



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 11 czerwca 2024 r.

Dr hab. Wojciech Grudziński, prof. UMCS
Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej
Pani mgr Emilii Krok
pt. "Eukaryotic and prokaryotic biomimetic cell membranes:
structure and its relation to environmental conditions"

Błony biologiczne to złożone struktury, które tworzą się m.in. dzięki spontanicznej samoorganizacji cząsteczek lipidów w środowisku wodnym. Podstawową rolą błon jest zapewnienie bariery ochronnej dla komórek poprzez utrzymanie ich integralności i autonomii. Błony biologiczne wraz z wbudowanymi w nie strukturami zapewniają stan równowagi wewnątrz komórki niezależnie od sytuacji w otaczającym komórkę środowisku. Kompozycja błon jest bardzo złożona, jej skład (lipidowy i białkowy) ma bardzo istotne znaczenie m.in. dla wybiórczego transportu substancji oraz komunikacji międzykomórkowej. W błonach komórkowych występują lokalne, przestrzenne niejednorodności, które tworzą się w obecności lipidów, steroli i bardzo często białek. Takie domeny mogą być centrami wiążącymi dla określonych biomolekuł (np. białek), a także biorą udział w wielu procesach na poziomie komórkowym (funkcjonowanie kanałów jonowych, sygnalizacja komórkowa, transport błonowy, reakcje enzymatyczne). Dodatkowo obszary domen (i ich granice) mogą preferencyjnie wiązać np. toksyny czy też stanowić dla nich szlaki migracji do wnętrza komórki. Niezaprzeczalne znaczenie tych trawopodobnych regionów w aktywności komórkowej sprawia, że badania nad ich formowaniem i kontrolowaniem parametrów dotyczących ich heterogeniczności w modelowych układach membranowych jest jednym wiodących kierunków współczesnej nauki. W wielu laboratoriach modelowe błony lipidowe są podstawowym poligonem doświadczalnym, na którym w kontrolowanych warunkach weryfikowane są hipotezy badawcze dotyczące tego obszaru. Wiedza, która płynie z tego

źródła wzbudza zainteresowanie wśród naukowców m.in. z takich dziedzin jak biofizyka, biologia molekularna i medycyna.

Z tej perspektywy rozprawa doktorska Pani mgr Emilii Krok jest opracowaniem bardzo interesującym i niezmiernie ważnym. Pani magister w swojej pracy postanowiła wyjaśnić skomplikowane mechanizmy leżące u podstaw separacji fazowej i powstawania lokalnych heterogeniczności w modelowych błonach komórkowych, zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych. Przedstawione przez Doktorantkę badania istotnie przesuwają granice nauki i pozwalają lepiej zrozumieć mechanizmy molekularne odpowiedzialne za formowanie się lokalnych niejednorodności w błonach, a także dostarczają nam nowych możliwości wpływania na rozmiar, kształt, krzywiznę i rozmieszczenie domen błonowych.

Praca doktorska została przygotowana w Zakładzie Fizyki Molekularnej kierowanym przez Panią prof. dr hab. Alinę Dudkowiak, w Instytucie Fizyki na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej Politechniki Poznańskiej w samodzielnej grupie badawczej założonej i prowadzonej przez uznanego naukowca specjalizującego się w badaniach mikroskopowych – dra hab. Łukasza Piątkowskiego, profesora PP. Jednostka badawcza, w której przygotowana została rozprawa, jest wiodącym ośrodkiem, w którym prowadzone są badania spektroskopowe biomimetycznych układów błonowych na absolutnie światowym poziomie. W przedstawionej pracy doktorskiej znakomicie widać wykorzystanie przez Autorkę potencjału badawczego jednostki macierzystej i oferowanych przez nią zasobów związanych z zapleczem aparaturowym i doświadczeniem kadry.

Doktorantka zdobywała doświadczenie badawcze biorąc udział w trzech aplikacjach patentowych, sześciu grantach jako wykonawca (co-investigator): dwa projekty EMBO, grant FNP First TEAM, trzy granty wewnętrzne PP oraz trzech projektach badawczych, w których była liderem (PI): dwa granty wewnętrzne PP i trwający projekt Preludium finansowany przez NCN. Rezultaty, m.in. tych badań ukazały się nie tylko w trzech publikacjach naukowych, stanowiących podstawowy wkład do recenzowanej rozprawy doktorskiej, ale też w pięciu innych, oryginalnych pracach badawczych. Artykuły te opublikowane zostały w czasopismach o bardzo wysokich wskaźnikach wpływu, jak np. *Journal of the American Chemical Society* (IF 16,383), *Chemical Science* (IF 9,969), *Nanoscale* (6.7) czy *Journal of Molecular Lipids* (IF 6,0).

