

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

“Peptides as functional nanostructures in molecular layers”

(tytuł w języku polskim: „Peptydy jako funkcjonalne nanostruktury w warstwach molekularnych”)

Promotor pracy: dr hab. Sławomir Sęk

Pierwszym celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu pierwszo- i drugorzędowej struktury peptydu na efektywność mediowanego transportu elektronów. Aby go zrealizować, zsyntezowano sześć oligopeptydów zawierających od dwóch do pięciu reszt aminokwasowych. Każdy z peptydów posiadał końcowe grupy tiolowe, które umożliwiały ich unieruchomienie w układzie złącza tunelowego, pomiędzy złotym substratem a złotą igłą skaningowego mikroskopu tunelowego (STM). Monowarstwy peptydów były otrzymywane metodą samoorganizacji z roztworu, a ich jakość była weryfikowana przy użyciu metod elektrochemicznych oraz mikrowagi kwarcowej. Badania te wykazały, że wszystkie peptydy tworzą monowarstwy charakteryzujące się wysokim upakowaniem cząsteczek na powierzchni złotego substratu. Kolejnym etapem były pomiary przewodności, które zostały podzielone na dwie części. Najpierw zbadano wpływ poszczególnych aminokwasów łańcucha peptydowego na efektywność przeniesienia elektronu. Pomiary metodą skaningowej spektroskopii tunelowej (STS) wykazały, że struktura chemiczna poszczególnych aminokwasów nie wpływa na transport elektronów, który zachodzi głównie przez wiązania amidowe peptydu, czyli jest niezależny od charakteru łańcuchów bocznych aminokwasów. Druga część pomiarów przewodności została przeprowadzona na peptydach zawierających od jednej do czterech reszt prolinowych. Prolina jest jedynym aminokwasem, spośród wszystkich naturalnie występujących, posiadającym drugorzędową grupę aminową, co uniemożliwia jej tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Z drugiej strony, prolina tworzy stabilne struktury drugorzędowe już od trzech reszt prolinowych w łańcuchu peptydowym. Tworzenie wspomnianej struktury drugorzędowej w zsyntezowanych peptydach zostało potwierdzone badaniami metodą spektroskopii dichroizmu kołowego, które wykazały, że zsyntezowane łańcuchy oligoprolinowe przyjmują strukturę poliproliny II. Na podstawie pomiarów przewodności stwierdzono, że efektywność transportu elektronowego przez łańcuchy oligoprolinowe maleje wraz ze wzrastającą długością peptydu. Zależność ta wskazuje, że dominującym mechanizmem przeniesienia elektronu przez badane układy jest

mechanizm tunelowania. Wyznaczony z pomiarów przewodności współczynnik tunelowania wynosił 0.45 \AA^{-1} . Stwierdzono zatem, że efektywność przeniesienia elektronu przez łańcuchy peptydowe o strukturze poliproliny II jest podobna do efektywności obserwowanej dla układów α -helikalnych. Jak już wspomniano, prolina nie tworzy wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, zatem efektywny transport elektronów spowodowany jest konformacją sztywnego łańcucha oligoprolinowego. Wyniki te pozwalają również wyciągnąć wniosek, że podstawową rolą wiązań wodorowych w innych strukturach drugorzędowych jest stabilizowanie optymalnej struktury łańcucha peptydowego, natomiast utworzone przez nie alternatywne ścieżki tunelowania nie mają kluczowego znaczenia dla całkowitej efektywności transportu elektronowego.

