



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 23 kwietnia 2021 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej pani mgr Bożeny Augustyn
pt. „Charakterystyka nanodysków oraz wpływu analogów cholesterolu na ich
właściwości z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego”**

Badania błon biologicznych oraz ich modeli od kilkudziesięciu lat stanowią ważną część aktywności wielu zespołów biofizycznych na świecie. Tak wysoka ranga tego typu działalności naukowej wiąże się, moim zdaniem, nie tylko z wyzwaniem poznawczym jakim jest wyjaśnienie podstawowych mechanizmów molekularnych związanych z funkcjonowaniem żywej komórki ale również z wyzwaniami z zakresu technologii farmaceutycznej. Związane jest to z faktem, iż nanostruktury formowane na bazie dwuwarstw lipidowych stanowią przedmiot zainteresowania w aspekcie nośników leków oraz kwasów nukleinowych do terapii genowej oraz szczepionek. Trudno jest mi wskazać techniki instrumentalne powszechnie stosowane w laboratoriach biofizycznych, które nie były stosowane w badaniach błon lipidowych. Przywołać tu można szereg metod spektroskopii molekularnej, kalorymetrii czy w końcu technik dyfraktometrycznych. Taka różnorodność stwarza nam doskonałe możliwości

badawcze, otwierając drogę do stawiania coraz to bardziej śmiałych wyzwań poznawczych. Z drugiej jednak strony, większość ze stosowanych technik eksperymentalnych dostarcza wyniki niejako „uśrednione” dla zespołu cząsteczek rzędu wielkości stałej Avogadro, utrudniając dostęp do informacji dotyczącej pojedynczych, często bardzo różnorodnych przypadków. Postawić można tezę, iż zastosowanie metod modelowania molekularnego, właściwych biofizyce obliczeniowej, przełamuje tę barierę. Okazuje się bowiem, iż moce obliczeniowe współczesnych procesorów pozwalają na badania obliczeniowe wzajemnego oddziaływania układu wielu molekuł z rozdzielczością atomową, w okresach mikrosekundowych, z rozdzielczością czasową pojedynczych femtosekund. Z takich właśnie możliwości korzystała w swojej pracy doktorskiej pani mgr Bożena Augustyn, stawiając sobie do rozwiązania istotne problemy związane z własnościami strukturalnymi oraz dynamicznymi lipidów w nanodyskach, nowoczesnych oraz modnych modelach błon lipidowych. Fakt, iż to właśnie podejście metodologiczne stosowane było do analizy wpływu cholesterolu oraz pochodnych tej ważnej z fizjologicznego punktu widzenia cząsteczki modyfikującej właściwości membran, czyni w moim odbiorze przedmiotową rozprawę doktorską nie tylko interesującą ale również ważną.

Praca doktorska pani mgr Bożeny Augustyn wykonana została pod kolektywnym kierownictwem dr hab. Anny Wiśniewskiej-Becker, prof. UJ, z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie oraz dr. Tomasza Roga z Uniwersytetu w Helsinkach. Jak dowiedzieć się można z podziękowań zamieszczonych przez Doktorantkę tuż za stroną tytułową, rozprawa jest zwieńczeniem wieloletniej drogi naukowej, wiodącej przez liczne ośrodki i zespoły badawcze. Wnioskując po wysokim poziomie merytorycznym rozprawy, droga ta wpłynęła bardzo pozytywnie na dojrzałość naukową oraz erudycję Kandydatki.

Rozprawa zredagowana została w języku polskim, na 152 stronach standardowego maszynopisu, w oparciu o typowy układ. Po obszernych streszczeniach, zredagowanych w językach polskim oraz angielskim, czyniącym zadość wymaganiom formalnym, zamieszczony został spis treści oraz wykaz skrótów stosowanych w rozprawie, ułatwiający

zdecydowanie jej lekturę. Rozdział pierwszy pt. „Wstęp teoretyczny”, ma charakter przeglądu literaturowego, przybliżając czytelnikowi aktualne zagadnienia związane z błonami biologicznymi, ich składnikami oraz modelami. Szczególny akcent położony został na cholesterol jako istotny składnik błon biologicznych wpływający na ich właściwości strukturalne i dynamiczne oraz na problematykę nanodysków lipidowych jako nowoczesnych układów modelowych stosowanych w ostatnich latach stosunkowo często w badaniach biofizycznych. Taki rozkład akcentów wydaje się w pełni odpowiadać centralnej tematyce pracy. Cele projektu doktorskiego, zarówno te strategiczne jak i poboczne, sformułowane zostały w ramach krótkiego rozdziału drugiego. Rozdział trzeci poświęcony został prezentacji metodyki, na bazie której przeprowadzone były prace obliczeniowe. W moim odczuciu, treści zaprezentowane w ramach tego rozdziału spełniają dwie funkcje, wprowadzającą czytelnika w obszar badań obliczeniowych przy zastosowaniu podejścia dynamiki molekularnej oraz specyfikację układów molekuł i parametrów obliczeniowych, w tym zastosowane procedury, pola siłowe, liczby cząsteczek, długość symulacji, itp. Częścią stanowiącą zasadniczy rdzeń rozprawy jest rozdział czwarty pt. „Wyniki”. Rozdział ten zredagowany został w oparciu o podstrukturę odzwierciedlającą realizowane przez Doktorantkę kolejne zadania badawcze. Były one dedykowane, między innymi:

