

Lublin, 26 lutego 2015 r.

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

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Plesnar pt. „Komputerowy model błony komórki włókienkowej soczewki oka”**

Kiedy wspominam „okres młodzięczy” zastosowań symulacji numerycznych w naukach o życiu, w oparciu o metodę dynamiki molekularnej, około dwadzieścia lat temu, pamiętam klimat towarzyszący wynikom uzyskiwanym w ramach tej aktywności naukowej. Z jednej strony, szacunek budziły wyjątkowo solidne podstawy metodologiczne podejścia, z drugiej jednak strony, wyniki uzyskiwane traktowane były bardziej w kategoriach ciekawostek niż równoważnych wynikom badań eksperymentalnych. Główną przyczyną takiego sceptycyzmu były daleko idące uproszczenia modelowanych obiektów oraz stosunkowo krótkie czasy ewolucji badanych układów, nie wykraczające poza pojedyncze nanosekundy. Główną przyczyną tych ograniczeń była niska moc obliczeniowa ówczesnych procesorów, i co się z tym łączy, wielomiesięczne czasy prowadzenia obliczeń. Ograniczenia tego typu, w znacznej mierze, stanowią już dzisiaj element historii nauki. Rozwój technologii informatycznych sprawił, iż modelowanie dynamiki molekularnej układów liczących setki a nawet tysiące molekuł, przy czasach ewolucji sięgających setek nanosekund, stanowi rutynowe podejście badaczy stosujących metody symulacyjne, zaś same modelowanie traktowane jest w kategoriach „badań obliczeniowych”. Stopień zaawansowania tego typu aktywności sprawił, iż uzyskiwane w jej

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki  
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1  
20-031 Lublin  
tel. (81) 537 62 50  
fax (81) 537 61 91  
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



ramach wyniki porównywane być mogą z rezultatami bezpośrednich badań eksperymentalnych. Umożliwia to uzgadnianie warunków początkowych i brzegowych z danymi eksperymentalnymi oraz prowadzenie cechowania parametrów i walidacji wyników symulacyjnych. Zaawansowanie metod obliczeniowych sprawia, że przedstawiciele podejścia eksperymentalnego spoglądają nie tylko z zaufaniem ale również z pewnym oczekiwaniem (a nawet niecierpliwością) na efekty pracy badaczy obliczeniowych. Jestem przekonany, iż powyższa deklaracja nie odzwierciedla jedynie mojego osobistego stanowiska, ale jest wyrazem powszechnego poglądu jaki panuje w naszym środowisku. Równoległe zastosowanie podejścia eksperymentalnego oraz obliczeniowego, w badaniach biofizycznych, posiada nie tylko walor komplementarności, ale niesie ze sobą ogromny potencjał wyzwolenia synergii prowadzącej do wyników oczekiwanych i ważnych, których uzyskanie w oparciu o jedno ze wspomnianych podejść byłoby nieosiągalne. Doskonałym przykładem na poparcie tej tezy jest sytuacja, w którą wpisuje się przedstawiona rozprawa doktorska. Rozprawa dotyczy problemów poznawczych związanych bezpośrednio z wyjaśnieniem roli jaką odgrywają cząsteczki cholesterolu, występujące w wyjątkowo wysokich stężeniach w fazie lipidowej membran w komórkach włókienkowych soczewki oka. Właściwe zaprojektowanie „eksperymentów obliczeniowych”, prezentowanych w rozprawie, możliwe było dzięki szerokiemu spektrum precyzyjnych wyników doświadczalnych, uzyskanych przez grupę Subczyńskiego, w oparciu o metodę znaczników spinowych EPR. Z drugiej strony, uzyskane wyniki obliczeniowe, umożliwiły wgląd w procesy molekularne w modelowych błonach lipidowych modyfikowanych cholesterolem, istotnie wpływające na własności strukturalne oraz dynamiczne badanych układów, których uzyskanie w eksperymencie okazywało się ograniczone bądź częstokroć niemożliwe. Do kategorii tego typu wyników zaliczyć można własności dyfuzyjne molekuł tlenu w domenach membrany o różnym stopniu uporządkowania. W przypadku eksperymentu, uzyskiwane rezultaty będą zawsze wynikiem uśredniania po wszystkich domenach i fazach obecnych w danym układzie. Co więcej, prowadząc badania opierające się na symulacjach komputerowych unikamy definitywnie, krytycznej w wydźwięku, dyskusji dotyczącej selektywnej (niereprezentatywnej) lokalizacji bądź wpływu na wynik samego znacznika spinowego czy też znacznika fluorescencyjnego.

