



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKA AKADEMIA NAUK

prof. dr hab. Małgorzata Lekka,
Instytut Fizyki Jądrowej PAN
Radzikowskiego 15,
31-342 Kraków, PL.

Kraków, 12.05.2017

Opinia o pracy doktorskiej

Autor: Katarzyna Gajos

Tytuł rozprawy doktorskiej:

Structure and properties of macromolecular surfaces and patterns for biotechnological applications

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr. Katarzyny Gajos została wykonana pod kierunkiem **prof. dr hab. Andrzeja Budkowskiego** oraz **dr hab. Jakuba Rysza** na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie).

Praca dotyczyła zastosowania szeregu metod do oceny struktury i właściwości powierzchni oraz wzorów makromolekularnych, których charakterystyka będzie prowadzić do zoptymalizowania procesu ich wytwarzania do zastosowań biotechnologicznych.

W ostatniej dekadzie, nowe technologie umożliwiły prowadzenie badań na poziomie pojedynczych komórek czy nawet cząsteczek. Dzięki uzyskanym wynikom, coraz częściej tworzone są różnorodne systemy detekcji związków, które działają w oparciu o zjawiska elektryczne, optyczne, mechaniczne, chemiczne czy biologiczne. Przykładem są miniaturowe układy typu „lab-on-a-chip”, które pozwalają na wykonanie wielu oznaczeń laboratoryjnych na powierzchni o wielkości kilku centymetrów kwadratowych. Stosowane są płytki krzemowe, szklane lub polimerowe zawierające miniaturowe kanały, studzienki, komory i przestrzenie reakcyjne. W projektowaniu układów „lab-on-a-chip”, kluczowym elementem jest poznanie struktury i właściwości powierzchni, która posłuży do identyfikacji wybranej substancji chemicznej czy biologicznej. W szczególności, wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych do modyfikacji powierzchni wymaga zachowania ich biologicznej aktywności poprzez zapewnienie im odpowiedniej konformacji umożliwiających selektywne oddziaływanie w wykrywaną substancję. Ze względu na złożone działanie takich mikroukładów, projektowanie powierzchni wymaga wykorzystania wiedzy z różnych często tematycznie odległych dziedzin takich jak fizyka czy biologia. Badania prowadzone przez Panią mgr Katarzynę Gajos wpisują się w główny nurt badawczy nad ultra-czułymi sensorami wrażliwymi na substancje chemiczne i biologiczne. W swojej pracy, Pani mgr Katarzyna Gajos skupiła się nad dwoma klasami powierzchni tj. powierzchniami szczepionymi łańcuchami polimerowymi oraz powierzchniami pokrytymi warstwami cząsteczek umożliwiającymi rozpoznawanie molekularne. Tytuł pracy „*Structure and properties of*



macromolecular surfaces and patterns for biotechnological applications” w pełni odzwierciedla jej zawartość, równocześnie wskazując, że poruszona tematyka badawcza jest umiejscowiona w domenę nauk interdyscyplinarnych o dużym znaczeniu praktycznym.

Warto podkreślić, że zadania badawcze pracy doktorskiej były realizowane w oparciu o współpracę międzynarodową, co wskazuje na bardzo dobre przygotowanie doktorantki do pracy w zespole o różnorodnych kwalifikacjach.

