

Prof. dr hab. Paweł Krysiński

Pracownia Elektrochemii
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
02-093 Warszawa, Pasteura 1



Tel: (+4822) 8220211, wewn. 389
E-mail: pakrys@chem.uw.edu.pl
Fax: (+4822) 8225996

Warszawa, 09.09.2013

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Juhaniewicz, zatytułowanej: „*Peptides as functional nanostructures in molecular layers*”, w języku polskim: *Peptydy jako funkcjonalne nanostruktury w warstwach molekularnych*”.

Praca została przedstawiona jako rozprawa doktorska Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Przygotowana została w ramach International Scholarship Program for Graduate Studies in the Faculty of Chemistry, University of Warsaw, “*From simple molecules to nanostructured and bioactive materials*”, sponsorowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej.

Tematyka pracy dotyczy bardzo istotnych związków zachodzących między właściwościami i funkcjami peptydów a ich budową i oddziaływaniami z błonami biologicznymi. Już we wstępie pisze Autorka, że interesują ją jedynie dwa rodzaje „funkcjonalności” peptydów: pierwszy – to zależny od sekwencji i rodzaju aminokwasów oraz ich struktury drugorzędowej daleko-zasięgowy transport elektronów mediowany przez peptydy, oraz drugi – antybiotyczny wpływ naturalnych kationowych peptydów z grupy AMP (antimicrobial peptides) na modelowe błony komórkowe. Każdy z zakreślonych celów oddzielnie już mógłby stać się treścią dwu osobnych rozpraw doktorskich, jednakże umieszczenie ich razem w rozprawie spowodowało, że oczekiwałem eksperymentalnego powiązania celu pierwszego z drugim i w efekcie bardzo interesujących wyników. Wyniki rzeczywiście są bardzo interesujące, jednakże badania transportu elektronów przez dipeptydy czy oligoprolinę (maksymalnie 4 proliny), choć bardzo istotne z punktu widzenia np. elektroniki molekularnej, czy transportu energii w biomembranach, nie zostały powiązane (bo nie mogły

być) z mechanizmem lizy błon biologicznych przez melitynę. Jedyną wspólną cechą to obecność tryptofanu i proliny w łańcuchu 26 aminokwasów melityny. Jednakże mgr Juhaniewicz prezentując oba te cele w pracy pokazała swoje bardzo dobre opanowanie mikroskopii STS i AFM oraz technik Langmuira, Langmuira-Blodgett i Langmuira-Schaeffera dla potrzeb tworzenia i badania struktur molekularnych (w tym złącz molekularnych), technik elektrochemicznych oraz zdolności syntetyczne w samodzielnej syntezie peptydów wykorzystanych w pracy doktorskiej.

Ocena formalnej strony rozprawy.

Praca napisana jest w języku angielskim, zgodnie z zaleceniami FNP dla tego typu studiów doktoranckich, na ile mogłem ocenić jako non-native speaker – bardzo dobrze, na 147 stronach (bez literatury, 268 pozycji). Ilość pozycji literaturowych pozwala sądzić, że p. mgr Juhaniewicz w sposób istotny pogłębiła swoją wiedzę. Część eksperymentalna, prezentująca wyniki Autorki, obejmuje zdecydowaną większość tekstu, zaś część teoretyczna podaje niezbędną wiedzę dla zrozumienia istoty prowadzonej pracy badawczej oraz przedstawionego wnioskowania, dając recenzentowi szansę ustosunkowania się do niego. Całość rozprawy przedstawiona jest w sposób logiczny i przejrzysty, spełniając wymogi pracy doktorskiej..

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej.

Ocenę merytoryczną pracy doktorskiej mgr Joanny Juhaniewicz pozwolę sobie poprowadzić osobno dla części dotyczącej złącz molekularnych (par. 9 i 10 oraz podrzędne) i osobno dla pozostałej części dotyczącej działania melityny na warstwy biomimetyczne. Oprócz pozytywnej mojej ogólnej oceny formalnej strony pracy, zauważyłem pewne braki w konsekwencji przedstawianego materiału badawczego (np. pominięcie niektórych rezultatów badań), które jako recenzent poniżej przedstawię, gdyż obrona rozprawy doktorskiej zakłada dyskusję, obronę założeń, też, sposobu przedstawienia wyników, no i doktorantka powinna mieć się przed czym bronić. Wobec tego, chciałbym prosić Panią mgr Joannę Juhaniewicz o ustosunkowanie się do poniższych uwag:

Część dotycząca złącz molekularnych.

