ZAKŁAD BIOFIZYKI

Lublin, 14 listopada 2017 r.

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

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Piotra Stępnia pt. „Struktura przestrzenna nanodysków jako modelu błony biologicznej stosowanego w badaniach białek błonowych"

Wielość oraz ranga zagadnień poznawczych w obszarze nauk biologicznych oraz medycznych, związanych z bezpośrednio z funkcjonowaniem membran lipidowo-białkowych, stanowiły siłę napędową procesu poszukiwania różnego rodzaju układów modelowych, przybliżających warunki fizjologiczne panujące w naturalnych błonach biologicznych, zarówno w aspekcie strukturalnym jak i dynamicznym. W ramach tego nurtu aktywności badawczej, od dziesięcioleci prowadzone były, między innymi, badania w układach warstw jednocząsteczkowych formowanych na granicy faz, na płaskich dwuwarstwach lipidowych formowanych na szczelinach oddzielających dwa roztwory wodne (tzw. BLM) oraz, przede wszystkim, w układach wielowarstwowych oraz jednowarstwowych liposomów. Inwencją ostatnich lat było wprowadzenie układu modelowego dwuwarstwowych błon lipidowych w formie ograniczonych przestrzennie „zwojami" helis białkowych struktur o rozmiarach rzędu wielkości pojedynczych nanometrów, tak zwanych nanodysków. Elegancja tego układu modelowego a może nawet pewna moda na „nanotechnologię" wiąże się zapewne ze znacznym zainteresowaniem jakie struktury te budzą wśród badaczy. Okazuje się jednak, iż nasza wiedza

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

o podstawowych parametrach strukturalnych oraz dynamicznych lipidów konstytuujących nanodyski daleka jest od niezbędnej do projektowania i prowadzenia prac badawczych oraz interpretacji ich wyników. W tym świetle, rozprawa doktorska przedstawiana przez pana mgr. Piotra Stępnia jawi się nie tylko jako interesująca ale również jako niezwykle ważna zaś zawarte w niej wyniki oczekiwane przez społeczność badaczy błon lipidowych.

Praca doktorska wykonana została pod kierunkiem dr hab. Anny Wiśniewskiej-Becker oraz dr Agnieszki Polit, jako promotora pomocniczego, w Zakładzie Biofizyki oraz w Zakładzie Biochemii Fizycznej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Rozprawa doktorska jest opracowaniem stosunkowo obszernym. Zredagowana została w języku polskim, na 158 stronach standardowego maszynopisu. Praca zredagowana została według typowego, optymalnego w moim odczuciu układu formalnego. Wstępna część literaturowa, prezentowana w ramach rozdziału pierwszego, doskonale wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z problematyką biomembran, ich modeli oraz zastosowanych technik badawczych. W ramach krótkiego, jednostronicowego rozdziału drugiego sformułowane zostały cele pracy, zarówno te strategiczne dotyczące analizy właściwości strukturalnych oraz dynamicznych nanodysków lipidowych jak i cele bardziej szczegółowe, dotyczące, na przykład, porównawczej analizy wpływu cholesterolu i jednego z jego analogów na właściwości fizykochemiczne membran. Rozdział trzeci, Materiały, oraz czwarty, Metody, w sposób przejrzysty i zwięzły, a zarazem wyczerpujący, przedstawia zastosowane procedury, na poziomie szczegółowości umożliwiającym przeprowadzenie analogicznych eksperymentów. W tym miejscu swojej oceny chciałbym podkreślić zastosowanie wielu komplementarnych podejść eksperymentalnych (w tym wieloaspektowa analiza sygnałów EPR znakowanych spinowo lipidów i analiza kinetyki zaniku fluorescencji znaczników fluorescencyjnych w błonach) oraz badań obliczeniowych. Podkreślić też chciałbym, że peptydy stosowane do stabilizacji nanodysków (z rodziny MSP) otrzymywane były na drodze nadekspresji w bakteriach *E. coli*. Najbardziej obszernym rozdziałem rozprawy, stanowiącym o jej wyjątkowym poziomie, jest rozdział piąty: Wyniki. Uzyskane rezultaty poddane zostały dyskusji w ramach rozdziału szóstego: Dyskusja. Rozdział ten czytałem z ogromną przyjemnością zaś w wyniku jego lektury wytworzyłem sobie obraz doktoranta jako badacza charakteryzującego się ciekawością a nawet dociekliwością poznawczą. Rozprawę zamyka rozdział siódmy, Wnioski końcowe, spis

cytowanego piśmiennictwa, jako nienumerowany rozdział pt. Literatura oraz załącznik prezentujący prowadzone w kooperacji z innymi specjalistami symulacje dynamiki molekularnej.

