

Prof. dr hab.
JERZY CIARKOWSKI

Gdańsk, 2015.01.15.

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Elżbiety Plesnar, pod tytułem:
„Komputerowy model błony komórki włókienkowej soczewki oka”

przedstawionej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego celem uzyskania stopnia doktora.

Dana mi do oceny rozprawa samym tytułem budzi zainteresowanie u osoby po operacji zaćmy. Miałem taki zabieg przed kilku laty i z takim doświadczeniem ochoczo zabrałem się do czytania. Praca jest napisana zwięźle prostym i komunikatywnym językiem. Na dobry początek, Kandydatka w wyważonych proporcjach i z zachowaniem należytej hierarchii, swą krótką opowieść o budowie ludzkiego oka, soczewki, jej komórek, ich błon, harmonijnie łączy z biochemią i biofizyką, w tym z opisem organizacji lipidów tworzących te błony oraz metod i modeli fizyki, dynamiki molekularnej (MD), pozwalających studiować strukturę i dynamikę modelowych błon. Opowieść ta jest ilustrowana doskonałymi rysunkami i tabelami, dobranymi w przemyślany sposób. Równocześnie prezentacja modeli, narzędzi i metod zawiera jedynie główne założenia, z odsyłaczami do literatury oryginalnej po szczegóły, co korzystnie wpływa na ogólne wrażenie i nie nuży czytającego. Wspomniane treści są zawarte w 2-ch otwierających pracę rozdziałach: Rozdziale 1. Wstęp, 24 strony i w Rozdziale 2. Materiały i Metody, 22 strony.

Kontynuując o stronie formalnej rozprawy, kolejny Rozdział 3 zawiera wyniki z dyskusją na 64 stronach i stanowi w ten sposób główną, zarówno merytorycznie jak i objętościowo, jej część. Pracę zamykają Podsumowanie w wyodrębnionym krótkim, 2 strony, Rozdziale 4, dwa Zestawienia podpisów 57 rysunków (11 stron) i 9 tabel (2 strony), oraz Piśmiennictwo, około 150 pozycji na 9 stronach. Są to w przeważającej większości odwołania do źródeł oryginalnych, w około połowie pochodzących z ostatniej dekady, co świadczy o niezłym odczycaniu Autorki w temacie. Co się tyczy ww. zestawień, zawierają one w całości lub w skrócie podpisy rysunków i tabel z odsyłaczami do ich pozycji w tekście. Moim zdaniem są zbędne; nie potrzebowałem ani razu z nich korzystać. Ciekawostką niech będzie, że w spisie treści na początku rozprawy, ww. Zastawienia są uwzględnione, podczas gdy Piśmiennictwo, chyba przez niedopatrzenie, zostało w nim pominięte.

Na ostatniej stronie Wstępu podany jest w punktach cel pracy. Jest nim badanie swoistych właściwości dwuwarstw fosfolipidowych o wysokiej 25-75% zawartości cholesterolu. Wysoki poziom cholesterolu wyróżnia błony komórek włókienkowych soczewki oka od innych typowych błon komórkowych eukariontów. Z natury rzeczy Kandydatka musi stosować uproszczone modele, którymi są: układ porównawczy **POPC** (dwuwarstwa lipidowa zbudowana z 1-palmitoilo-2-oleinoilo-*sn*-fosfatydylocholino), i dwie domeny błony komórek włókienkowych soczewki oka, **CBD** (ang. *cholesterol bilayer domain*), i kombinacje ww., **PCD** (ang. *phospholipid-cholesterol domains*); wszystkie trzy typy obiektów w wariantach o różnych rozmiarach, od **200** do **800** cząsteczek lipidu w homo- lub heterogennej dwuwarstwie uwodnionej, odpowiednio, w **6000** do **24000** cząsteczek H₂O. Uzupełnieniem i rozwinięciem tej charakterystyki są Tabele 1-2 na stronach 7-8, zawierające szczegóły składów wszystkich **19 badanych modeli** dwuwarstw. W połączeniu z poprzedzającym je zestawieniem stosowanych skrótów, Tabele 1-2 bardzo ułatwiają czytelnikowi panowanie nad złożonymi obiektami pracy, czy mówimy o jej celu, czy o szczegółach wyników, vide niżej. Wracając do celu szczegółowo, Autorka z Panią Promotor postanowiły scharakteryzować: 1) chemicznie, geometrycznie i fizycznie (np. żel s₀ czy ciekły kryształ l₀/l_d) wspomniane typy dwuwarstw; 2) dyfuzję w

nich tlenu molekularnego i; 3) rozstrzygnąć pytanie o domenową czy ciągłą organizację heterogennych dwuwarstw **PCD**.