Rozprawa doktorska jest napisana w języku angielskim na poziomie umożliwiającym czytelnikowi zrozumienie tematyki i znaczenia prowadzonych badań. Główna część pracy została ona podzielona na cztery części. W pierwszej części *”Introduction”* opisany został stan wiedzy dotyczący sposobów modyfikacji powierzchni. Druga część *”Surface characterization techniques”* zawiera zwięzły opis metod zastosowanych do oceny struktury i własności powierzchni tj. mikroskopię sił atomowych (AFM), mikroskopię fluorescencyjną, spektroskopię elipsometryczną, spektroskopię fotoelektronów w zakresie podczerwieni (XPS), oraz spektrometrię mas jonów wtórnych z detektorem czasu przelotu (ToF SIMS). W trzeciej części *”Results”* opisane są uzyskane wyniki z odnośnikami do artykułów naukowych stanowiących materiał pracy doktorskiej. Główna część pracy jest poprzedzona streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz listą artykułów naukowych wraz z dokładnym opisem udziału Pani mgr Katarzyny Gajos w realizacji zadań badawczych niniejszych artykułów (stosowne oświadczenia współautorów prac są zamieszczone w osobnym tomie dokumentacji). Całość pracy jest podsumowana w osobnym, czwartym rozdziale *”Conclusions”*. Zakończenie pracy obejmuje spis bibliograficzny świadczący o zaangażowaniu Doktoranta w tematykę pracy doktorskiej oraz spis używanych skrótów. Dołączone zostały kopie artykułów naukowych stanowiących podstawę pracy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Gajos. Artykuły, zawierające uzyskane wyniki zostały opublikowane w pięciu uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym takich jak *Langmuir* czy *Colloids and Surfaces B* (IF w zakresie od 2.9 do 4.3). W czterech artykułach, Pani mgr Katarzyna Gajos jest pierwszym autorem, co świadczy o Jej wiodącej roli w prowadzonych badaniach. Załączony spis bibliograficzny wraz ze spisami z publikacjach świadczy o rozległych studiach tematu i zaangażowaniu Doktoranta w tematykę pracy doktorskiej.

Opis części technik stosowanych do analizy powierzchni jest klarowny i obejmuje podstawy zastosowanych technik takich jak mikroskopia sił atomowych, spektrometria mas jonów wtórnych czy spektroskopia elipsometryczna. Zastosowanie tych technik w ocenie jakości powierzchni nie jest trywialne i wymagało od Doktorantki rzetelnego opanowania nie tylko stanu wiedzy ale także sposobów przygotowania próbek w taki sposób aby ich struktura i aktywność biologiczna nie została zniszczona.

Podczas czytania pracy nasunęły się następujące uwagi i pytania:

- W części opisującej techniki badawcze stosowane do oceny własności powierzchni brakuje mi opisu techniki pomiaru kąta zwilżania. Tym bardziej, że jednym z głównych



wyników zawartych w **artykule nr 1** jest zmiana termoczulości obserwowanej m.in. poprzez zmianę zwilżalności warstwy oligonadtlenku-POEGMA246 w zależności od wartości pH.

- Warstwy utworzone na bazie oligonadtlenku-POEGMA246 są w zamierzeniu warstwami umożliwiającymi kontrolowane osadzanie białek (co zostało pokazane na przykładzie lektyny z soczewicy). W **artykule nr 1**, rysunek 7 prezentuje pół-ilościowy opis ilości osadzonej lektyny w zależności od wartości pH dla 32°C. Na ile zmienia się charakter zależności intensywności fluorescencji od wartości pH dla tej samej lektyny w temperaturze 20°C.
- Wykorzystanie techniki ToF SIMS do oceny struktury chemicznej układów białkowych nie jest proste z uwagi na brak informacji w jaki sposób wiązka jonów fragmentuje warstwę utworzoną z białka. Widmo masowe uzyskane za pomocą ToF SIMS pokazuje masy fragmentów badanej lektyny LcH, z których wynika, że z powierzchni białka wybijane są pojedyncze aminokwasy. Czy obserwowane są także fragmenty samych aminokwasów?
- Nie do końca jest dla mnie jasne, dlaczego wytwarzanie wzorów powierzchniowych za pomocą litografii elektronowej (**artykuł nr 2**) może zostać wykorzystane do zastosowań biotechnologicznych. Albumina jest wykorzystywana głównie jako białko blokujące selektywne oddziaływania pomiędzy innymi białkami takimi jak streptawidyna. Ponadto albumina oddziałuje niespecyficznie praktycznie z każdą powierzchnią (jest wykorzystywana do tzw. pasywacji powierzchni). Osadzanie tych dwóch białek na wytworzonych wzorach pokazuje bardzo słaby sygnał fluorescencyjny wskazujący na słabe oddziaływanie tego białka z ETFE-g-PDMAEMA i ETFE-g-QPDMAEMA. A drugie pytanie, które mi się nasunęło – czy tak wytworzone wzory są pH zależne?
- Stosowane techniki oceny powierzchni są technikami stosowanymi w fizyce powierzchni. Ich zastosowanie do oceny jakości utworzonych powierzchni stosowanych jako biosensory (**artykuły nr 3-5**) nie jest proste z uwagi na fakt, że białka mogą oddziaływać w sposób swoisty i nieswoisty (lub inaczej specyficzny i niespecyficzny). Detekcja ich obecności na zadanej powierzchni nie niesie bezpośredniej informacji o ich aktywności biologicznej. Czy Doktorantka mogłaby zabronować inne metody, alternatywne do wykorzystanych w pracy doktorskiej, które mogłyby być wykorzystane do oceny aktywności biologicznej cząsteczek w badanych warstwach?

