



Wrocław, 06.11.2024

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
PANI MGR INŻ. HANNY ORLIKOWSKIEJ-RZEŹNIK

„On Discovering New Facets of Cholesterol in Model Cell Membranes:
the Molecular Interplay with Biological Water”
zrealizowanej na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej
Politechniki Poznańskiej
pod opieką naukową dr. hab. inż. Łukasza Piątkowskiego, prof. PP.

Przedmiotem niniejszej recenzji jest praca doktorska Pani mgr inż. Hanny Orlikowskiej-Rzeźnik pt. ”O odkrywaniu nowych aspektów cholesterolu w modelowych błonach komórkowych: Wzajemne oddziaływanie molekularne z wodą biologiczną”.

Cholesterol pełni kluczową rolę w funkcjonowaniu organizmu, wpływając na strukturę i stabilność błon komórkowych oraz wspomagając procesy sygnalizacji i transportu w komórkach. Jego obecność w błonach komórkowych zapewnia optymalną przepuszczalność i płynność, a jego złożona rola ma znaczenie zarówno w ochronie zdrowia (HDL), jak i ryzyku chorób sercowo-naczyniowych (LDL). Choć cholesterol często kojarzony jest negatywnie, jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu stąd badanie jego wpływu ma duże znaczenie. Błony komórkowe są złożonymi strukturami, których właściwości zależą od interakcji lipidów, cholesterolu i otaczającej wody, co jest kluczowe dla aktywności biochemicznej komórek. Badania wykazały, że cholesterol wpływa na rozmieszczenie lipidów i stabilność wody na powierzchni błony, co kształtuje jej fizyczno-chemiczną heterogeniczność.

Omawiane zagadnienia są ściśle związane z obszarem zainteresowań naukowych promotora pracy, dr. hab. inż. Łukasza Piątkowskiego, uznanego specjalisty w zakresie biofizyki. Opisane w pracy doktorskiej wyniki badań zostały zrealizowane w ramach projektu badawczego kierowanego przez Promotora niniejszej pracy.

Tematyka badań objęta doktoratem jest ważna i aktualna, zwłaszcza w kontekście lepszego zrozumienia zarówno znaczenia cholesterolu w procesach komórkowych jak i lepszego poznania błon komórkowych.

Przygotowana przez mgr inż. Orlikowską-Rzeźnik rozprawa doktorska napisana jest w języku angielskim i składa się z jednostronicowego ogólnego streszczenia, następnie rozdziałów opisujących kolejno błony komórkowe,

cholesterol i jego wpływ na płynność błony komórkowej, pojęcie wody biologicznej a wreszcie z opisu metod badawczych wykorzystywanych przez Doktorantkę, do których zaliczone zostały spektroskopia i obrazowanie. W tym rozdziale Doktorantka opisuje kolejno diagram Jabłońskiego, podstawy spektroskopii i mikroskopii fluorescencyjnej a także sondy fluorescencyjne. Najbardziej wartościowy dla mnie rozdział 5.3. dotyczy spektroskopii generacji częstotliwości sumarycznej, gdzie krok po kroku Doktorantka wyjaśniła podstawy tej techniki oraz możliwości jej zastosowania.

Podstawę merytoryczną pracy stanowi cykl trzech publikacji – opublikowanych w bardzo prestiżowych czasopismach takich jak J. Phys. Chem. B., JACS, J. Phys. Chem. Letters, które pojawiają się jako kolejne rozdziały pracy.

W rozdziale 6 Doktorantka opisuje Laurdan - sondę, która rozróżnia nawodnienie błony lipidowej i zawartość cholesterolu. W pracy umieszczonej w tym rozdziale i opublikowanej w J. Phys. Chem. B. pokazała, że odwodnienie powoduje różne skutki w każdym systemie. W membranie rozdzielonej fazowo zmiany płynności były bardziej umiarkowane, co sugeruje dodatkowy mechanizm nieobecny w systemie jednofazowym. Wykazała, że redystrybucja cholesterolu między fazami prawdopodobnie wyjaśnia tę różnicę.