Rozprawa doktorska ma charakter spójnego tematycznie cyklu trzech wieloautorskich prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, poprzedzonego komentarzem autorskim. Wszystkie czasopisma, w których pojawiły się artykuły z cyklu znajdują się w aktualnym wykazie czasopism i są to bardzo dobre, międzynarodowe periodyki o wysokim współczynniku wpływu (IF odpowiednio: 6.7; 6.0; 3.4). Do rozprawy dołączony jest kompletny zbiór oświadczeń współautorów, z których wynika, że udział Doktorantki w przedłożonych w ramach rozprawy



pracach jest znaczący i jednoznacznie wyodrębniony. Udział ten wynika również z pozycji Doktorantki wśród współautorów artykułów, gdyż we wszystkich pracach rozprawy Doktorantka jest nie tylko pierwszym autorem, ale też autorem korespondencyjnym. Autoreferat poprzedzający cykl stanowi znakomicie napisane opracowanie, zredagowane w języku angielskim na 63 stronach, obejmujące: cztery rozdziały zawierające: wstęp, omówienie błon komórkowych i błon modelowych oraz stosowane techniki badawcze, trzy kolejne rozdziały to zasadnicze publikacje cyklu, każda z nich wprowadzona jest krótkim wstępem. Rozdział ostatni to podsumowanie najważniejszych wyników i perspektywy dalszych badań. Autoreferat poprzedza spis treści, spis źródeł finansowania doktoratu oraz wykaz skrótów i akronimów, a także, zgodnie z wymogami formalnymi, praca zawiera streszczenia przygotowane w języku polskim i angielskim. Pracę zamyka obszernie zestawienie dotychczasowej aktywności naukowej oraz obszerna, złożona z ponad 200 pozycji literatura. Jest tu jedynie niewielki odsetek prac sprzed roku 2000, a wśród nich znaczna część to klasyczne prace historyczne np. Stokesa z 1852 r., Rayleigha z 1879 r., Smoluchowskiego z 1921 r. czy Jabłońskiego z 1933 r. Większość to prace współczesne, prezentujące aktualny stan wiedzy naukowej (10% to prace nie starsze niż 5 lat). Wszystkie cytacje są to odniesienia do literatury fachowej, w większości do artykułów naukowych w uznanych i liczących się czasopismach. Wykorzystanie cytowanego piśmiennictwa (zarówno w autoreferacie jak i w artykułach cyklu) bezdyskusyjnie świadczy o umiejętności korzystania z literatury naukowej i dobrej orientacji w tematyce prowadzonych badań.

Autorka wykazała się znakomitą aktywnością naukową: (i) wraz z cyklem prac ujętych w doktoracie (trzy artykuły) jest współautorką łącznie 8 publikacji (h-index 4 wg WoS i Scopus) a także 8 opublikowanych doniesień konferencyjnych; (ii) aktywnie uczestniczyła w konferencjach naukowych (7 krajowych, 11 zagranicznych), prezentując tam wyniki swoich badań podczas wystąpień ustnych (7 wykładów) oraz sesji posterowych (11 plakatów); (iii) jest współautorem trzech patentów krajowych; (iv) była głównym wykonawcą w trzech projektach, jednym finansowanym przez NCN (Preludium) i dwu wewnętrznych grantach Politechniki Poznańskiej, dodatkowo była współwykonawcą w sześciu grantach (FNP-First TEAM, dwu EMBO, trzech wewnętrznych); (v) brała udział w pięciu, średnioterminowych stażach zagranicznych (łącznie ponad rok) (vi) była stypendystką i laureatką kilku programów (EBSA, NAVA, DAA, MIT); (vii) uczestniczyła w kilku kursach i szkoleniach (zarówno naukowo-badawczych jak i skierowanych do recenzentów oraz autorów artykułów naukowych); (viii) podejmowała obowiązki recenzenta w kilku prestiżowych periodykach (IF m.in. 7.7, 6.1 czy 4.7). Powyższa aktywność, nie tylko w pełni wypełnia tradycyjne wymagania stawiane przed kandydatami na stopień doktora, ale w mojej ocenie znacznie je przewyższa.