1. Dlaczego przy analizie charakterystyk monowarstw peptydowych z pomiarów EIS i QCM, zestawione zostały osobno dipeptydy (Table 6) i PRO 1- 4 (Table 8), a nie zostały zebrane całościowo wyniki w celu porównania TYR, TRP, PRO 1 i ALA (z

własnej publikacji)? Przecież wzmocniłoby to wnioskowanie o „upakowaniu” monowarstwy. To samo rozumowanie zastosowała Pani przy omawianiu szeregu PRO 1 – PRO 2.

2. Wartości prądu tunelowania dla PRO 1 – PRO 2 zostały tylko przedstawione dla potencjału +0,5 V, nie przedstawiono wyników dla ujemnego zaburzenia. Na rys. 28 pokazana jest taka krzywa dla TRP i TYR. Czy dla PRO 1 jest ona symetryczna? Chyba nic nie przeszkadzało przedstawić tabelkę podobną do Table 7? Skoro tabela ta porównuje TRP, TYR, ALA, to czemu nie włączyła Pani wyników dla PRO 1?
3. Co z symetrią krzywej prąd/potencjał dla szeregu PRO 1 - 4?
4. Jak wygląda oszacowanie błędu dla krzywych z Fig. 28
5. Poproszę o wyraźne stwierdzenie, czemu przypisać brak symetrii krzywej dla TRP: jaki element złącza jest za to odpowiedzialny. O ile zrozumiałem wywód na str. 83, nie jest to ani moment dipolowy ani szczególna struktura drugorzędowa.
6. Potraktowała Pani technikę spektroskopii impedancyjnej bardzo wybiórczo, podając tylko wynikową wartość pojemności warstw. Dlaczego wobec tego pokrycie powierzchni, które jest największe dla PRO 1 (ok. 2x większe niż TRP), co odpowiada najbardziej „upakowanej” monowarstwie, nie idzie w parze z najniższą pojemnością właściwą?

Jestem pewien, że całość syntetycznie przedstawiona znacznie bardziej uwiarygodniłaby wnioskowanie. Uważam również, że wykazanie iż wydajność (efficiency) przeniesienia elektronów w peptydowym złączu molekularnym zależy od „sztywności złącza”, wniosek ważny i wynikający z tej części pracy, wymaga bliższego przedstawienia uzasadniającego modelu zawartego w pracy Shin et al. (poz. 89 w spisie cytowań). Proszę o zrobienie tego w trakcie obrony.

Oddziaływanie melityny z warstwami biomimetycznymi.

Ta część pracy jest znacznie bardziej obszerna niż poprzednia. Doktorantka w sposób rzeczowy i logiczny motywuje wybór lipidów, które wykorzystuje do tworzenia warstw biomimetycznych poddawanych działaniu melityny. Zdając sobie sprawę z ogromnej ilości możliwych wyborów cząsteczek lipidów tworzących matrycę lipidową błon biologicznych oraz możliwe sposoby oddziaływania melityny i tworzonych przez nią struktur z błonami

biologicznymi, redukuje swój wybór do lipidów o takich samych nasyconych łańcuchach acylowych lecz o różnych grupach polarnych: od obojnaczej DMPC do ujemnych DMPG i DMPS. Dodatkowo, właściwości powierzchniowe oraz organizacja warstw, ale tylko do warstw DMPC, modyfikowana była przez dodanie cholesterolu. Pytanie pierwsze:

1. Czym było to spowodowane, że warstwy DMPG i DMPS nie były badane w obecności cholesterolu?

Warstwy Langmuira. Pierwszą częścią tego typu eksperymentów było badanie wpływu melityny na warstwy Langmuira tworzone z wymienionych lipidów, w zależności od rodzaju grupy polarnej, temperatury, pH i mocy jonowej oraz ilości i sposobu dodania peptydu: do roztworu tworzącego monowarstwę Langmuira, czy do tzw. subfazy, na której uprzednio została utworzona monowarstwa lipidowa. Pani mgr Juhaniewicz w swojej pracy wykazała, że peptyd wbudowuje się w warstwy Langmuira utworzone z powyższych lipidów, powodując zwiększenie ciekłości warstwy oraz zanik przejścia fazowego (u odpowiednich lipidów). Oddziaływanie peptydu było niespecyficzne, jednak zależało znacząco od organizacji lipidowej warstwy Langmuira (ciśnienia powierzchniowego monowarstwy) i ładunku jej grupy polarnej oraz tego, czy warstwa tworzona była na czystej wodzie, czy na buforowanym roztworze 150 mM NaCl. Obserwowane w tym ostatnim przypadku istotne różnice zachowania DMPS wynikają z istnienia fazy ciekłej-skondensowanej, podczas gdy na wodzie warstwa DMPS tworzy fazę skondensowaną. Pytanie drugie:

