

dr hab. Piotr Setny  
Centrum Nowych Technologii  
Uniwersytetu Warszawskiego  
ul. Banacha 2c, 02-097 Warszawa

**Recenzja rozprawy doktorskiej pani Madhurimy Chattopadhyay pt. *The Role of Biological Water in Biomimetic Cell Membrane Dynamics and Molecular Interactions***

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska autorstwa pani Madhurimy Chattopadhyay powstała na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej Politechniki Poznańskiej, pod opieką pana dr. hab. inż. Łukasza Piątkowskiego, prof. PP. Praca dotyczy badania zależności dynamiki błon lipidowych od stopnia ich uwodnienia przy wykorzystaniu metod mikroskopii fluorescencyjnej. Poza samymi wynikami pomiarów istotnym jej aspektem jest opracowanie protokołu pozwalającego na uzyskanie stabilnych, odpornych na wysuszenie fragmentów dwuwarstwy lipidowej osadzonych na podłożu stałym. Rozprawa została przygotowana w języku angielskim, w formie zbioru trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych i dodatkowo zawiera manuskrypt czwartej, nieopublikowanej jeszcze pracy.

Jako złożone, delikatne a za razem dynamiczne obiekty, błony lipidowe są trudnym przedmiotem badań. Brak jest metod eksperymentalnych, które pozwalałyby uzyskać informacje o szczegółach atomowych organizacji błony oraz jej oddziaływań z białkami i otoczeniem wodnym, zachowując przy tym rozdzielczość czasową niezbędną do uchwycenia przebiegu zachodzących procesów. Z kolei, potencjalnie posiadające te zalety podejścia oparte o symulacje komputerowe napotykają problemy związane z długim czasem relaksacji fazy lipidowej. Co za tym idzie, kwestie takie jak istnienie tzw. tratw lipidowych, mechanizmy regulujące płynność błony, czy przebieg procesu fuzji wciąż pozostają nie w pełni wyjaśnione mimo dziesiątków lat intensywnych badań. W tym kontekście, dążenie do opracowania nowych metod oraz wykorzystanie ich do uzyskania wglądu w niedostępne dotąd aspekty funkcjonowania błon lipidowych należy uznać za dobrze dobrany cel pracy.

**Ocena merytoryczna**

Kontekst i motywacja dla prowadzonych badań zarysowane są we wstępnym, krótkim rozdziale pracy. Autorka podkreśla znaczenie zbadania efektów dehydratacji błon lipidowych i związanych z nią zmian dynamiki lipidów dla zrozumienia podstaw molekularnych szeregu procesów o znaczeniu biologicznym. Wskazuje także na istotne ograniczenie metodologiczne dla tego typu badań, wynikające z trudności w uzyskaniu dwuwarstwy lipidowej zachowującej niezbędną do wykonania pomiarów stabilność w warunkach niskiego uwodnienia. Rozdział ten w przekonujący sposób uzasadnia podjęcie badań oraz jasno nakreśla problem, który Doktorantka podejmuje się rozwiązać.

Właściwe wprowadzenie w tematykę i metodologię pracy znajduje się w części pierwszej rozprawy, obejmującej rozdziały od 2 do 7. Zawierają one opis właściwości fizykochemicznych i budowy błon biologicznych, omówienie możliwości uzyskiwania modelowych układów zawierających dwuwarstwy lipidowe, przedstawienie istotnych aspektów oddziaływania struktur błonowych ze środowiskiem wodnym, zarys mechanizmów dyfuzji oraz przegląd technik mikroskopii fluorescencyjnej. Rozdziały te napisane są bardzo dobrze i zapewniają informacje niezbędne do lektury ko-

lejnych części pracy. Klarowność, zwięzłość, a zarazem duża wartość merytoryczna (wprowadzenie zawiera odnośniki do ponad 200 pozycji literaturowych) wskazują na gruntowne opanowanie omawianej tematyki przez Doktorantkę. Mimo szerokiego zakresu przedstawionych zagadnień, w moim odczuciu, celowe byłoby dodatkowo uwzględnienie opisu struktur molekularnych stosowanych w pracy sond fluorescencyjnych oraz sposobu ich połączenia z cząsteczkami lipidów. Ułatwiłoby to zainteresowanym czytelnikom interpretację omawianych w dalszych częściach pracy informacji o dyfuzji tego typu obiektów w błonie lipidowej.