Rozdziały wstępne stanowią wprowadzenie do tematu i jednocześnie jasno definiują motywacje Autorki i cele jakie sobie postawiła na początku swojego doktoratu. Autorka w sposób klarowny, obszerny, znakomicie zilustrowany graficznie omawia najważniejsze zagadnienia związane z tematem



rozprawy doktorskiej, skupiając się na charakterystyce dwuwarstw lipidowych, zróżnicowaniu błon lipidowych, czy specyfice błony eukariotycznej i prokariotycznej. W dalszej części, Autorka omawia również wykorzystywane techniki spektroskopowe i mikroskopowe, które były istotne podczas realizacji zaplanowanych przez nią zadań badawczych. Przy tej okazji zwrócić chciałbym również uwagę, że do swoich badań Doktorantka zastosowała zestaw zaawansowanych, komplementarnych i precyzyjnie dobranych technik badawczych, między innymi takich jak: techniki obrazowania przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej czy też mikroskopii sił atomowych. Przywołanie tych technik daje czytelnikowi wgląd w metodykę pracy autorki i stanowi podstawę dla dalszych rozważań naukowych przedstawionych w rozprawie. W trakcie omawiania poszczególnych zagadnień Autorka nie tylko precyzyjnie i szczegółowo je opisuje, odnosząc się do istniejących doniesień naukowych i aktualnych badań, ale też trafnie akcentuje ważne a często intrygujące aspekty. W tej części rozprawy, autorce udaje się również umiejętnie wprowadzić czytelnika w problemy, z jakimi zmagają się współcześni badacze błon komórkowych. Ta część pracy świadczy o dużej wiedzy Autorki, a także tym, że ma ona dużą świadomość rozległości poruszanych problemów.

Rozdziały 5-7 ocenianej rozprawy doktorskiej zawierają oryginalne artykuły naukowe (wraz z materiałami dodatkowymi) stanowiące elementy cyklu. Każdy z nich poprzedza krótki wstęp, który syntetycznie streszcza pracę, akcentując jej najistotniejsze elementy oraz graficznie ją podsumowuje. Pierwsza publikacja koncentruje się na tym jak zmiana pH środowiska wpływa na powstawanie, dynamikę i stabilność biomimetycznych błon komórkowych z separacją faz. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę dotyczyły tego jak domeny fazy uporządkowanej zmieniają się w szerokim zakresie pH. Stwierdziła Ona wzrost wielkości domen następujący wraz ze wzrostem pH oraz odnotowała, że współczynnik dyfuzji (zarówno dla fazy uporządkowanej, jak i nieuporządkowanej) pozostaje bez zmian. Warto tu wspomnieć, że badania te wykorzystują nowatorską metodę tworzenia biomimetycznych błon komórkowych z separacją faz, opracowaną w grupie badawczej prof. Łukasza Piątkowskiego.

W drugiej publikacji Autorka opisała badania dotyczące odpowiedzi strukturalnej (w skali nano) dwuwarstw lipidowych na podłożu stałym (SLB) w szerokim zakresie stopnia uwodnienia, w tym całkowitego wysuszenia (bez wprowadzania środków stabilizujących membrany czy mechanicznych modyfikacji podłoża). Używając mikroobrazowania fluorescencyjnego, Autorka pokazała istotne zmiany w kształcie domen L_o , które wraz ze spadkiem uwodnienia charakteryzowały się bardziej postrzępionym obwodem i kształtem bardziej odbiegającym od kolistego. Analizując intensywności fluorescencji sondy znakującej L_d (DOPE-Atto 633) w obszarach fazy L_o Doktorantka wykazała, że istnieje zwiększona migracja lipidów tworzących fazę L_d wewnątrz domen błonowych. Zwiększając rozdzielczość obrazowania tj. wykorzystując technikę mikroskopii sił atomowych, Autorka pokazała, że (i) obniżenie stanu uwodnienia błony prowadzi do wzmożonego mieszania lipidów tworzących fazę L_d z lipidami



tworzącymi fazę L_0 ; (ii) niedopasowanie wysokości pomiędzy fazami zmniejsza się 2-krotnie podczas przejścia od membrany całkowicie uwodnionej do całkowicie wysuszonej (przy jednoczesnym, niemal 3-krotnym spadku naprężenia linii (*line tension* - siły wewnętrznej występującej na granicy pomiędzy dwoma obszarami lipidowymi)). Dodatkowo, dokonała bardzo ważnej weryfikacji, tj. stwierdziła, że proces ten jest w pełni odwracalny. Również w tym przypadku do pomiarów AFM w warunkach zmiennej wilgotności wykorzystano nowatorskie rozwiązania konstrukcyjne opracowane zespołem badawczym prof. Łukasza Piątkowskiego.

