi recenzowanie pracy. Zamieszczone ilustracje są staranne i dobrze ilustrują symulowane układy oraz wyniki analiz trajektorii. Dopatrzyłem się drobnych niekonsekwencji w podawaniu numerów stron w spisie cytowanej literatury. Osobiście preferowałbym cytowania numerowane w miejsce stosowanych przez Doktorantkę cytowań wg nazwiska pierwszego autora.

4. Dyskusja usterek rozprawy.

Recenzowana rozprawa nie zawiera żadnych znaczących błędów. Poniżej, z obowiązku recenzenta, wymieniam drobne mankamenty, które nie umniejszają wartości pracy:

1. Brak dokładnych informacji i dyskusji rozmiarów pudełka symulacyjnego. Symulacje nanodysków lipidowych, z uwagi na specyficzną geometrie układu, wymagały zapewne starannego doboru rozmiarów „boksu”.
2. Brak oszacowania błędów wyznaczanych wielkości. Przy prezentacji wyników symulacji MD złożonych układów często pomija się formalny rachunek błędów, warto jednak przynajmniej je oszacować i przedyskutować ich ewentualny wpływ na interpretację wyników.
3. Brak specyfikacji pola siłowego użytego dla jonów.
4. Błąd w równaniu opisującym zależność siły od potencjału (równanie 4) i brak definicji pojęcia „reszty” w równaniu 10.

5. Tematy do dyskusji

Poniżej wymieniam kilka związanych z dysertacją tematów, do których Doktorantka może ustosunkować się podczas obrony pracy:

1. W przeprowadzonych symulacjach zastosowane zostały różne algorytmy kontroli ciśnienia (Berendsen, Parrinello-Rahman). Czy mają one jakieś wady i na których etapach symulacji mogą lub powinny być użyte?
2. Nanodyski lipidowe można uformować z wykorzystaniem syntetycznych polimerów (SMA, DIBMA) w miejsce białka MSP1. Jak mają się do siebie właściwości błon w takich układach syntetycznych w porównaniu do nanodysków zawierających białka MSP1?
3. Czy w symulacjach przeprowadzonych w ramach pracy dochodziło do dyfuzji lipidów bądź steroli między listkami błony (flip-flop)? Spodziewać się można, że na granicy lipidy-białko MSP1 dochodzi do zaburzeń struktury dwuwarstwy, a te z kolei mogłyby ułatwiać flip-flop lipidów.

6. Wniosek końcowy.

Rozprawa doktorska przedstawiona przez panią mgr Bożenę Augustyn, zatytułowana „Charakterystyka nanodysków oraz wpływu analogów cholesterolu na ich właściwości z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego” oparta jest o oryginalny i wartościowy dorobek naukowy w dziedzinie nauk biologicznych. Doktorantka wykazała dojrzałość w planowaniu, prowadzeniu oraz interpretacji prezentowanych w dysertacji badań. Rezultaty tej teoretycznej pracy opartej o metody modelowania molekularnego, poza walorem czysto poznawczym, będą mieć niewątpliwie wpływ na przyszłe badania eksperymentalne z użyciem nanodysków lipidowych. Jestem przekonany, że oceniana rozprawa odpowiada tak ustawowym jak i zwyczajowym wymaganiom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk biologicznych. Dysertacja spełnia zatem wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Dlatego też składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pani mgr Bożeny Augustyn do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



prof. dr hab. Łukasz Ćwiklik