Realizacja tych celów jest bardzo dobrze opisana i przedyskutowana w Rozdziale 3 Wyniki, który, zgodnie z ww. punktami zawiera 2 podrozdziały o porównaniu struktur **POPC** versus **PCD** i **PCD** versus **CBD** w różnych wariantach i rozmiarach, por. Tabele 1-2. Dalej są 2 podrozdziały poświęcone dyfuzji tlenu O_2 między wodą i każdym z 3-ch opisanych typów domen, rozdzielone podrozdziałem rozstrzygającym o organizacji heterogennych dwuwarstw **PCD**, z wynikiem wskazującym (zb. niżej) na rozkład ciągły z wymieszaniem się w dwuwarstwie **PCD** cząsteczek **POPC** i cholesterolu. Wymienione 5 podrozdziałów poprzedza krótki acz wyczerpujący i przekonujący opis równoważenia wszystkich **19 wariantów dwuwarstw** (100-300 ns MD w zależności od wielkości układu; 900 ns w przypadku „opornego” modelu **Chol** ze startem z sieci kryształów cholesterolu), w tym 3-ch podwójnych dwuwarstw oddzielonych 6000 cząsteczek wody, do zastosowania dalej w pierwszym z podrozdziałów poświęconych badaniu dyfuzji tlenu. Dodam, że ani tu ani w Metodach (Rozdz. 2), nie zauważyłem wzmianki o o uwzględnieniu bądź nie warunku periodyczności pudełka symulacyjnego. Jednak, po sięgnięciu do obu publikacji Autorki, związanych z tą rozprawą, vide niżej, w których Kandydatka stosowała periodyczne warunki brzegowe 3D z sumowaniem PME dla uwzględnienia elektrostatyki zakładam, że dotyczy to wszystkich symulacji opisanych w rozprawie.

Startowe konfiguracje w MD w pierwszym podrozdziale o dyfuzji tlenu zawierają po 200 cząsteczek O_2 w 5800 cząsteczkach wody wyłącznie między dwuwarstwami, z zachowaniem proporcji molowej $[tlen]/[lipid]=1/2$ w każdym z 3-ch (**POPC**, **PCD** i **CBD**) typów układów. Zakładam, że obszar ten ma w symulacji reprezentować macierz międzykomórkową, choć na tym zupełnie nie znam się i byłbym wdzięczny za skomentowanie opisanego wyżej wyboru przez Kandydatkę w toku obrony. Drugi podrozdział o dyfuzji tlenu, zamykający rozdział Wyniki, składa się z 3-ch profili PMF (ang. *potential of mean-force*) przepychania siłą jednej (próbnej) cząsteczki tlenu przez dwuwarstwy **POPC**, **PCD** i **CBD** w celu określenia barier termodynamicznych tego procesu. Separacja dwóch podrozdziałów o dyfuzji tlenu podrozdziałem z symulacjami heterogennych dwudomenowych dwuwarstw typu **PCD** typu tratw mogłaby wydać się niefortunna, jednak z uwagi na zupełnie inną niż w zwykłych symulacjach MD specyfikę analizy PMF, taki porządek ma swą logikę.

Każdy z 4-ch „produktywnych” podrozdziałów, wyłączając badania PMF dyfuzji tlenu, zawiera analizy powierzchni, w tym gładkości RP i średniej powierzchni na lipid A_L , grubości dwuwarstw d_{pp}/d_{CC} , parametrów uporządkowania $Smol$, kątów nachylenia łańcuchów lipidowych zgodnie z ich definicjami specyficznymi dla cząsteczek **POPC** i cholesterolu. Dodatkowo, w przypadku dyfuzji, choć nie wyłącznie, analizowano też takie parametry jak współczynniki dyfuzji podłużnej i poprzecznej, średnią ruchliwość cząsteczek lipidu translacyjną i obrotową, rozkłady gęstości wybranych atomów/segmentów lipidu i bariery dyfuzji cząsteczki tlenu z profili PMF wzdłuż osi normalnej względem błony, a w domenach typów **PCD** i **CBD** także średnie liczby i rozkłady wiązań wodorowych i oddziaływań ładunkowych dla cząsteczek cholesterolu. Wymienione analizy są wsparte starannie podpisanymi 39 rysunkami i 9 tabelami, ilustrującymi zrównoważone dwuwarstwy; profile rozkładów mas, energii, entalpii swobodnej, dyfuzji; mapy 1D i 2D rozkładów kątów sferycznych ϕ i θ nachylenia cząsteczek lipidów. Daje to pojęcie o wielkiej pracy włożonej przez Doktorantkę w toku wykonywania i przygotowania rozprawy, jej docieklivości, staranności i zdyscyplinowaniu przy organizacji morza otrzymanych wyników w czytelny i przejrzysty układ. Każdy z pięciu produktywnych podrozdziałów kończy nieprzekraczająca jednej strony dyskusja wyników z uogólnionymi wnioskami, co zdecydowanie ułatwia recenzentowi końcową ocenę pracy. Z tych dyskusji wynika także, iż materiał podrozdziałów o porównaniach **POPC-PCD** i **PCD-CBD** jest opublikowany w periodykach o światowym zasięgu (*BBA-Biomembranes* 2012 i *J Phys Chem B* 2013) z Kandydatką jako pierwszym autorem.