W trzeciej pracy Autorka przeprowadziła rekonstrukcję biomimetycznych błon komórkowych o rosnącym stopniu złożoności (dwu i trójskładnikowych mieszanin lipidów), charakteryzując m.in. układy zawierające fosfatydylocholinę PC i PE lub PC i PG, gdzie wskazała różnice w organizacji strukturalnej w porównaniu z modelami zawierającymi jedynie typowe lipidy bakteryjne PE i PG (Doktorantka pokazała, że powszechnie stosowany model błony bakteryjnej jest niesatysfakcjonujący). Tworząc membrany trójskładnikowe zawierające PE, PG i kardiolipinę (dobierając proporcje składników dla szerokiego obszaru mapy składu charakterystycznego dla różnych szczepów bakterii – znakomity diagram 2A w publikacji 3) udowodniła, że nawet niewielkie zmiany w profilu lipidowym mogą mieć ogromny wpływ na podstawowe właściwości powstających modelowych błon typu GUV (krzywizna błony, wielkość, asymetria czy proporcje rozdziału faz).

Końcowy rozdział pracy doktorskiej zatytułowany „Perspektywy” zarysowuje możliwe ścieżki dalszych badań, które, mam nadzieję, przerodzą się w kolejne projekty naukowe, a zarazem dalsze etapy kariery naukowej Doktorantki.

Przedstawione w rozprawie wyniki istotnie przesuwają granice nauki i są niezwykle interesujące. Na większość pytań, które nasuwały mi się podczas czytania autoreferatu otrzymałem odpowiedzi w treści artykułów oryginalnych. Również dyskusje, w których uczestniczyłem podczas prezentacji wyników przez Doktorantkę i współpracowników na wspólnych konferencjach oraz warsztatach istotnie zmniejszyły pulę moich wątpliwości czy komentarzy. Spośród tych, które pozostały chciałbym poprosić o odpowiedź na poniższe:

1. Autorka wspomina o korelacji pomiędzy wpływem promieniowania UV i dehydratacji na bakterie. Czy istnieje hipoteza dotycząca konkretnego mechanizmu, który mógłby być odpowiedzialny za taki stan rzeczy? Weryfikacja takiej hipotezy na gruncie doświadczalnym to mogłaby być bardzo ciekawa ścieżka badawcza.
2. W pracy pani mgr Emilia Krok pokazała, że opracowany został warsztat eksperymentalny, który dzięki modyfikacji warunków uwodnienia i pH pozwala na projektowanie struktur lipidowych o określonych, zadanych parametrach. Czy planowane są (jeśli tak to jakie) badania gdzie tworzone będą konkretne, pożądane struktury lipidowe i na nich będą testowane hipotezy badawcze np. dotyczące transportu, przepuszczalności, dokowania itp.?
3. W opisywanych badaniach do analizy procesu dyfuzji używana była technika odtwarzania sygnału fluorescencji po wybieleniu barwnika (FRAP). W pracy Autorka pisze, że „procedura pomiarowa



i analiza danych w technice FRAP są łatwiejsze niż w innych technikach”. Czy są inne przesłanki do zastosowania w tych badaniach wyłącznie tej techniki (a nie np. FCS czy SPT)? Czy w badanych układach, podczas pomiarów wstępnych, porównywano wyniki parametrów dyfuzyjnych uzyskiwane z FRAP z innymi technikami?

4. W pracy Autorka używa stwierdzeń: „laser power [...] is adjusted to minimize the photobleaching of the dye”, czy „exposed to the high-intensity laser pulse” przy opisie FRAP, czy „using fixed imaging conditions such as detection settings and laser power” (publikacja 3). Jak duże/małe były odpowiednio te moce lasera? Jak je dobierano podczas pomiarów?
5. Czy prowadzono wstępne badania pozwalające na stwierdzenia czy znakowanie lipidów nie wpływało na badane struktury (ruchliwość, dyfuzja, tworzone struktury), i ewentualnie jak duże udziały procentowe/molowe frakcji znakowanej zmieniały istotnie układ pomiarowy?
6. Z dużym zainteresowaniem poznałbym bardziej szczegółowy niż zawarty w publikacjach opis autorskich rozwiązań konstrukcyjnych (pomiar AFM), które zostały zastosowane w badaniach prezentowanych w recenzowanej pracy doktorskiej.
7. Publikacje naukowe stanowiące cykl, pozostała aktywność naukowa Autorki, w tym dorobek publikacyjny, czy stosowany zestaw technik i metod eksperymentalnych, w mojej ocenie, nie pozostawiają wątpliwości, że ubieganie się o stopień doktora nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria materiałowa przez Panią mgr Emilię Krok jest w pełni uprawnione, niemniej w autorskim komentarzu do cyklu zabrakło mi krótkiego uzasadnienia czy też wydobycia tych aspektów i zagadnień, które zakotwiczą ten doktorat wśród nauk inżynieryjno-technicznych we wspomnianej dyscyplinie.