2. Dlaczego jednak wpływ melityny bardziej uwidacznia się w przypadku fazy ciekłej-skondensowanej, niż w przypadku fazy skondensowanej lub ciekłej-rozprężonej (liquid-expanded)? Może ma to związek z zachowaniem samej melityny w obecności i nieobecności buforu (Fig. 37, str. 96). Dla jasności i konsekwencji we wnioskowaniu brakuje mi w tej części pracy tabel dla układu DMPS(melityna)/woda, jest tylko DMPS(melityna)/bufor, a w przypadku DMPG jest przeciwnie – zamieszczono tabelę dla układu DMPG(melityna)/woda, brak DMPG(melityna)/bufor. Wnioski płynące z tej części pracy, że wpływ melityny na monowarstwę na swobodnej powierzchni zależy od upakowania warstw i ładunku na powierzchni uważam za słuszny, choć przydałoby się sprawdzić jeszcze ten wniosek w zależności od pH, przy stałej mocy jonowej, co powinno lepiej pokazać wpływ

oddziaływania elektrostatycznego, które według Doktorantki jest przyczyną adsorpcji peptydu na powierzchni monowarstwy i blokowania penetracji.

Dwuwarstwy lipidowe. Ten sam układ lipidowy został następnie wykorzystany do wytworzenia biomimetycznych dwuwarstw lipidowych metodą Langmuira-Blodgett/Langmuira-Schaeffera na odpowiednio przygotowanej powierzchni elektrody złotej. Badania warstw przed i poddanych działaniu melityny w roztworze elektrolitu w funkcji czasu, w obecności pary redoks jako próbnika organizacji warstw, wykonała mgr Juhaniewicz metodami elektrochemicznymi – chronowoltamperometrii cyklicznej oraz spektroskopii impedancyjnej (EIS). Wyniki potwierdzają wnioskowanie wysnute na podstawie badań warstw Langmuira o największej odporności na działanie peptydu w przypadku warstw DMPC:CHOL oraz DMPS. Mam jednak dwie uwagi: jedna dotyczy wyników EIS, druga – woltamperometrii cyklicznej z Fig. 59.

3. Najpierw EIS: abstrahując od tego, że zawsze powinien być podany błąd dopasowania modelu do wyników, czy w postaci procentów, czy tzw. DOF lub innej, tabele od 14 do 18 zawierają parametry obwodów zastępczych modelujących elektrochemiczne procesy w dwuwarstwach, ale do interpretacji wpływu melityny wykorzystano tylko zmianę pojemności i zmianę oporu przeniesienia ładunku próbnika. Jak już napisałem wyżej, zmiany te bardzo ładnie korelują z wnioskami płynącymi z badań warstw Langmuira. Natomiast nie omówiono zmian zawady Wartburga, Z_w , która rośnie wraz z czasem oddziaływania peptydu z dwuwarstwą lipidową. W przypadku DMPC:CHOL prawie sześciokrotnie. Co ten wzrost może oznaczać?
4. Woltamperometria cykliczna: owszem, mogę zgodzić się, że sigmoidalny kształt krzywej cyklicznej może sugerować brak przejścia symetrii obszaru dyfuzyjnego ze sferycznej w liniową (Fig. 59), ale tylko sugerować. Wniosek ten należy sprawdzić zwiększając szybkość zmian potencjału. Według teorii AST kształt nie powinien zależeć od tej szybkości, natomiast można oszacować gęstość i rozmiar defektów tworzonych przez melitynę w dwuwarstwie.

Obrazowanie AFM dwuwarstw lipidowych przeniesionych na mikę wykonane przez Panią mgr Joannę Juhaniewicz w pełni potwierdza wnioski płynące z poprzednich technik badawczych odnośnie wpływu peptydu na membrany biomimetyczne zależnego od polarności części hydrofilowej lipidu i uprzedniej organizacji łańcuchów hydrofobowych.