Praca doktorska mgr Elżbiety Plesnar wykonana została pod kierunkiem pani prof. Marty Pasenkiewicz-Gieruli, w Zakładzie Biofizyki Obliczeniowej i Bioinformatyki, Wydziału Biochemii,



Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, w jednym z najlepszych w Kraju oraz doskonale rozpoznawalnych poza granicami ośrodków prowadzących badania układów biologicznych, w szczególności membran, z zastosowaniem modelowania dynamiki molekularnej. Praca zredagowana została w języku polskim, na 146 stronach maszynopisu, w oparciu o typowy, optymalny w moim odczuciu układ. Układ ten opiera się na podziale na cztery zasadnicze rozdziały. W ramach pierwszego rozdziału zatytułowanego „Wstęp” przedstawione zostały w sposób przejrzysty i zwięzły, a zarazem wyczerpujący, informacje dotyczące aspektów anatomicznych soczewki oka oraz morfologii błon komórek włókien soczewki oka. W sposób zrównoważony zaprezentowane zostały zagadnienia związane z białkami cytoplazmatycznymi oraz składnikami lipidowymi komórek włóknokowych soczewki. W tej części poczesne miejsce zajęły problemy związane bezpośrednio z cholesterolem oraz wpływem tego ważnego modyfikatora na własności strukturalne oraz dynamiczne błon lipidowych. Ponadto, w ramach Wstępu, Autorka poruszyła zagadnienia związane z chorobami aparatu widzenia, wynikającymi z wadliwego funkcjonowania soczewki oka. Rozdział drugi, zatytułowany „Materiały i metody”, wprowadza precyzyjnie w zagadnienia przeprowadzonych symulacji dynamiki molekularnej. W ramach rozdziału tego opisana została postać funkcji potencjału oraz jej parametry oraz przedyskutowane parametry kontrolujące przebieg symulacji. Podana została również szczegółowo kompozycja układów symulacyjnych. W moim odczuciu, poziom precyzji zawartych opisów dorównuje standardowi umożliwiającemu przeprowadzenie analogicznych symulacji, specjalistom w obszarze modelowania dynamiki molekularnej. Najważniejszym rozdziałem rozprawy, stanowiącym o jej bardzo wysokim poziomie merytorycznym, są wyniki badań obliczeniowych zawarte w rozdziale trzecim. Struktura podrozdziałów, wyróżnionych w ramach tej części, odpowiada bezpośrednio odrębnym wyzwaniom badawczym. Były to, między innymi, zagadnienia związane z określeniem roli cholesterolu w modulowaniu własności strukturalnych dwuwarstw lipidowych uformowanych z POPC. Środkiem do realizacji tego celu była analiza pola powierzchni przypadającego na cząsteczkę lipidu w dwuwarstwie kontrolnej oraz modyfikowanej cholesterolem, analiza molekularnego współczynnika uporządkowania i nachylenia łańcuchów fosfolipidowych, wgląd w izomeryzację *gauche-trans* oraz uzyskanie informacji dotyczącej gładkości powierzchni błon. Molekularne mechanizmy, na drodze których



realizowany jest modyfikacyjny w stosunku do membran wpływ cholesterolu, badane były poprzez analizy dyfuzji rotacyjnej oraz translacyjnej cząsteczek cholesterolu, analizy nachylenia cząsteczek cholesterolu w membranie oraz badania formowania wiązań wodorowych cholesterol-woda. Ważnym rezultatem przeprowadzonych symulacji, w aspekcie źródeł wad wzroku, mających związek ze zmianami struktury soczewki oka na poziomie molekularnym, było uzyskanie informacji dotyczących dyfuzji tlenu molekularnego przez błony modelowe o różnym składzie oraz w różnej fazie organizacji molekularnej, w tym domenowej. Po prezentacji każdego ze szczegółowych, podejmowanych problemów badawczych, zamieszczona została dyskusja wyników. Wszystkie wątki przeprowadzonych dyskusji szczegółowych, wydobyte zostały, ponadto, w ramach krótkiego rozdziału końcowego, zatytułowanego „Podsumowanie”. Rozprawę zamykają spisy rysunków i tabel oraz wykaz cytowanych pozycji piśmiennictwa.