Druga część rozprawy zawiera kopie trzech publikacji oraz manuskrypt nieopublikowanego jeszcze artykułu. Pierwsza praca pt. *Hydration layer of few water molecules control lipid mobility in biomimetic cell membranes* została opublikowana w *Journal of the American Chemical Society*, będącym flagowym czasopiśmie Amerykańskiego Towarzystwa Chemicznego. Przedstawia ona opracowaną przez Doktorantkę metodę uzyskiwania stabilnych podczas osuszania dwuwarstw lipidowych osadzonych na podłożu stałym oraz analizę zmian współczynnika dyfuzji lipidów w zależności od stopnia uwodnienia układu. Badania dynamiki błony przeprowadzone zostały przy użyciu techniki odzyskiwania fluorescencji po fotowysbieleniu (ang. *fluorescence recovery after photobleaching, FRAP*). Uzyskane wyniki wskazują, iż szybkość dyfuzji lipidów stopniowo maleje wraz z obniżaniem wilgotności względnej do około 50 %, po czym utrzymuje się na stałym, niskim poziomie przy dalszym osuszaniu układu. W powiązaniu z danymi literaturowymi dotyczącymi struktury wody przy powierzchni błon, efekt ten autorzy pracy interpretują jako wynik destrukcji luźno związanej części warstwy hydratacyjnej, odpowiadającej za ekranowanie oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy silnie polarnymi grupami fosfatydylocholiny lipidów. Co istotne, jakościowo podobną zależność współczynnika dyfuzji od wilgotności względnej zaobserwowano dla współistniejących w błonie uporządkowanych i zdeorganizowanych faz lipidów o takim samym typie grupy polarnej. Stanowi to argument za tym, iż zarejestrowane efekty są wynikiem specyficznych zmian hydratacji fosfatydylocholiny raczej niż procesów zachodzących w hydrofobowym rdzeniu błony.

Opisywana w pracy procedura odwracalnego osuszania błon lipidowych jest cennym narzędziem badawczym, niewątpliwie otwierającym perspektywy do dalszych doświadczeń i zastosowań. Już pierwsze, opisane w omawianej pracy wyniki dają nieosiągnany dotąd eksperymentalnie wgląd w dynamikę błony lipidowej w warunkach niskiego uwodnienia. Jak podkreśla Doktorantka opisując motywację dla podjęcia badań, warunki takie mogą zachodzić w układach biologicznych, w tym podczas szczególnie istotnego procesu fuzji błon lipidowych. W tym kontekście ciekaw jestem zdania Autorki odnośnie potencjalnego paradoksu. Badania procesu fuzji prowadzą do wniosku, iż dehydratacja przestrzeni międzybłonowej sprzyja obniżeniu bariery energii swobodnej dla utworzenia połączenia pomiędzy błonami, w literaturze anglojęzycznej określanego jako *stalk*. Wymaga ono opuszczenia warstwy macierzystej przez łańcuch acylowy cząsteczki lipidu (tzw. *lipid splay*) i jego wnikięcia do sąsiadującej błony. Wydaje się, że w przypadku opisywanej kwazi-żelifikacji lipidów bariera energetyczna dla tego zjawiska powinna być raczej wyższa niż w błonach całkowicie uwodnionych, co sugerowałoby, że dehydratacja może raczej utrudniać niż sprzyjać fuzji.

Druga kwestia, co od której nie znalazłem komentarza w pracy odnosi się do pytania czy w oparciu o zgromadzone dane można jednoznacznie wykluczyć, iż towarzyszące osuszaniu spowolnienie dynamiki błony nie jest wynikiem powstawania bezpośrednich oddziaływań pomiędzy lipidami i stałym podłożem w miarę zanikania znajdującej się tam warstwy wody. Autorka w elegancki sposób wykazała co prawda, że współczynnik dyfuzji zmienia się podobnie w obu warstwach błony, jednak przy założeniu możliwości sprzężenia pomiędzy dynamiką warstw, potencjalnie pierwotnym efektem tłumaczącym uzyskane wyniki mogłoby być spowolnienie dyfuzji w obrębie warstwy zwróconej w kierunku podłoża.