Bardzo ciekawą była obserwacja powstawania lipidowej fazy P_{β}' (ripple phase) dla warstw lipidowych na substracie stałym, poprzedzone tworzeniem przez peptyd porów w dwuwarstwie DMPC, ale co jeszcze ciekawsze – również dla dwuwarstwy DMPS, bez uprzedniego tworzenia przez melitynę porów w warstwie. Myślę, że ta obserwacja dokonana przez Doktorantkę po raz pierwszy, otwiera szerokie pole do dalszych badań nad mechanizmem powstawania fazy P_{β}' w zależności od rodzaju warstw, sposobu osadzania i rodzaju podłoża, a także czynnika powodującego lokalne zaburzenie/przejście fazowe lipidów.

Muszę stwierdzić na zakończenie mojej recenzji, że bardzo wysoko oceniam sobie zakres przedstawionych prac badawczych oraz osiągnięte w nich wyniki. Rezultaty badań prowadzonych przez Panią mgr Joannę Juhaniewicz, dotyczące pierwszej części zostały opublikowane w 3 publikacjach naukowych, wszystkie listy filadelfijskiej o dużym współczynniku IF 2.676 – 4.416 (Langmuir, Bioelectrochemistry., J. Electroanal. Chem.). Doktorantka w 2 z nich jest pierwszą współautorką.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana praca całkowicie spełnia warunki określone w ustawie „O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U. nr 65, poz. 595, 2003 r., z późniejszymi zmianami, Dz.U., nr 164, poz. 1365, 2005r.) i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Joanny Juhaniewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Paweł Krysiński



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Dr hab. Szczepan Zapotoczny, prof. UJ
Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii
Email: zapotocz@chemia.uj.edu.pl
Tel. 12 6632254

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Joanny Juhaniewicz

pt.: "PEPTIDES AS FUNCTIONAL NANOSTRUCTURES IN MOLECULAR LAYERS"

Wydział Chemii

Rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Juhaniewicz obejmuje zagadnienia związane z otrzymywaniem i badaniem warstw molekularnych złożonych z wybranych peptydów. Zasadniczym celem pracy określonym przez doktorantkę było zastosowanie peptydów jako funkcjonalnych nanostruktur w modelowych układach biologicznych. W ramach tego, dość szeroko zakreślonego celu, doktorantka zdefiniowała bardziej szczegółowe cele badawcze. Pierwszy z nich obejmował określenie wpływu aminokwasów oraz drugorzędowej struktury wybranych peptydów na wydajność przeniesienia elektronu realizowanego poprzez łańcuchy peptydowe. Drugim celem było zbadanie wpływu melityny (peptyd, składnik jadu pszczelego) na modelowe membrany fosfolipidowe. Przedstawione cele badawcze zostały jasno określone, a metodologia podejścia do osiągnięcia tych celów została opisana przez doktorantkę z uwzględnieniem szeregu komplementarnych technik badawczych. Tematyka obejmująca niniejszą rozprawę doktorską sytuuje się w szerokim nurcie badawczym prowadzonym od lat w zespole Pani Profesor Renaty Bilewicz, a ostatnio szczególnie rozwijanym przez promotora niniejszej pracy, dr hab. Sławomira Sęka. Sądzę, że doświadczenie badawcze, które doktorantka miała okazję zdobyć w zespole oraz podczas stażu zagranicznego było bardzo istotnym elementem, niezbędnym do osiągnięcia zadanych celów pracy, w trudnej technicznie dziedzinie badań.

ul. Ingardena 3
PL 30-060 Kraków
tel. +48(12) 633 63 77
fax +48(12) 634 05 15
sekretar@chemia.uj.edu.pl
www.chemia.uj.edu.pl

Cała rozprawa została napisana w języku angielskim przy klasycznym i przejrzystym podziale na część literaturową i doświadczalną. W tym miejscu muszę stwierdzić, że język rozprawy zarówno pod względem merytorycznym, jak i gramatycznym oraz stylistycznym jest bardzo dobry, nie dając szans recenzentowi na wykazanie się znalezieniem choćby błędów literowych. Co więcej, użycie języka angielskiego w tej naukowej rozprawie pozbawiło mnie także szans na znalezienie, zwykle częstych w rozprawach pisanych w języku polskim, błędów terminologicznych czy też kalek językowych pojawiających się przy tłumaczeniu angielskich określeń na język polski. Jedynym powtarzającym się błędem, szczególnie na wykresach, było zastosowanie w zapisie liczb wymiernych przecinka zamiast kropki, która w języku angielskim używana jest do oddzielenia cyfry jedności od cyfry części dziesiętnych. Nie wpływa to jednak w najmniejszym stopniu na czytelność przekazywanych informacji. Jedyny „grubszy” błąd, który udało mi się wychwycić, to brak odniesienia w tekście do rys. 30 – brak ten jednak jest zaniedbywalny w kontekście wysokiej jakości edytorskiej całej rozprawy.