Drugim celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu peptydu antybiotykowego, melityny, na właściwości modelowych błon lipidowych zbudowanych z trzech różnych fosfolipidów naturalnie występujących w błonach biologicznych. Badane fosfolipidy miały taką samą długość i budowę łańcuchów acylowych, różniły się natomiast budową grup polarnych, co umożliwiło tworzenie modelowych błon lipidowych o różnych właściwościach. Zweryfikowano również wpływ cholesterolu na działanie melityny. W pierwszym etapie badano oddziaływanie melityny z monowarstwami lipidów na granicy faz woda-powietrze przy użyciu wanny Langmuira. Eksperymenty przeprowadzone na monowarstwach mieszanych wykazały, że melityna wbudowuje się w warstwy lipidowe, co prowadzi do wzrostu powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę. Na podstawie zmniejszającego się współczynnika ściśliwości, jak również przesunięcia lub zaniku przejść fazowych stwierdzono, że melityna upłynnia warstwy lipidowe. Jednak zmiany w strukturze modelowych błon wywołane przez melitynę były zależne zarówno od ładunku polarnej głowy jak i stanu fizycznego lipidu, co doprowadziło do wniosku, że lipidy naładowane ujemnie i/lub będące w fazie bardziej skondensowanej są mniej podatne na działanie melityny. Podobne wyniki otrzymano z pomiarów maksymalnego ciśnienia wnikania melityny, w których peptyd wstrzykiwany był do subfazy, pod skompresowaną monowarstwę lipidową. Eksperymenty te wykazały, że oporność lipidów na działanie melityny rośnie w szeregu: fosfatydylocholina < fosfatydyloglicerol < fosfatydylocholina:cholesterol < fosfatydyloseryna.

Do dalszych eksperymentów przeniesiono dwuwarstwy lipidowe na substraty stałe poprzez kombinację dwóch metod: Langmuira-Blodgett oraz Langmuira-Schaefera. Dwuwarstwy przeniesione na substrat złoty badane były elektrochemicznie, podczas gdy dwuwarstwy przeniesione na mikę obrazowano przy użyciu mikroskopu sił atomowych (AFM). W pomiarach elektrochemicznych wpływ melityny na dwuwarstwy lipidowe monitorowany był przy użyciu heksacyjanożelazianów, potwierdzając wyniki otrzymane na granicy faz woda-powietrze. Dwuwarstwa zbudowana z DMPC była najbardziej podatna na działanie melityny i ulegała zniszczeniu pod wpływem $10 \mu\text{M}$ roztworu melityny. Jednak gdy

stężenie peptydu obniżono do 1 μM , melityna powodowała tworzenie porów w błonie DMPC, nie prowadząc do jej zniszczenia nawet po 12 godzinach działania melityny. Wyniki te wskazują, że sposób działania peptydów antybiotykowych silnie zależy od ich stężenia. Dodanie cholesterolu (30%) do dwuwarstwy DMPC spowodowało powstanie bardziej skondensowanego układu, który był znacznie bardziej odporny na działanie melityny. Ponadto, w przypadku lipidów naładowanych ujemnie najpierw obserwowano adsorpcję peptydu na powierzchni dwuwarstw lipidowych wskutek oddziaływań elektrostatycznych, co w rezultacie utrudniało wbudowywanie się melityny w błonę lipidową.

Zmiany w strukturze modelowych błon lipidowych pod wpływem melityny były również obserwowane *in situ* przy użyciu mikroskopu sił atomowych. Poddanie dwuwarstwy DMPC działaniu 1 μM roztworu melityny prowadzi do powstania porów, obserwowanych trzy godziny po dodaniu melityny. Jednak po 20 godzinach od dodania melityny pory nie były widoczne, natomiast obserwowano charakterystyczną pofalowaną strukturę fazy lipidowej P_{β}' (*ang. ripple phase*). Istnienie tej fazy spowodowane było przemieszczeniem się cząsteczek wody i melityny przez dwuwarstwę lipidową podczas tworzenia porów, które oddzieliły błonę DMPC od powierzchni miki. Faza P_{β}' została również zaobserwowana po dodaniu melityny do dwuwarstwy DMPS. Jednak w tym przypadku zmiany w strukturze błony obserwowane były natychmiast po dodaniu melityny, bez uprzedniego tworzenia przejściowych porów, i pozostawały niezmiennie przez wiele godzin. Stwierdzono, że tworzenie struktury P_{β}' wynika z braku bezpośredniego kontaktu substratu z dwuwarstwą, gdyż podłoże przed przeniesieniem dwuwarstwy DMPS zostało zmodyfikowane (3-aminopropylo)trietoksyloksylenem. Ponadto, silna adsorpcja melityny na powierzchni błony DMPS może powodować zmiany w upakowaniu cząsteczek DMPS, a w konsekwencji prowadzić do powstania fazy P_{β}' .

Silne działanie melityny na lipidy występujące w komórkach eukariotycznych wydaje się wykluczać możliwość jej wykorzystania jako potencjalnego leku; stanowi ona jednak doskonałe narzędzie do badania wpływu i sposobu działania peptydów antybiotykowych na błony biologiczne.