Druga z przedstawionych prac, zatytułowana *Sensing Hydration of Biomimetic Cell Membranes*,

została opublikowana w czasopiśmie *Biosensors*. Opisane w niej metody i wyniki są podobne jak w pierwszej publikacji, jednak nacisk położony jest na przedstawienie opracowanego protokołu jako narzędzia pozwalającego określić liczbę cząsteczek wody w warstwie hydratacyjnej błony na podstawie pomiaru współczynnika dyfuzji lipidów. Oryginalnym, omawianym w pracy rezultatem jest podobieństwo charakteru zależności dynamiki błony od stopnia nawodnienia w przypadku membran zbudowanych z jednej i dwóch faz lipidów zawierających fosfatydylocholinę. Ponownie, zaobserwowany brak jakościowych różnic wskazuje iż dominujący wkład do obserwowanych efektów pochodzi od specyfiki hydratacji części polarnych. Trochę szkoda, że przy okazji tej pracy autorzy nie pokusili się o poszerzenie badań o symulacje komputerowe rozważanych układów. Jakkolwiek literatura dostarcza wyniki badań symulacyjnych odnośnie hydratacji błon lipidowych przy różnym stopniu nawodnienia, jednak nacisk kładziony jest w nich raczej na analizę dynamiki cząsteczek wody niż lipidów. Bezpośrednie skorelowanie zmian ruchomości lipidów ze szczegółami ich wzajemnego oddziaływania oraz interakcjami z cząsteczkami wody w rozdzielczości atomowej byłoby w mojej ocenie wartościowym wsparciem proponowanej metody.

Trzeci artykuł, pt. *Cooperativity between sodium ions and water molecules facilitates lipid mobility in model cell membranes* został opublikowany w *Chemical Science*, głównym czasopiśmie Królewskiego Towarzystwa Chemicznego. Opierając się na podobnej metodologii jak w powyższych pracach, opisane tu badania dotyczą wpływu kationów metali o znaczeniu biologicznym na zależność dynamiki dwuwarstwy lipidowej od stopnia uwodnienia. Głównym wynikiem jest obserwacja, iż obecność jednowartościowych jonów:  $\text{Na}^+$  lub  $\text{K}^+$ , choć bezpośrednio nie zmienia dynamiki błony, ma stabilizujący wpływ na warstwę hydratacyjną lipidów przez co opóźnia obniżanie się szybkości ich dyfuzji w miarę wysuszenia otoczenia. Wpływu takiego okazują się nie mieć jony dwuwartościowe:  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Zgodnie z interpretacją Autorki pierwszy z nich niejako zawłaszcza ujemnie naładowane miejsca wiążące w obrębie polarnej głowy lipidu, ograniczając ich oddziaływanie z wodą, natomiast drugi, podlegający najsilniejszej hydratacji, w ogóle nie nawiązuje bezpośrednich interakcji z lipidami. Są to wyniki bardzo ciekawe, pozwalające wnioskować o strukturalnych aspektach oddziaływania cząsteczek wody i jonów z błonami biologicznymi, a tym samym wkraczające w obszary dostępne do tej pory głównie za pomocą symulacji komputerowych.

Czwarty wątek prowadzonych przez Doktorantkę badań, przedstawiony w postaci manuskryptu artykułu, poświęcony jest określeniu charakteru dyfuzji lipidów w sytuacji niskiego uwodnienia. Wykorzystana w nim technika spektroskopii korelacji fluorescencji (ang. *fluorescence correlation spectroscopy, FCS*) pozwoliła na ustalenie, iż dyfuzja Brownowska obserwowana przy pełnej dostępności wody przechodzi w reżim subdyfuzyjny już po stosunkowo niewielkim spadku wilgotności. Skrupulatna analiza pozwoliła wykluczyć przyczyny wynikające ze specyficznej dynamiki sond fluorescencyjnych oraz model, w ramach którego anomalna dyfuzja wynika z podziału lipidów na dwie frakcje o różnej, lecz Brownowskiej dynamice. Uzyskane wyniki skłoniły Doktorantkę do zaproponowania hipotezy, w ramach której fluktuacje stopnia uwodnienia błony powodują chwilową, lokalną immobilizację lipidów skutkującą powstawaniem barier dla ruchu pozostałych elementów błony. Zmienność w czasie rozkładu obszarów bardziej i mniej mobilnych miałyby prowadzić do uśrednionego, subdyfuzyjnego charakteru dynamiki ogółu lipidów. Z jednej strony, jest to hipoteza spójna z obrazem wyłaniającym się ze wcześniejszych prac, który pozwala założyć, że luźno związana część warstwy hydratacyjnej fosfatydylocholiny albo pojawia się w całości, albo znika zupełnie, gdyż stabilizowana jest wzajemnym oddziaływaniem cząsteczek wody. Z drugiej jednak strony, anomalna dyfuzja zdaje się być obserwowana w badanych układach w skali czasowej sięgającej sekund, co rodzi pytanie czy faktycznie można tłumaczyć ją fluktuacjami hydratacji, których dynamika jest prawdopodobnie znacząco szybsza. Prezentowany manuskrypt jest niewątpliwie ciekawy i dobrze wpisuje się we front coraz bardziej zyskujących na znaczeniu badań nad dynamiką układów biomolekularnych.