Część literaturowa rozprawy obejmuje opis zasadniczych struktur, procesów oraz metod badawczych wykorzystywanych w części eksperymentalnej. Opisane są zarówno samoorganizujące się monowarstwy na złocie, jak i warstwy molekularne otrzymywane technikami Langmuira-Blodgett i Langmuira-Szaefera. Opis procesu przeniesienia elektronu w złączu molekularnym pomiędzy elektrodami metalicznymi, czy też roli poszczególnych składników membran biologicznych przedstawione są w stopniu wystarczającym dla zrozumienia wyników uzyskanych w części eksperymentalnej rozprawy, nawet dla osoby nie będącej specjalistą w danej dziedzinie. Jest to, moim zdaniem, właściwe podejście do zakresu części literaturowej, a sposób przedstawienia tej złożonej tematyki świadczy o zgłębieniu przez doktorantkę przedstawianych treści. Doktorantka przedstawiła także istotność podejmowanej przez nią tematyki w zakresie badań podstawowych w kontekście rzeczywistych problemów obecnych w układach biologicznych. W części literaturowej rozprawy pewien niedosyt pozostawia jedynie zbyt skrótowe opisy niektórych technik, np. elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej, która była często używana w dalszej części pracy. Podsumowanie części literaturowej wypada jednak ogólnie bardzo pozytywnie, gdyż doktorantka unikając „kwiecistego” stylu zawarła w sposób zwarty i merytorycznie poprawny zarówno podstawy, jak i

obecny stan wiedzy w opisywanych zagadnieniach, wykorzystując cytowania ponad 220 publikacji naukowych.

Część eksperymentalna zawiera na początku, w formacie publikacyjnym, informacje na temat użytych odczynników, sprzętu oraz technik przygotowania warstw molekularnych. Kolejne dwa rozdziały opisują badania dotyczące przeniesienia elektronu (przewodzenia) w samoorganizujących się monowarstwach, utworzonych przez, zsyntetyzowane uprzednio przez doktorantkę, krótkie peptydy. Wyniki tych badań przedstawione są w sposób systematyczny z równoczesną wnikliwą dyskusją wytykającą z przedstawianych kolejno wyników eksperymentalnych. Na uwagę zasługuje kompleksowe podejście do charakteryzacji monowarstw peptydów na złocie przy użyciu komplementarnych metod elektrochemicznych oraz mikrowagi kwarcowej przed właściwymi eksperymentami metodą skaningowej spektroskopii tunelowej (STS). Przeprowadzone przez doktorantkę pomiary krzywych natężenia prądu w funkcji odległości dla złącz typu Au-S-peptyd-S-Au przynoszą informację na temat wpływu struktury badanych peptydów na efektywność przenoszenia elektronu, na poziomie pojedynczych cząsteczek. Wyniki przedstawione przez doktorantkę prowadzą do zasadniczej konkluzji z tej części pracy, że efektywność transferu elektronu dla badanych trzech peptydów zawierających odpowiednio: tyrozynę, tryptofan i alaninę, w niewielkim stopniu zależy od zastosowanego aminokwasu. Efektywność ta zależy zatem głównie od struktury łańcucha głównego, a nie grup bocznych w peptydzie. Ponadto, doktorantka krytycznie porównuje wyniki swoich badań z wynikami dla podobnych struktur w literaturze światowej, a zaobserwowane nawet niewielkie asymetrie w krzywych natężenie-napięcie prowadzą ją do wniosków na temat skorelowania wpływu momentu dipolowego cząsteczki na efektywność przepływu prądu w określonym kierunku wzdłuż cząsteczki umieszczonej w złączu. Bardzo ciekawą grupę związków badanych przy pomocy STS stanowią peptydy zawierające prolinę w łańcuchu w zmiennej liczbie w zakresie 1-4. W tym wypadku okazało się, że mostki prolinowe znacznie poprawiają przewodnictwo łańcucha peptydowego zbliżając jego przewodność zaskakująco blisko do tej mierzonej dla peptydów o strukturze helikalnej, co sugeruje brak istotnego udziału wiązań wodorowych dla ścieżki przemieszczania się elektronów. Wyniki uzyskane w tej części pracy oceniam wysoko - są one istotne w rozwoju wiedzy na temat zjawiska przewodzenia w

łańcuchach peptydowych. W całym opisie brakuje mi jednak trochę „pochwalenia się” przez doktorantkę szczegółami przebiegu pomiarów za pomocą STS, m.in. choćby szacunkowym prawdopodobieństwem uzyskania wyników pojedynczych pomiarów prezentowanych zbiorczo w postaci histogramów na rys. 27 i 32. Brak też informacji o tym, czy eksperyment dla danego peptydu był prowadzony przy użyciu jednego ostrza pomiarowego oraz ewentualnej obróbki statystycznej wyników z histogramów.

