

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

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Emilii Krok pt. *Eukaryotic and prokaryotic biomimetic cell membranes: structure and its relation to environmental conditions*

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska autorstwa pani mgr inż. Emilii Krok powstała na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej Politechniki Poznańskiej, pod opieką pana dr. hab. inż. Łukasza Piątkowskiego, prof. PP. Praca dotyczy badania zmian organizacji i dynamiki błon lipidowych w odpowiedzi na modyfikację warunków zewnętrznych. Dodatkowo poruszonym zagadnieniem jest określenie rodzaju i proporcji podstawowych typów lipidów pozwalających na uzyskanie możliwie prostego lecz wiarygodnego modelu błony bakteryjnej. Rozprawa została przygotowana w języku angielskim, w formie zbioru trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Błony lipidowe są obiektem intensywnych badań naukowych już od dekad. Chociaż dziś już w pełni dostrzegamy, iż ich stopień komplikacji oraz rola wykraczają daleko poza proste hydrofobowe bariery rozdzielające kompartmenty komórkowe, liczba pytań pozostających bez odpowiedzi wcale nie maleje. Szczególnie interesującym zagadnieniem jest wpływ mikrostruktury błon na ich funkcje. Manifestuje się on przez zależną od lokalnej organizacji modulację płynności i topografii warstwy lipidowej, jej specyficzne oddziaływania z białkami oraz predyspozycję do udziału w zmianach topologii takich jak fuzja czy pączkowanie. Mimo fundamentalnego znaczenia, badania nad tymi problemami postępują stosunkowo powoli, czego przykładem są trwające od lat osiemdziesiątych ubiegłego stulecia debaty na temat istnienia i potencjalnej roli tzw. tratw lipidowych. Przyczyną są między innymi ograniczenia metod eksperymentalnych, w szczególności trudność uzyskania rozdzielczości przestrzennej pozwalającej rozróżnić mikrodomeny błony przy jednoczesnym zachowaniu rozdzielczości czasowej niezbędnej do uchwycenia przebiegu zachodzących procesów. Komplementarne podejścia, oparte o symulacje komputerowe, napotykać natomiast ograniczenia wynikające z powolnej relaksacji fazy lipidowej.

Podjęta przez doktorantkę tematyka, obejmująca zastosowanie szerokiej palety metod eksperymentalnych do systematycznej analizy mikroorganizacji biomimetycznych błon lipidowych w kontekście zmian pH środowiska zewnętrznego, stopnia uwodnienia oraz modyfikacji ich składu, jest istotna i dobrze wpisuje się w nurt światowych badań, pozostając na styku bioinżynierii i biologii molekularnej.

Ocena merytoryczna

Pierwszy rozdział pracy obejmuje wprowadzenie do tematyki badań, uzasadnienie jej podjęcia oraz omówienie struktury rozprawy. Opisując motywację dla przeprowadzonych prac, autorka skupia się na zarysowaniu istotnej biologicznej roli mikrodomen lipidowych oraz na wskazaniu, iż szereg pytań dotyczących mechanizmów ich powstawania oraz udziału w procesach życiowych pozostaje bez odpowiedzi. W moim odczuciu, niektóre elementy opisu mikrostruktury błon

są tu nieco zbyt szczegółowe jak na rozdział wstępny, a ich zrozumienie dla czytelnika mniej zorientowanego w tematyce może być trudne bez wcześniejszej lektury kolejnych części pracy. W tekst wkradł się skrót myślowy w postaci stwierdzenia, iż nowotworowe komórki macierzyste mają tendencję do lokalizowania się w obrębie tratw lipidowych. W podobnym duchu, niefortunny jest rys. 1.1D, mogący sugerować, iż struktury wirusów są porównywalnej wielkości do pojedynczych fosfolipidów. Pomimo stosunkowo rozbudowanej zawartości merytorycznej, podrozdział zatytułowany "Motivation", mający, jak mniemam, przedstawić motywację dla podjęcia badań nie zawiera wprost przedstawionej informacji dlaczego akurat zagadnienia takie jak efekty zmian poziomu nawodnienia błony lub odczynu środowiska są szczególnie godne uwagi lub w jakim celu warto rozważać mikroorganizację biomimetycznych błon bakteryjnych. Stosowne argumenty znajdują się dopiero w kolejnym podrozdziale, w którym Autorka omawia strukturę pracy oraz zawartości poszczególnych publikacji.