Główne wnioski rozprawy:

Porównania **POPC-PCD** i **PCD-CBD** potwierdzają obserwowany prawie od stulecia efekt kondensacyjny cholesterolu w oddziaływaniu z lipidami błonowymi (Leathes JB. Condensing effect of cholesterol on monolayers *Lancet* 1, 853–856, 1925), skutkujący wygładzeniem powierzchni i uporządkowaniem błony, powiązany z przezroczystością soczewki oka. Równocześnie Kandydatka wykazała płynną strukturę (I_a) uwodnionych domen **CBD** i **PCD** w powiązaniu z ich średnim stopniem hydratacji, odpowiednio, 2,3 i 1,7 wiązań wodorowych na cząsteczkę cholesterolu. Z kolei wyniki symulacji największych układów dwudomenowych typu **PCD**, uporządkowanych na starcie MD zgodnie z modelem tratw cholesterolowych I_o , pokazują, że tratwy **CBD** w toku symulacji rozpadają się a struktura dwuwarstw przechodzi ze startowych uporządkowanych jako tratwy I_o w

nieuporządkowane płynne l_d . Dodatkowo, model supersieci z cząsteczkami fosfolipidu w roli parasoli dla cholesterolu w domenach typu PCD też nie jest obserwowany.

Co się tyczy dyfuzji tlenu, Kandydatka z symulacji MD uzyskuje wartości współczynników dyfuzji zgodne z danymi doświadczalnymi, co uwiarygodnia wnioski ostatniego podrozdziału o profilach PMF penetracji cząsteczki tlenu od wody do środków dwuwarstw **POPC**, **PCD** i **CBD**, w tym bariery energetyczne tej penetracji do **CBD** (>7 kcal/mol) w porównaniu do podobnych barier penetracji do **PCD** i **POPC** (2,6-2,8 kcal/mol), i końcowy wniosek, że duże stężenie cholesterolu w błonach komórek włókienkowych stanowi barierę dla dyfuzji tlenu do wnętrza soczewki oka.

Kandydatka nie ustrzegła się błędów. Prócz kilkunastu ewidentnych palcówek, które pominę, znalazły się też może palcówki bądź momenty nieuwagi, budzące konsternację, np. kiedy Autorka używa wymiennie różnych jednostek (\AA vs nm; kJ vs kcal, etc) nie widziałbym w tym nic złego, sam lubię rozmaitość, gdyby przy tym sama nie wpadała w zastawione przez siebie sidła. I tak na str. 83 omawiając rys. 3.18 pisze o pierwszym maksimum rozkładu radialnego przy 0.27\AA , gdzie niewątpliwie miało być 0.27 nm czyli 2.7\AA . Inne wybrane przykłady: w legendach rysunków z rozkładami gęstości mas zdarzają się zamienione definicje kolorów: Rys. 3.20 i 3.28 str 88 i 117 fiolet-róż C3-C17, powinno być odwrotnie; niżej na str. 88 „azotu N i potasu P” powinno być „...fosforu P”; str. 8 Tabela 2 wartości pierwszych 2-ch kolumn w wierszach pod POPC_POPC-Chol50 i pod CBD_POPC-Chol50 powinny być zamienione; inne zamiany: str 62-3 ”na rys. 3.5a i 3.6a ...POPC...z góry i z boku”, powinno być „...z boku i z góry”; str. 107 „na ilustracjach 3.33b i 3.34b... CBD_POPC-Chol50 i POPC_POPC-Chol50” też zamienione. Na str. 72 w legendzie rysunku i str. 73 w tekście też są przykłady zamian, zdarza się też błąd w jednostce ciśnienia (str 62 i 74), etc. Wystarczy. Podane przykłady wskazują i potwierdzają, jak trudno z benedyktyńską cierpliwością czy bez, wyeliminować drobne chochliki w tak dużym dziele, jakim jest skądinąd zwięzła i bardzo dobrze zorganizowana praca doktorska.

Podsumowując, oceniam rozprawę wysoko, a Kandydatkę jako samodzielną, zdyscyplinowaną wewnątrznie, dojrzałą naukowo Autorkę, zasługującą na stopień naukowy doktora. Wg mnie Jej rozprawa spełnia wymogi USTAWY z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym (zgodnie z artykułem 13 w/w Ustawy), i konkluduję tę ocenę rekomendując Panią mgr Elżbietę Plesnar i jej rozprawę do dalszych etapów przewodu i publicznej obrony doktorskiej.



Jerzy Ciarkowski