## Ocena formalna

Rozprawa napisana jest w języku angielskim i jako całość obejmuje 143 strony. Składają się na nią: streszczenia w języku polskim i angielskim, krótki rozdział wstępny poświęcony określeniu motywacji i celów prowadzonych prac oraz dwie główne części zawierające odpowiednio wprowadzenie do tematyki badań i zestawienie tekstów publikacji wraz z podsumowaniem uzyskanych wyników. Pracę zamyka dodatkowy rozdział, w którym wymienione są osiągnięcia naukowe Doktorantki oraz dwa dodatki zawierające podziękowania i deklaracje współautorów co do ich udziału w przygotowaniu prezentowanych artykułów.

Układ pracy jest typowy dla rozpraw mających formę tzw. „spinki” i sposób prezentacji wyników jest w nim zdeterminowany przez podział na publikacje, z których każda stanowi zamkniętą całość. W tym kontekście, na uznanie zasługuje przygotowana specjalnie na potrzeby rozprawy część wstępna. Ma ona dobrze przemyślaną strukturę, właściwy stopień szczegółowości, a zarazem jest napisana w sposób ciekawy i łatwy w odbiorze dla czytelnika. Zamieszczone w niej rysunki są wykonane bardzo starannie, z widoczną dbałością o detale i spójny styl. Całość prezentuje się też bardzo dobrze od strony typograficznej.

Każdy z artykułów zamieszczonych w części II opatrzony jest odrębnym wstępem osadzającym jego treść w kontekście rozprawy jako całości. Do opublikowanych tekstów dołączone są także kompletne materiały dodatkowe deponowane na stronach czasopism. W każdej z opublikowanych prac Doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, co, biorąc dodatkowo pod uwagę dołączone deklaracje współautorów, nie pozostawia wątpliwości odnośnie jej wiodącego wkładu w uzyskanie prezentowanych wyników i przygotowanie manuskryptów.

Czytając rozprawę znalazłem wyjątkowo niewiele błędów edytorskich, które dla porządku wymieniam: stała Boltzmanna została oznaczona wielką literą, podczas gdy zwyczajowo stosuje się oznaczenie  $k_B$  (sekcja 4.1); w opisie dyfuzji anomalnej znalazł się skrót myślowy polegający na rozróżnieniu rodzaju dyfuzji w zależności od wzrostu lub spadku średniego odchylenia kwadratowego (MSD) w czasie, zakładam, że Autorce chodziło raczej o zmianę pochodnej MSD w czasie; omawiając średnią znajdującą się we wzorze 5.8, Autorka sugeruje, że brana jest ona po wielu, losowo dobranych czasach oczekiwania,  $\tau$ , podczas gdy czas oczekiwania jest ustalony, a uśrednianie odbywa się dla wielu losowo zapoczątkowanych pomiarów.