Drugi rozdział pracy poświęcony jest opisowi biologicznych błon lipidowych. Autorka sprawnie przedstawia fizyczne podstawy mechanizmu tworzenia dwuwarstwy przez cząsteczki fosfolipidów, zwraca uwagę na różnorodność i specyficzne właściwości lipidów oraz zarysowuje różnice w budowie błon eukariotycznych i bakteryjnych ze szczególnym uwzględnieniem bakterii gram dodatnich i gram ujemnych. Trochę szkoda, że nie znalazło się miejsce na krótkie omówienie białek membranowych w zakresie sposobu ich oddziaływania z błonami i roli funkcjonalnej, zwłaszcza w odniesieniu do wpływu na organizację fazy lipidowej. W moim odczuciu, właśnie w tym rozdziale, raczej niż we wstępie, korzystniejsze byłoby zawarcie informacji o mikrodomenach i związanych z nimi procesach biologicznych.

Rozdziały trzeci i czwarty zawierają omówienie modelowych układów reprezentujących błony lipidowe oraz metod eksperymentalnych wykorzystanych w pracy. Zgromadzone informacje są wyczerpujące i stanowią bardzo dobrą podstawę do lektury publikacji składających się na główną część pracy. Mimo, z natury rzeczy, dość technicznego charakteru przedstawianego materiału, Autorce z powodzeniem udało się opisać go w sposób ciekawy i łatwy w odbiorze. Na uznanie zasługuje chęć do zapewnienia czytelnikowi szerszego kontekstu, zarówno historycznego jak i naukowego, dla przedstawianych zagadnień. Swoboda wypowiedzi jak i duża wartość merytoryczna omawianych rozdziałów, poparta zawartymi w nich odnośnikami do ponad 100 pozycji literaturowych (na ogólną liczbę ponad 200 dla całej pracy), świadczą o ewidentnej biegłości Doktorantki w zakresie technik eksperymentalnych.

Piąty rozdział rozprawy zawiera kopię pracy pt. *Lateral organization of biomimetic cell membranes in varying pH conditions* opublikowanej w *Journal of Molecular Liquids*. Głównym uzyskanym wynikiem jest wykazanie wzrostu wielkości domen fazy uporządkowanej błony lipidowej osadzonej na podłożu stałym w miarę wzrostu pH otoczenia. Autorka interpretuje go jako efekt wzrostu napięcia liniowego na granicy faz, u podłoża którego leży rosnąca wraz ze wzrostem zasadowości różnica grubości uporządkowanych i zdeorganizowanych domen lipidowych. Jest to wynik niewątpliwie oryginalny i ciekawy. Nabiera on dodatkowej jeszcze wartości w świetle obserwacji, iż raz utworzone domeny pozostają stabilne po neutralizacji pH. Sugeruje to, obiecującą z technicznego punktu widzenia, możliwość kontrolowanego tworzenia specyficznej mikrostruktury błony na potrzeby innych badań. Z czysto naukowego punktu widzenia, pewien niedosyt budzi brak próby zaproponowania mechanizmu molekularnego łączącego zmiany stężenia jonów H^+ z modyfikacją konfiguracji lipidów tworzących fazę zdeorganizowaną, jednakże jego ustalenie wymagałoby prawdopodobnie przeprowadzenia symulacji komputerowych, pozostając poza, i tak szeroką, domeną zainteresowań Autorki. Ciekaw jestem natomiast zdania Doktorantki co do możliwych przyczyn praktycznej nieodwracalności zdeterminowanej przez wyjściowe pH formy separacji faz po późniejszej neutralizacji środowiska. Zastanawiam się także dlaczego separacji faz zależnej od pH nie można było zaobserwować wprost na liposomach skonstruowanych z odpowiedniej mieszaniny lipidów.