Na podkreślenie zasługuje bardzo wysoki poziom edytorski rozprawy. Praca jest niezwykle estetyczna, poczynając od okładki, poprzez stronę tytułową, wszystkie grafiki, rysunki, ryciny i schematy. Praca zawiera nie tylko informację ściśle związane z merytoryczną stroną prowadzonych badań, ale wielokrotnie zawiera tło historyczne, drobne ciekawostki czy wręcz anegdoty związane z odkryciami czy ich bohaterami. Dodatkowo Doktorantka dowiodła swojej erudycji wzbogacając pracę o piękne, często zaskakujące i intrygujące cytaty: od Richarda Feynmana poprzez Benjamina Franklina, aż do ... Agathy Christie. Rozdziały 2., 3. i 4. mogłyby, w niezmięnionej niemal formie, zostać przeniesione do podręczników akademickich w bardzo dobrych wydawnictwach. Nie posiadając niezbędnych kompetencji aby ocenić jakość języka angielskiego, zasięgnąłem zewnętrznej opinii dwojga niezależnych anglistów, którzy zgodnie stwierdzili, że "praca napisana jest pięknym, bogatym i precyzyjnym językiem, którym Autorka z lekkością opisuje skomplikowane zagadnienia, stosując zaawansowane struktury gramatyczne." W pracy znalazłem jedynie trzy błędy edytorskie (w pierwszej linii streszczenia polskiego – literówka; w środku pracy, na stronie 44, ostatni wiersz: jest S_n , a powinno być T_n ; na końcu pracy, w poz. 75 literatury – formatowanie/kursywa). Biorąc pod uwagę pedantyczną wręcz redakcję całości rozprawy, nie mogę oprzeć się wrażeniu, że powyższe uchybienia Autorka pozostawiła z premedytacją, aby zweryfikować czy recenzenci rzetelnie ('od deski do deski') przeczytali pracę. Drobnym uchybieniem jest też przenoszenie niektórych wyrazów w polskojęzycznym streszczeniu (prawdopodobnie zawinił automatyczny algorytm).



Podsumowując chciałbym zaznaczyć, iż Pani magister przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opartą na wynikach precyzyjnie zaplanowanych i przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Prace te wymagały wszechstronnej znajomości różnych technik badawczych i podejść metodologicznych. Rozprawa doktorska opiera się na oryginalnych wynikach i analizach, które zostały opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopismach specjalistycznych, oraz trzech zgłoszeniach patentowych, co jednoznacznie świadczy o wyjątkowej dojrzałości naukowej Doktorantki.

W mojej opinii oceniana rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich oraz warunki określone w ustawie z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Niniejszym składam wniosek do Rady Dyscypliny Inżynieria materiałowa Politechniki Poznańskiej o dopuszczenie mgr Emilii Krok do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria materiałowa, w tym do publicznej obrony.

Z uwagi na wszystkie, powyżej przytoczone pozytywne oceny tej pracy, aktualność tematyki, uniwersalny charakter rezultatów rozprawy, które otwierają w zasadzie niezliczone możliwości dalszych badań nad zachowaniem membran w warunkach niedoboru wody czy zmiennego pH, a także potencjał wdrożeniowy czy też możliwość wykorzystania tych wyników w innych dziedzinach (medycynie, farmakologii, biotechnologii czy współczesnej kosmetologii), ale przede wszystkim bardzo wysoki poziom naukowy zaprezentowanych badań oraz jakość warsztatu doświadczalnego uważam, że ten doktorat jest wyjątkowy. Dodatkowo aktywność naukowa i publikacyjna Autorki jest zdecydowanie ponad przeciętną. W związku z tym **wnioskuję do Rady Dyscypliny Inżynieria materiałowa Politechniki Poznańskiej o uznanie przedmiotowej rozprawy doktorskiej za wyróżniającą.**

Gratuluje Doktorantce oraz Panu Promotorowi osiągnięcia tak wartościowych wyników. Jest to szczególne osiągnięcie, które podkreśla wysoką jakość pracy badawczej ich laboratorium oraz wytrwałości w dążeniu do celu Doktorantki.

Wojciech Gurdowski