Praca jest zredagowana w starannie, szczególnie w wersji angielskiej. Streszczenie napisane w języku polskim brzmi dość niefortunnie z uwagi na nieścisłe sformułowania. Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie podać kilka przykładów:

- W streszczeniu napisanym w języku polskim razi słowo „charakteryzacja”. Pierwsze zdanie streszczenia w języku polskim powinno chyba brzmieć „Celem niniejszej pracy jest rozwój metod służących do charakterystryki struktury i właściwości powierzchni



....". Według Słownika Języka Polskiego PWN słowo „charakteryzacja” to „nadawanie czyjejs twarzy i sylwetce zewnętrznych cech innej osoby; też: rezultat takich zabiegów; lub akcesoria służące do zmiany czyjegoś wyglądu zewnętrznego”. Wykorzystanie tego słowa sugeruje, że stosowane metody badawcze mające na celu scharakteryzowanie powierzchni wprowadzają jakieś zmiany w badanych powierzchniach.

- Zastanawia tryb pracy ToF SIMS obejmujący wielowymiarową analizę danych.
- Nie bardzo wiadomo czym są „nanowarstwy biologicznego rozpoznawania międzymolekularnego”. Projektowanie biosensorów wykorzystuje nanowarstwy białek czy innych substancji, z których tylko jedna warstwa oddziałuje selektywnie z wykrywaną substancją (rozpoznawanie molekularne dotyczy jednej pary selektywnie oddziałujących ze sobą cząsteczek).

Zauważone nieścisłości nie pomniejszają wysokiej wartości merytorycznej. Rozprawę cechuje bardzo wysoki poziom merytoryczny. W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Katarzyny Gajos stanowi nowatorskie podejście do badań nad strukturą i własnościami powierzchni wykorzystywanymi do wykrywania różnorodnych substancji (w tym białek) w oparciu o zjawisko selektywnego oddziaływania molekularnego (rozpoznawania molekularnego pomiędzy biomolekułami). Uzyskane wyniki są cenne nie tylko do zrozumienia zjawisk powierzchniowych wpływających na aktywność biologiczną substancji zastosowanych do identyfikacji poszukiwanych substancji czy cząsteczek, ale także pomagają spojrzeć z innej perspektywy na badania związane z projektowaniem leków. Niezmierna aktualność i duże znaczenie praktyczne uzyskanych wyników podnosi wartość pracy. Dorobek naukowy Pani Katarzyny Gajos obejmuje 5 prac stanowiących podstawę pracy doktorskiej oraz pięć prac, których wyniki nie zostały zawarte w pracy a które stanowią poszerzenie tematyki badawczej.

Za najważniejsze osiągnięcia pracy uznać należy niezwykle nowatorskie podejście do oceny struktury i własności wytworzonych powierzchni, także wzorów powierzchniowych. Zastosowane techniki pomiarowe (AFM, ToF SIMS, XPS) nie są standardowymi technikami, dlatego też uzyskanie cennych wyników wymaga dużej dojrzałości badawczej oraz krytycznego spojrzenia na uzyskiwane wyniki. Przedstawione wyniki są oryginalne, posiadają cechy nowości naukowej, i co najważniejsze otwierają dalsze możliwości badawcze. Biorąc to pod uwagę wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Gajos.

W mojej ocenie, stwierdzam, że praca spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim przez ustawę o stopniach i tytule naukowym oraz przez normy akademickie i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Gajos do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Lebie