Drugi z przedstawionych artykułów, pt. *Nanoscale structural response of biomimetic cell membranes to controlled dehydration*, opublikowany w czasopiśmie *Nanoscale*, zaprezentowany jest w rozdziale szóstym. Ponownie dotyczy on analizy szczegółów separacji faz błony lipidowej, jednak tym razem w zależności od stopnia uwodnienia układu. Głównym wynikiem jest obserwacja spadku wielkości napięcia liniowego granicy faz w wyniku dehydratacji. Jest on spowodowany relatywnym wzrostem grubości fazy zdezorganizowanej w stosunku do uporządkowanej, który prowadzi do zmniejszenia stopnia tzw. niedopasowania hydrofobowego odpowiedzialnego za koszt energetyczny mieszania lipidów. Dodatkową wartością pracy jest zastosowanie mikroskopii sił atomowych do ustalenia dokładnego profilu warstwy powierzchniowej błony na granicy faz oraz wykorzystanie modelu teoretycznego wiążącego stopień niedopasowania hydrofobowego z wielkością napięcia liniowego. W tym bardzo interesującym artykule nie znalazłem odpowiedzi na nurtujące mnie pytanie czy separacja faz zachodzi w obu warstwach membrany lipidowej, czy tylko w jednej, zewnętrznej. Na podstawie analizy profilu grubości błony (rys. 4) wydaje się, że faza zdezorganizowana przylega bezpośrednio do podłoża stałego (wysokość jej powierzchni nad podłożem odpowiada spodziewanej grubości), a zatem efekt niedopasowania hydrofobowego po tej stronie układu nie powinien być siłą napędową separacji faz. Zastanawia mnie także jeden z wniosków wysuniętych przez autorów, w którym sugerują oni, iż redukcja napięcia liniowego może być czynnikiem sprzyjającym fuzji błon lipidowych w obszarze granicy faz. Wydaje się, że konkluzja wynikająca z cytowanego przy tej okazji artykułu grupy Lukasa Tamma jest odwrotna: to raczej redukcja obwodu granicy faz przy wysokim napięciu liniowym jest wskazywana jako źródło dodatkowej energii swobodnej napędzającej proces fuzji.

Rozdział siódmy zawiera trzecią publikację, zatytułowaną *Tunable biomimetic bacterial membranes from binary and ternary lipid mixtures and their application in antimicrobial testing*, która została opublikowana w czasopiśmie *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Poświęcona jest ona systematycznej analizie właściwości biomimetycznych błon lipidowych skonstruowanych z podstawowych typów fosfolipidów wymieszanych w różnych proporcjach. Uzyskane wyniki wskazują, że nawet niewielkie różnice w zakresie ułamków molowych poszczególnych składników wpływają na powstanie bądź zanik separacji faz oraz prowadzą do jakościowo różnych morfologii uzyskiwanych liposomów. Skupiając się na błonach bakteryjnych, z rozróżnieniem na szczepy gram dodatnie i gram ujemne, autorzy określili zakresy stężeń lipidów pozwalających na uzyskanie ich możliwie wiarygodnych reprezentacji. Testy wiązania peptydu przeciwbakteryjnego do tak wytworzonych liposomów wykazały istotną korelację pomiędzy siłą oddziaływania a zawartością ujemnie naładowanych lipidów w błonie. Uzyskane wyniki są niewątpliwie użyteczne z praktycznego punktu widzenia. Dają one gotowy przepis na konstrukcję błon biomimetycznych przydatnych, na przykład, na potrzeby testowania peptydów przeciwbakteryjnych, stanowiących intensywnie rozwijaną obecnie grupę leków. W tym kontekście nasuwa mi się pytanie, czy bazując na zgromadzonych doświadczeniach Autorka sądzi, iż same różnice w składzie lipidów w błonach bakterii gram dodatnich i gram ujemnych mogą być podstawą do wytłumaczenia różnej aktywności leków przeciwbakteryjnych w stosunku do obu tych grup bakterii, czy przyczyn należy raczej upatrywać w fundamentalnie różnej budowie ich warstw zewnętrznych.

Ocena formalna

Rozprawa napisana jest w języku angielskim i liczy 173 strony. Obejmuje ona: streszczenia w języku angielskim i polskim, rozdział poświęcony wyjaśnieniu motywacji dla podjęcia badań i omówieniu struktury rozprawy, trzy rozdziały zawierające wprowadzenie do tematyki pracy, trzy rozdziały przedstawiające publikacje stanowiące podstawę doktoratu, podsumowanie najważniejszych wyników, zestawienie osiągnięć naukowych Doktorantki, spis literatury, oświadczenia współautorów co do ich udziału w opracowaniu artykułów oraz podziękowania.

Cele pracy są jasno określone w rozdziale wstępnym, wraz ze wskazaniem która publikacja opisuje ich realizację. Każdy z prezentowanych w dalszej części rozprawy artykułów poprzedzony jest krótkim wstępem naświetlającym kontekst przedstawionych w nim badań oraz zawierającym podsumowanie najważniejszych wyników. W każdej z prac Doktorantka jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym. Opisy wkładów poszczególnych współautorów oraz ich dołączone oświadczenia nie pozostawiają wątpliwości co do Jej wiodącej roli w prowadzonych badaniach i w opracowaniu manuskryptów.