## Podsumowanie

Rozprawę doktorską autorstwa pani Madhurimy Chattopadhyay oceniam bardzo wysoko. Doktorantka z powodzeniem zrealizowała ambitne cele. Pierwszym z nich było opracowanie nowatorskiej metody uzyskiwania stabilnych błon lipidowych na podłożu stałym w warunkach niskiego uwodnienia. Drugim, wykorzystanie tej metody do scharakteryzowania dyfuzji lipidów w zależności od stopnia hydratacji i rodzaju jonów obecnych w środowisku. Przedstawione wyniki mają niewątpliwie wysoką wartość naukową. Sama metoda osuszania dwuwarstwy lipidowej jest częścią warsztatu dającego niedostępny dotąd, precyzyjny wgląd w zachowanie się błon biologicznych w warunkach niskiego uwodnienia. Z jednej strony, pozwala to na badanie specyficznych aspektów funkcjonowania organizmów żywych, z drugiej otwiera drzwi dla prac w dziedzinie fizyki, prowadzących do zrozumienia i opisu skomplikowanej dynamiki fazy lipidowej. O użyteczności i wadze uzyskiwanych wyników świadczy ich docenienie przez społeczność naukową wyrażające się publikacjami w najwyższej rangi czasopismach, jak również fakt, że wyniki te stały się podstawą do złożenia wniosku patentowego. Lektura rozprawy nie pozostawia wątpliwości iż pani Chattopadhyay jest główną autorką prezentowanych badań oraz, że w sposób bardzo dobry opanowała zarówno poruszaną tematykę jak i warsztat badawczy. Na uznanie zasługuje także znakomite przygotowanie rozprawy od strony edytorskiej.

Podsumowując, w mojej opinii rozprawa w pełni spełnia warunki stawiane rozprawom

doktorskim określone w ustawie *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018 r. i z przekonaniem wnoszę o dopuszczenie pani Madhurimy Chattopadhyay do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

### **Wniosek o wyróżnienie**

Wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy z uwagi na: a) nowatorski charakter i użyteczność opracowanej metody uzyskiwania stabilnych błon lipidowych w warunkach małej dostępności wody, b) przedstawienie oryginalnych, ciekawych wyników dotyczących oddziaływania błon lipidowych z cząsteczkami wody i jonami oraz dynamiki lipidów w reżimie ograniczonej hydratacji, c) wykorzystanie w pracy szerokiego zakresu metod eksperymentalnych, d) bardzo staranne przygotowanie rozprawy.

## Summary

I rate the doctoral dissertation by Ms. Madhurima Chattopadhyay very highly. The Author successfully accomplished ambitious goals which included, first, the development of an innovative method for obtaining supported lipid membranes that remain stable under low hydration conditions, and second, the application of the method to characterise the diffusion of lipids depending on the availability of aqueous solvent and the kind of dissolved ions. The presented results are of high scientific value. The method of controlled lipid bilayer desiccation allows obtaining insights into the behavior of poorly hydrated membranes that were not available before. On the one hand, it is of importance for understanding biologically-related phenomena, and on the other hand, it paves the way for physical studies on complex lipid phase dynamics. The significance and usefulness of the obtained results for the scientific community are evidenced by their appearance in top-ranking journals, as well as by the fact that they have become the basis for a patent application. Considering the available information there is no doubt that Ms. Chattopadhyay is the main author of the presented results and that she has mastered both the subject matter and the associated research methodologies. Last, but not least the editorial side of the presented dissertation also deserves high praise.

To conclude, in my opinion the dissertation fully meets the legal requirements and conditions necessary for obtaining PhD degree by its author. I am confident to express my recommendation for advancing Ms. Madhurima Chattopadhyay to the further stages of the evaluation procedure. At the same time, I propose that the dissertation is awarded with distinction for its contribution to the field and high quality.

Below I summarise points that raised my curiosity or attention:

- The Author notes that low hydration conditions are exhibited by lipid membranes during the fusion process. Computational studies indicate that close proximity of two membranes lowers the free energy barrier for the formation of the first fusion intermediate, so called stalk. Stalk nucleation requires splaying of one lipid tail and its insertion into the opposing membrane leaflet. Given the observed lipid gellification upon desiccation, such process appears less probable than in fluid membrane. I am curious about the Author's perspective on this potential puzzle.
- Is it possible to safely dismiss the hypothesis that the observed diffusion slow down at low hydration conditions is caused by membrane friction against its supporting mica layer rather than by intrinsic lipid-lipid interactions? The Author elegantly demonstrates that both, the supported and environment-facing layers, respond equally to dehydration, but can this be explained by assuming that upon solvent expulsion the supported leaflet becomes arrested due to collision with mica surface and the other one slows down due to interleaflet coupling?
- The Author proposes a hypothesis according to which the anomalous diffusion of partially desiccated membrane arises due to transient immobilisation of lipid patches caused fluctuating solvent availability. Given that the observed subdiffusive regime apparently extends to seconds, I am wondering whether the Author can envision any technical possibility to independently demonstrate that the rearrangement of lipid hydration layer can indeed occur at the relevant, relatively slow time scale.