- (i) Charakterystyce porównawczej właściwości strukturalnych oraz dynamicznych dwuwarstw lipidowych w postaci planarnej oraz w nanodyskach;
- (ii) Analizie strukturalnej białka MSP1, stabilizującego nanodyski, oraz badaniom oddziaływania molekuł tego białka z lipidami w nanodyskach;
- (iii) Badaniom wpływu cholesterolu oraz jego analogów na właściwości nanodysków.

Uzyskane wyniki badań poddane zostały wieloaspektowej dyskusji w ramach rozdziału piątego pt. „Dyskusja wyników”. W znacznej mierze, dyskusja przedstawiona przez Doktorantkę zogniskowana została na ocenie nanodysków jako dogodnych a zarazem wiarygodnych modeli do badania oddziaływań molekularnych w naturalnych błonach biologicznych. Analogiczne wartościowanie zastosowane zostało w przeprowadzonej dyskusji odnoszącej się do

możliwości wykorzystania dwóch pochodnych cholesterolu (CHS oraz DC-CHL) w badaniach dotyczących aktywności steroli w błonach. Podzielam zdanie Doktorantki odnośnie wagi tego problemu, wobec faktu iż związki te stosowane są często w badaniach układów modelowych, przede wszystkim ze względu na łatwość w preparatyce, przy zaniedbaniu różnic w stosunku do cholesterolu, potencjalnie istotnych z punktu widzenia aktywności biologicznej. Dotyczące tego problemu są właśnie niektóre bezpośrednie wnioski z przeprowadzonych badań, które osobiście klasyfikuję jako szczególnie cenne. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują bowiem, iż badane pochodne cholesterolu, ze względu na różnice strukturalne są źródłem dodatkowych efektów na poziomie oddziaływań międzycząsteczkowych, które nakazują czujność w interpretacji wyników z uwzględnieniem informacji dotyczących składu lipidowego (lipidy obdarzone ładunkiem elektrycznym versus obojętne), wartości pH medium oraz odmiennych w stosunku do cholesterolu efektów w fazie polarnej oraz niepolarniej dwuwarstwy lipidowej. Rozprawę zamyka wykaz stosowanego piśmiennictwa, prezentowany w ramach rozdziału siódmego zatytułowanego „Literatura”.

Rozprawa doktorska pani mgr Bożeny Augustyn zredagowana została precyzyjnym językiem i opatrzona klarownymi, dobrze zaprojektowanymi i wykonanymi grafikami. W aspekcie poprawności formalnej, mógłbym zaproponować jedynie aby w ramach zestawienia cytowanego piśmiennictwa podawać pełne dane bibliograficzne w przypadku wszystkich pozycji, z uwzględnieniem nie tylko roku ale również numerów tomów oraz stron artykułów. Taki prosty zabieg znacznie ułatwia odszukanie pracy, do której występuje odwołanie w tekście rozprawy.

Przy lekturze rozprawy doktorskiej nasunęła mi się również refleksja natury ogólnej, dotycząca porównania możliwości badania błon biologicznych w układach modelowych, w oparciu o podejścia eksperymentalne bądź obliczeniowe. Wydaje się, iż dynamiczny rozwój eksperymentalnych technik biofizycznych w obszarze analizy pojedynczych molekuł, w szczególności białek w otoczeniu lipidowym, zacierą przewagę podejścia bazującego na dynamice molekularnej w tym zakresie. Ciekaw jestem jakie jest zdanie Doktorantki dotyczące tego problemu?

Konkluzja

Formułując konkluzję, chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Bożena Augustyn przedstawiła wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach przeprowadzonych przez nią licznych oraz bardzo zaawansowanych, oryginalnych prac badawczych. Prac koncepcyjnych oraz obliczeniowych w ramach podejścia bazującego na dynamice molekularnej. Wszystkie badania opisane w rozprawie sprawiają wrażenie bardzo dobrze zaprojektowanych oraz precyzyjnie przeprowadzonych i zinterpretowanych. W mojej ocenie, zarówno wartościowy, z poznawczego punktu widzenia, cel racy doktorskiej jak i poziom realizacji poszczególnych zadań, odpowiadają w pełni standardom rozpraw naukowych, spełniając w pełni warunki ustawowe. Znaczna część wyników badań uzyskanych w ramach projektu doktorskiego i zaprezentowanych w rozprawie została opublikowana w formie dwóch artykułów ogłoszonych w renomowanych, międzynarodowych czasopismach specjalistycznych. W oparciu o wymienione powyżej wyniki mojej oceny, uprzejmie wnioskuję o dopuszczenie pani mgr Bożeny Augustyn do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