Rozprawa jest przygotowana bardzo starannie od strony językowej i edytorskiej. Tekst napisany jest z dbałością o poprawność stylistyczną i spójność logiczną, dzięki czemu jest łatwy w odbiorze i czyta się go płynnie. Na uznanie zasługuje konsekwentne rozpoczynanie kolejnych podsekcji od ciekawych cytatów, co dodatkowo sprawia, że lektura rozprawy jest przyjemna. Opublikowane prace są dobrze wkomponowane w strukturę całości. W pozostałym zakresie widoczna jest dbałość o typografię i czytelne oznaczenia elementów dodatkowych. Na bardzo wysokim poziomie jest też strona graficzna pracy: zamieszczone w niej ilustracje są estetyczne, przejrzyste i jednolite stylistycznie. W kilku miejscach jednak, nad realizmem przekazu wzięła widocznie górę chęć do symbolicznego przedstawienia treści, co nie jest moim zdaniem optymalne dla opracowań stricte naukowych: mam tu na myśli wspomniany już wcześniej rys. 1.1 D oraz rys. 4.7 B, na którym zapis krzywej intensywności sygnału miejscami cofa się w czasie.

Widoczna staranność Autorki w zakresie przygotowania rozprawy sprawiła, że w tekście znalazło się wyjątkowo mało błędów edytorskich. Z obowiązku recenzenta, poniżej wymieniam kilka, które udało mi się znaleźć: na stronach 25 i 43 oznaczenia mikrometra napisany są jako um, zamiast μm , na stronie 46 funkcja sinus zapisana jest kursywą, na stronie 56 oznaczenie kT podane jest bez definicji i bez indeksu B, oznaczającego zwyczajowo stałą Boltzmanna, na stronie 58 oznaczenie mikrometra jest napisane kursywą.

Podsumowanie

Rozprawę doktorską autorstwa pani mgr inż. Emilii Krok oceniam bardzo pozytywnie. Doktorantka podjęła temat separacji faz błon lipidowych, który jest ważny zarówno z punktu widzenia nauk fizycznych jak i biologicznych. Wykorzystując szeroką gamę technik eksperymentalnych Autorka rozprawy z powodzeniem zrealizowała postawione sobie cele badawcze. Obejmowały one: analizę tworzenia się domen lipidowych w zależności od pH środowiska i stopnia uwodnienia błon oraz konstrukcję błon biomimetycznych w oparciu o podstawowe typy lipidów. Przeprowadzone prace pozwoliły z powodzeniem scharakteryzować mechanizm molekularny odpowiedzialny za zmienność domen lipidowych w odpowiedzi na warunki zewnętrzne. Okazała się nim być modulacja różnicy grubości fazy zdeorganizowanej w stosunku do fazy uporządkowanej, która przekłada się na zmiany napięcia liniowego granicy faz prowadząc do mniej lub bardziej wydajnej separacji lipidów. W mojej opinii są to znaczące wyniki, które z jednej strony przyczyniają się do lepszego zrozumienia sił napędowych tworzenia się domen w błonach biologicznych, a z drugiej, otwierają perspektywy dla opracowania układów badawczych opartych o membrany lipidowe o kontrolowanej mikrostrukturze. Z kolei prace nad utworzeniem prostego lecz realistycznego modelu błony bakteryjnej dostarczają potencjalnie bardzo użytecznego narzędzia w dziedzinie badań stosowanych nad lekami przeciwbakteryjnymi.

Wartość naukowa rozprawy opiera się na trzech oryginalnych pracach opublikowanych w prestiżowych czasopismach o zasięgu globalnym. Doktorantka jest pierwszą i korespondencyjną autorką wszystkich z nich. Całokształt zaprezentowanego materiału nie pozostawia wątpliwości co do Jej wiodącego wkładu w przeprowadzone badania. Z kolei lektura autorskiej części rozprawy wskazuje na wysoki poziom merytoryczny Autorki, staranność oraz biegłe opanowanie warsztatu badawczego i edytorskiego.

Podsumowując, jestem przekonany iż przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki

stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018 r. i bez najmniejszych wątpliwości wnoszę o dopuszczenie pani mgr inż. Emilii Krok do dalszych etapów przewodu doktorskiego.