W rozdziale 7, który stanowi publikacja z J. Phys. Chem. Lett. Doktorantka udowodniła, z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej, że odwodnienie błony lipidowej powoduje redystrybucję cholesterolu pomiędzy domenami bocznymi. Określiła ilościowo ten proces i odkryła, że powinowactwo cholesterolu do określonych faz lipidowych (Lo vs. Ld) odwraca się, gdy hydratacja błony zmniejsza się z około 12 do 6 cząsteczek wody na lipid. Symulacje atomistycznej dynamiki molekularnej, które ujawniły zmiany w strukturze dwuwarstwy lipidowej i sieci wiązań wodorowych między lipidami, dostarczyły wglądu w molekularne podstawy tej redystrybucji cholesterolu.

Wreszcie, w rozdziale 8, zatytułowanym „Cholesterol changes interfacial water alignment in model cell membranes”, którego podstawę stanowi artykuł opublikowany w JACS, Doktorantka przedstawiła szczegółowe badania wpływu cholesterolu na strukturę błony (monowarstwę lipidową) i jego interakcje z wodą biologiczną w różnych typach lipidów. Aby to osiągnąć, zastosowała szerokopasmową spektroskopię generowania sumy częstotliwości drgań wykrywanych heterodyną (HD-VSFG) w celu zbadania sygnatur drgań lipidów, cholesterolu i pobliskich cząsteczek wody. HD-VSFG jest techniką wysoce specyficzną dla powierzchni i dostarcza unikalnych informacji o bezwzględnej orientacji cząsteczek. Odkryła, że w błonach złożonych z nienasyconych fosfatydylocholin, cholesterol zakłóca powłokę hydratacyjną wokół grup lipidowych, co prowadzi do depolaryzacji orientacji cząsteczek wody. Natomiast w błonach z łańcuchami nasyconych kwasów tłuszczowych cholesterol wchodzi w interakcje specyficznie z lipidami, co powoduje zwiększone upakowanie lipidów i lepsze uporządkowanie grup lipidowych — zjawisko znane jako efekt kondensacji. Efekt ten zwiększa również orientację netto cząsteczek wody związanych z błoną, które nawadniają pozostałe grupy. W monowarstwach sfingomieliny efekt kondensacji wywołany cholesterolem jest najbardziej wyraźny, przy czym

orientacja cząsteczek wody międzyfazowej nawadniających grupy czołowe jest najbardziej anizotropowa.

Rozdział 9 stanowi podsumowanie przedstawionych wcześniej prac, w tym podkreślenie istotności prowadzonych badań jak również ich pionierskie wyjaśnienie. Konkludując, biologiczne błony komórkowe charakteryzują się dynamiczną i strukturalną heterogenicznością wynikającą z interakcji lipidów, cholesterolu i warstwy hydratacyjnej wody, co jest kluczowe dla aktywności biochemicznej komórek. Autorka zbadała wpływ odwodnienia i zawartości cholesterolu na spektralne właściwości Laurdan, wskazując, że odwodnienie powoduje uporządkowanie lipidów i spowolnienie dynamiki wody, natomiast cholesterol oddziałuje głównie na dynamikę glicerolowego szkieletu lipidów. Odkryła również, że cholesterol przemieszcza się między domenami błony lipidowej w odpowiedzi na zmniejszenie hydratacji, co stabilizuje błonę, redukując jej wrażliwość na zmiany płynności. Używając zaawansowanej spektroskopii, pokazała, że cholesterol modyfikuje strukturę wody międzyfazowej, co wpływa na potencjał dipolowy błony i procesy związane z fuzją błon. Wyniki te dostarczają nowego wglądu w rolę cholesterolu w regulacji właściwości błon i procesów komórkowych, takich jak neuroprzekaznictwo, transport wewnątrzkomórkowy czy też wnikanie wirusów.

Pracę wieńczą rozdział 10 i spis imponującego dorobku Doktorantki oraz bibliografia składająca się ze 184 pozycji literaturowych. Na końcu Doktorantka umieściła oświadczenia współautorów, którzy jednoznacznie wskazują na wkład doktorantki w wykonane doświadczenia oraz zgadzają się by przedstawione wyniki stanowiły podstawę prezentowanego doktoratu.