W pełni podzielam zdanie doktoranta co do wskazania zasadniczych wyników pracy, zestawionych w ramach rozdziału 7. Wnioski końcowe. Szczególnie istotne jest, w moim odczuciu, wyraźne wykazanie istnienia obszarów w płaszczyźnie nanodysków, charakteryzujących się diametralnie odmiennymi właściwościami dynamicznymi cząsteczek lipidów: w rejonie centralnym oraz w obszarze peryferyjnym, w bezpośredniej bliskości polipeptydów ograniczających powierzchnię boczną struktur. Informacje te wpłynąć powinny na zachowanie szczególnej ostrożności w interpretacji wyników badań prowadzonych z zastosowaniem wielu technik badawczych, dających wgląd jedynie w wielkości uśrednione po całym zespole cząsteczek w tego typu nano-strukturze. Zaznaczyć jeszcze chciałbym ogromnie cenne, moim zdaniem, zastosowanie podejścia polegającego na zestawianiu wyników uzyskiwanych z analiz eksperymentalnych oraz symulacji numerycznych, zarówno widm EPR jak i dynamiki molekularnej. Umożliwiło to, na przykład, rozdzielenie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za właściwości dynamiczne lipidów membranowych, między innymi dyfuzji rotacyjnej oraz migracji pomiędzy domenami o istotnie różnej częstości izomeryzacji *gauche-trans*. Inna klasa bardzo wartościowych wyników uzyskanych w ramach tego projektu doktorskiego wiąże się z porównaniem wpływu cząsteczek cholesterolu oraz jego analogu strukturalnego w postaci estru bursztynianowego. Pomimo faktu, iż związek ten jest stosunkowo wygodny w prowadzeniu badań, chociażby ze względu na lepszą rozpuszczalność niż cholesterol w środowisku polarnym oraz bardzo wyraźne sygnatury spektralne (np. w spektroskopii oscylacyjnej), okazuje się, że jego efekty są na tyle różne od cholesterolu, iż zdecydowanie wnioski z badań jednego związku nie mogą być uogólniane na drugi!

Poza wysokim poziomem merytorycznym, zaznaczyć chciałbym, iż rozprawa doktorska pana mgr. Piotra Stępnia jest opracowaniem wyjątkowo dobrze zredagowanym w aspekcie edycji tekstu oraz jakości grafik. W trakcie jej lektury praktycznie nie napotkałem miejsc, w których zaproponować mógłbym Autorowi jakiekolwiek korekty. Może jedynie dwie drobne propozycje:

1. str. 20., 5. wiersz od góry: zamiast „w podczas" proponuję „podczas",

2. str. 120., 7 wiersz od dołu: w miejsce „jest podpierany przez wartości…" wydaje mi się, że lepiej brzmi „znajduje poparcie w wartościach…".

Uwagę zwracają, natomiast, klarowność opisów oraz dojrzałość i wieloaspektowość dyskusji!

Tak obszerne i wielostronne opracowanie, jakim jest rozprawa doktorska pana mgr. Piotra Stępnia, dostarcza wiele ważnych informacji, pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Bardzo interesująca wydaje mi się obserwacja, która wskazuje na różnice w poziomie parametru uporządkowania lipidów znakowanych spinowo na różnych głębokościach w warstwie hydrofobowej błony, dla nanodysków oraz liposomów formowanych z DMPC (str. 64, ryc. 5.3). Istotne różnice wydają się być widoczne jedynie powyżej przejścia fazowego, dla głębokości C-10. Czy oznacza to, że porządkujący efekt struktury nanodysku wykazuje tak subtelną selektywność w stosunku do segmentalnej ruchliwości lipidów w błonie?
2. Ciekaw jestem czy konieczność zastosowania analizy sygnałów zaniku fluorescencji znacznika umieszczonego w nanodyskach, w oparciu o dwie składowe eksponencjalne wynika z faktu lokalizacji fluoroforów w obszarach peryferyjnych oraz bardziej centralnych analizowanych nanostruktur? Czy możliwe jest, że przy zastosowanych stężeniach znacznika fluorescencyjnego w stosunku do lipidów jego cząsteczki ulegać mogą spontanicznej asocjacji co mogłoby również wpłynąć na wyniki analizy czasów życia fluorescencji?
3. Podoba mi się bardzo optymistyczny wniosek wynikający z przeprowadzonego cyklu badań i sformułowany przez Autora rozprawy, według którego ograniczenia w swobodzie dyfuzyjnej lipidów w nanodyskach modelować mogą tzw. zatłoczenie molekularne (molecular crowding, ang.) charakteryzujące naturalne biomembrany, w związku z obecnością znacznej frakcji składników białkowych. Z drugiej jednak strony, obawiam się czy układy błonowe, w których niekiedy nawet ponad połowa powierzchni zajmowana jest przez białka (np. w przypadku błon tylakoidów) mogą być modelowane, z wielu względów, jedynie z zastosowaniem lipidów, nawet przy

podwyższonym ciśnieniu lateralnym? Ciekaw jestem jakie jest zdanie doktoranta na ten temat.

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pan mgr Piotr Stępień przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych badań eksperymentalnych oraz komplementarnych badań obliczeniowych. Część wyników tych badań ogłoszona została już w formie artykułu opublikowanego w 2015 r. w opiniotwórczym czasopiśmie BBA-Biomembranes. W pracy tej Piotr Stępień występuje w charakterze pierwszego autora. Ponadto, doktorant doskonalił swój warsztat naukowy w trakcie badań, których rezultaty zawarte zostały w publikacji w czasopiśmie ACS Chemical Neuroscience, która ukazała się przed kilkoma miesiącami.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Piotra Stępnia spełnia w zupełności warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Co więcej, w moim odczuciu, walory samej rozprawy, w szczególności zaś ogromna liczba rezultatów oraz ich znaczenie w obszarze pełnej charakterystyki nowego układu modelowego jaki stanowią nanodyski lipidowe, sprawiają iż rozprawę doktorską postrzegam w kategoriach wyróżniającej. Gratulując Doktorantowi oraz Paniom Promotor, tak wartościowych rezultatów uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr. Piotra Stępnia do dalszych etapów postepowania doktorskiego. Jednocześnie, uprzejmie wnoszę o rozważenie możliwości uznania ocenianej rozprawy doktorskiej jako wyróżniającej.