Rozdziały 11-13 rozprawy dotyczą badań warstw molekularnych zawierających melitynę (ang. melittin) - dodatnio naładowany peptyd o działaniu bakteriobójczym, będący składnikiem jadu pszczelego. Jest to tematyka bardzo ważna i aktualna szczególnie w kontekście ostatnich doniesień o zastosowaniu melityny jako środka przeciwko wirusowi HIV. Badania podstawowe dotyczące oddziaływania tego peptydu z modelowymi warstwami molekularnymi są istotne dla zrozumienia działania melityny na żywe komórki. Doktorantka badała zarówno warstwy na granicy faz powietrze-woda, jak i warstwy wyniesione na stałe podłoża stosując zwitterjonowe i ujemnie naładowane fosfolipidy oraz cholesterol do konstrukcji tych warstw.

Podstawowy wniosek z badań na monowarstwach na granicy faz brzmi: melityna nieselektywnie penetruje monowarstwy, a poziom jej oddziaływań zależy od stanu fizycznego monowarstwy i ładunku grup polarnych fosfolipidów. Więcej informacji na temat tych oddziaływań dostarczyły badania elektrochemiczne na biwarstwach wyniesionych na powierzchnię złota. Użycie kilku metod badawczych oraz porównanie wyników dla monowarstw i odpowiadających im biwarstw dostarczyło wiarygodnych danych do wysuwanych przez doktorantkę wniosków. Zaobserwowane różnice w podatności poszczególnych układów na wnikanie melityny oraz na kinetykę tego procesu tłumaczone są nie tylko różnicami w płynności warstw oraz ładunku tworzących je fosfolipidów, ale także specyficznym zachowaniem peptydu, który adsorbuje się na powierzchni warstwy (co może chwilowo obniżyć jej przepuszczalność dla jonów), a następnie reorganizuje powodując rozluźnienie struktury warstwy i wzrost jej przepuszczalności. Zaobserwowano też jakościową różnicę w obserwowanych zmianach w biwarstwach w zależności od zastosowanego stężenia melityny (1 i 10 μM).

Nie sposób odnieść się do wszystkich, moim zdaniem wartościowych i poprawnych wniosków z tej części badań, więc odniosę się jedynie do swoich wątpliwości w tym temacie.

Zgodnie z opisem, układ pomiarowy był tak skonstruowany, że czas inkubacji w roztworze melityny był stały (15 min) dla wszystkich biwarstw, które po przemyciu były przetrzymywane w czystym buforze (bez melityny) przez różny czas i odpowiednio badane. Czy ślepa próba z samym buforem bez inkubacji w roztworze melityny była przez doktorantkę przeprowadzona? Dlaczego biwarstwy nie były inkubowane przez dłuższy czas melityną, w szczególności przy zastosowaniu jeszcze mniejszego jej stężenia. Takie eksperymenty pomógłby pomóc zweryfikować wnioski dotyczące reorganizacji zaadsorbowanej melityny na powierzchni biwarstw.

Na końcu należy jeszcze wspomnieć o obrazowaniu zachowania biwarstw pod wpływem melityny prowadzonym za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM) działającej w tzw. trybie MAC. Otrzymane obrazy dostarczyły dodatkowych informacji na temat struktury membran, powstawania porów czy też upłynnienia, potwierdzając generalnie wnioski uzyskane z poprzednich technik pomiarowych.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa stanowi bardzo interesujący wkład w badania podstawowe nad warstwami molekularnymi zawierającymi peptydy i zawiera istotne elementy nowości naukowej. Pani mgr Joanna Juhaniewicz wykazała się bezsprzecznie umiejętnością prowadzenia pracy badawczej na wysokim poziomie, właściwego doboru technik badawczych i wyciągania rzetelnych wniosków na podstawie uzyskanych wyników badań. Oceniając pozytywnie recenzowaną pracę stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę, zatem do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Joanny Juhaniewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Kraków, 10 września 2013 roku