Z recenzenckiego obowiązku, ale też z ciekawości i nie znajdując błędów językowych (co jest niezwykle rzadkie przy pracy o tak dużej objętości) chciałabym zadać Doktorantce kilka pytań:

- 1) Jakie moce laserów są najodpowiedniejsze dla efektywnego pomiaru metodą SFG?
- 2) Jakiej długości pulsów są najkorzystniejsze dla SFG i dlaczego?
- 3) Jakie są różnice chemiczne między sondami fazowo-specyficznymi a fazowo-wrażliwymi w badaniach błon biologicznych?
- 4) Czy w rozważaniach oddziaływań z rozpuszczalnikiem brana jest pod uwagę wielkość wnęki Onsagera?

Doktorantka jest współautorką aż 16 prac naukowych, z czego w 5 pracach jest wiodącym (pierwszym i/lub korespondującym) autorem co świadczy o nadzwyczajnej aktywności naukowej p.Orlikowskiej-Rzeźnik. Potwierdza to także jej udział w licznych konferencjach naukowych (również z publikacjami w bardzo dobrych materiałach pokonferencyjnych, będących cytowanymi pracami, takimi jak Faraday Transactions czy FEBS) a także szerokich wachlarz uzyskanych nagród – jak choćby ta, niezwykle prestiżowa a uzyskana tak niedawno – L’Oreal UNESCO dla wybitnych młodych badaczek czy też FNP Start. Istotnym wkładem w rozwój nauki jest także uzyskanie dwóch zgłoszeń patentowych. Doskonałość

naukowa doktorantki została dostrzeżona także przez grantodawców – zarówno Ministerstwo Nauki, które przyznało mgr inż. Orlikowskiej-Rzeźnik Diamentowy Grant jak i Narodowe Centrum Nauki, które finansuje jej grant Preludium.

Przygotowana rozprawa oraz podejmowane w niej problemy badawcze nie tylko obejmują najnowsze trendy i osiągnięcia nauki, lecz również świadczą o znajomości współczesnej literatury z wybranej dyscypliny naukowej. Jakość przygotowanej rozprawy, zarówno pod kątem części eksperymentalnej jak również analizy literatury, zasługują na pozytywną ocenę. Praca przygotowana jest niezwykle starannie, trudno w niej znaleźć błędy a jej piękna oprawa graficzna nadaje jej dodatkowego waloru estetycznego – nie spotkałam się jeszcze z tak dopracowanymi i ładnymi grafikami. Serdecznie gratuluję doktorantce rozlicznych talentów.

Nadanie stopnia doktora oznacza, że badacz jest przygotowany do samodzielnego rozwiązania problemu naukowego. Mgr inż. Hanna Orlikowska-Rzeźnik pokazała, że spełnia ten warunek, gdyż opanowała umiejętność korzystania z literatury, doboru materiałów i metod badawczych, poprawnego zaprojektowania i przeprowadzenia eksperymentu, logicznego sformułowania wniosków końcowych oraz przygotowania bardzo ważnych publikacji. Warto podkreślić, że dziś w obszarze badań doświadczalnych wymagających stosowania zaawansowanych technik badawczych, „samodzielnie” nie oznacza osobiście, gdyż umiejętność współpracy w zespole jest również przejawem dojrzałości naukowej co Doktorantka udowodniła pracując w kilku zespołach badawczych, w tym zagranicą, w Amsterdamie.

Konkludując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Hanny Orlikowskiej-Rzeźnik zatytułowana „On Discovering New Facets of Cholesterol in Model Cell Membranes: the Molecular Interplay with Biological Water” spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w dziedzinie sztuki (Dz.U. z 2017r. poz. 1789 w związku z art. 179 ust.1 i ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz 1669 z późn.zm.). W związku z powyższym wnioskuję o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie jej do publicznej obrony. Dodatkowo, mając na uwadze ponadprzeciętne osiągnięcia naukowe Doktorantki wnoszę o wyróżnienie jej rozprawy.

Prof. Katarzyna Matczyszyn,