W moim odczuciu, rozprawa doktorska pani mgr Elżbiety Plesnar zredagowana została z wysoką dbałością o precyzję sformułowań oraz bardzo wysoki poziom szaty graficznej. Praca ta jest również opracowaniem wyjątkowo starannym, w aspekcie edycyjnym. Mógłbym zarekomendować Autorce nieliczne korekty. Oto ich krótka lista:

1. Str. 5., przy opisie skrótu POPC, zamiast „palmitilo” proponuję „palmitylo”
2. Str. 21., 3. wiersz od dołu, w miejsce „zaćma cukrzyca” proponuję „zaćma cukrzycowa”
3. Str. 34., 4. wiersz od góry, zamiast „głowy hydrofobowe” raczej „głowy hydrofilowe”
4. Str. 44., podpis pod Rys. 2.6, zamiast „dwie prezentacji”, „dwie prezentacje”
5. Str. 89., 5. wiersz od góry, w miejsce „may” powinno być „masy”
6. Str. 102., 7. wiersz od dołu, w miejsce „dwoma wartościami” proponuję „dwoma wartościami”
7. Str. 110., 3. wiersz od dołu, zamiast „tworzone tworzone”, po prostu „tworzone”
8. Str. 121., 5. wiersz od góry, zastanawiam się, czy w miejsce sformułowania „zrąbu” nie powinno być „zrębu”?



Tak wieloaspektowe i zaawansowane zarazem opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską pani mgr Elżbiety Plesnar, pobudza ciekawość poznawczą, czego wyrazem może być pojawienie się sformułowanych poniżej przemyśleń:

1. Na stronie 15. rozprawy, w oparciu o pozycję piśmiennictwa (Dupuy i Engelman, 2008) wyrażany jest pogląd, według którego „nawet w błonach o najwyższym udziale białek, największa część powierzchni błony przypada na matrycę lipidową”. Zastanawiam się, na ile ściśle jest to sformułowanie? W aspekcie tej dyskusji, wart przytoczenia jest fakt, iż w błonach lipidowo-białkowych aparatu fotosyntetycznego roślin, tzw. tylakoidach, biorących udział w formowaniu struktur gran w chloroplastach, średnia powierzchnia membrany przypadająca na komponenty białkowe sięgać może nawet 80 % (np. Kirchhoff, H., Trends Plant Sci. 13(2008) 201-207).
2. W rozprawie przedstawione zostały bardzo precyzyjne analizy profili rozkładu gęstości masy dwuwarstwy lipidowej wzdłuż osi normalnej do płaszczyzny błony (np. Rys. 3.19). Eksperymentalne podejście do tworzenia profili gęstości w poprzek błony lipidowej bazuje zwykle na metodzie dyfrakcji roentgenowskiej bądź też dyfrakcji neutronów. O ile rozpraszanie promieniowania X jest czułe na gęstość elektronową i widzi szczególnie atom fosforu w obszarze głów polarnych membran uformowanych z fosfolipidów, neutrony ulegają dyfrakcji w zderzeniach z jądrami atomowymi i w większym stopniu odzwierciedlają również gęstość rdzenia hydrofobowego dwuwarstwy lipidowej. Różnica ta sprawia, iż dopiero komplementarne zastosowanie obu technik pozwala wnioskować o profilach gęstości przekrojów w poprzek błony. Zastanawiam się, na ile techniki eksperymentalne przydatne być mogą w tym przypadku do walidacji podejścia badawczego bazującego na modelowaniu dynamiki molekularnej? Czy podejmowane były próby porównania wyników symulacyjnych z doświadczalnymi?



Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż Pani mgr Elżbieta Plesnar przedstawiła doskonale zredagowaną rozprawę doktorską, opierającą się na ważnych oraz interesujących wynikach oryginalnych prac badawczych przeprowadzonych z zastosowaniem metody modelowania dynamiki molekularnej. Uzyskane wyniki wnoszą istotny wkład w zrozumienie roli ekstremalnie wysokich stężeń cholesterolu w fazie lipidowej membran komórek włókienkowych soczewki oka. Wyniki symulacji potwierdzają również, iż wysoka zawartość cholesterolu oraz struktura domenowa błon stanowią istotną barierę dla dyfuzji tlenu cząsteczkowego. Znaczna część uzyskanych i opisanych w rozprawie wyników stała się też podstawą oryginalnych artykułów opublikowanych w znaczących czasopismach specjalistycznych z obszaru biofizyki molekularnej (Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes oraz J. Phys. Chem. B). W moim odczuciu, poziom naukowy rozprawy, czyni ją godną uznania za wyróżniającą. Gratulując Doktorantce oraz Pani Promotor tak dobrych rezultatów, uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie mojej rekomendacji oraz stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Elżbietę Plesnar do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. L. L. L.