

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:  
**„Badanie struktury i właściwości wieloskładnikowych dwuwarstw lipidowych oraz ich oddziaływań z antybiotykami peptydowymi”**

*Promotor pracy: dr hab. Sławomir Sęk*

Model płynnej mozaiki stworzony na początku lat 70-tych przez S.J. Singera i G.L. Nicolsona jest powszechnie przyjętą koncepcją stosowaną do opisu organizacji cząsteczek lipidów i białek w strukturze błon komórkowych. Na przestrzeni ostatnich 40 lat badania naukowe i informacje zgromadzone na ich podstawie pozwoliły na szeroki opis relacji występujących pomiędzy składem cząsteczkowym błon komórkowych a ich szeroko rozumianą funkcjonalnością. W ogólnym ujęciu, błona komórkowa może zostać przedstawiona jako zdefiniowana struktura dwuwarstwowa zbudowana z różnorodnych lipidów oraz białek, której głównym zadaniem jest regulowanie przepływu metabolitów między środowiskiem zewnętrznym i wewnętrznym. Wiadomo, że błony komórkowe są miejscem zachodzenia rozmaitych procesów biochemicznych zapewniających homeostazę całej komórki w odpowiedzi na wyzwania środowiskowe. Z tego względu błony komórkowe stanowią pierwszą linię obrony organizmu przed rozmaitymi patogenami, takimi jak toksyny peptydowe. Toksyny peptydowe to związki naturalne, wydzielane przez rozmaite organizmy zwykle w celach obronnych, zbudowane z 12-50 reszt aminokwasowych, których masa cząsteczkowa zazwyczaj nie przekracza 10 kDa. Wykazują one szeroki zakres działania wobec bakterii, wirusów, grzybów i pasożytów, w związku z czym często rozpatrywane są jako związki, które mogą znaleźć zastosowanie terapeutyczne, przede wszystkim ze względu na ich biodostępność i stabilność w środowisku fizjologicznym.

Tematyka niniejszej pracy obejmowała badania związane z właściwościami wieloskładnikowych dwuwarstw lipidowych i ich oddziaływań z antybiotykami peptydowymi. Głównym celem przeprowadzonych badań w ramach pracy doktorskiej było określenie właściwości fizycznych modelowych warstw biomimetycznych o zróżnicowanym składzie lipidowym. Mikroskopia sił atomowych (AFM) pozwoliła na zobrazowanie struktury dwuwarstw lipidowych oraz identyfikację poszczególnych faz, a tym samym umożliwiła weryfikację możliwości powstawania tak zwanych domen lipidowych, co uzależnione jest przede wszystkim od składu warstwy biomimetycznej. Wprowadzenie peptydów antybiotykowych (melityna oraz lizenina) do środowiska warstw biomimetycznych pozwoliło na zbadanie charakteru i specyficzności oddziaływania tego typu cząsteczek z lipidami.

Jednym z celów badań zawartych w rozprawie doktorskiej było określenie optymalnych warunków formowania dwuwarstw lipidowych za pośrednictwem techniki rozkładania liposomów na substratach stałych - miedzi oraz złocie. Wykorzystanie w badaniach mikroskopii AFM umożliwiło określenie wpływu właściwości powierzchni substratu oraz środowiska na szybkość procesu rozkładania liposomów i architekturę otrzymanych dwuwarstw. Rezultaty eksperymentów pozwoliły na przedstawienie mechanizmu procesu rozkładania liposomów składających się z 1,2-dimirystylo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny (DMPC) oraz cholesterolu na powierzchni złota Au(111). Elektrochemiczna mikroskopia tunelowa oraz mikroskopia sił atomowych w wersji elektrochemicznej umożliwiły, poprzez kontrolowanie potencjału przykładanego do elektrody złotej, spowolnienie procesów adsorpcyjnych oraz procesów związanych z reorganizacją struktur lipidowych na powierzchni substratu, a tym samym obserwację kolejnych etapów tworzenia dwuwarstwy lipidowej. Pozwoliło to na wyodrębnienie etapów towarzyszących formowaniu dwuwarstwy DMPC/cholesterol takich jak: A) wiązanie się liposomów z powierzchnią złota i uwalnianie materiału lipidowego, który następnie tworzy warstwę adsorpcyjną o lamelarnej strukturze, charakteryzującej się płaską orientacją cząsteczek na powierzchni; B) kumulacja materiału lipidowego z pękających liposomów na powierzchni warstwy

adsorpcyjnej i utworzenie struktur hemimicelarnych; C) reorganizacja hemimicelarniej struktury warstwy adsorpcyjnej; D) formowanie dwuwarstwy lipidowej. Uzyskano również znaczące informacje odnośnie różnic w mechanizmie formowania dwuwarstw na powierzchni złota w porównaniu do analogicznego procesu przebiegającego na substratach o właściwościach hydrofilowych, takich jak mika.

Opracowanie wieloskładnikowych układów lipidowych zawierających cholesterol (CHOL), 1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfocholinę (DOPC) oraz N-heksadekanoilo-D-sfingozylofosfocholinę (HSM) umożliwiło uzyskanie odpowiednich modeli naturalnych błon komórkowych ukierunkowanych na tworzenie tzw. raftów lipidowych. Obrazowanie struktury powierzchniowej wieloskładnikowych dwuwarstw na powierzchni miki za pośrednictwem mikroskopii AFM umożliwiło w sposób jednoznaczny określić właściwości wieloskładnikowych układów lipidowych DOPC/HSM oraz DOPC/HSM/CHOL pod kątem ich wzajemnej mieszalności i dystrybucji składników w strukturze dwuwarstwy lipidowej oraz pozwoliło na zaobserwowanie współistnienia obok siebie różnych pod względem płynności i składu obszarów w strukturze otrzymywanych dwuwarstw lipidowych. W rozprawie doktorskiej przedstawiono, w jaki sposób zawartość sfingomieliny oraz cholesterolu wpływa na występowanie separacji fazowej w badanych układach i tworzenie domen lipidowych. Ponadto, zastosowanie spektroskopii sił AFM pozwoliło na uzyskanie, oprócz danych dotyczących morfologii, informacji odnośnie właściwości mechanicznych otrzymywanych błon biomimetycznych. Informacje uzyskane w trakcie badań pozwoliły na skonstruowanie modelowych układów biomimetycznych wykorzystanych w dalszej przeprowadzonych badaniach dotyczących oddziaływania wieloskładnikowych błon lipidowych z peptydami - lizeniną oraz melityną.

W części pracy poświęconej oddziaływaniu wieloskładnikowych dwuwarstw lipidowych z antybiotykami peptydowymi wykorzystano układy lipidowe promujące powstawanie domen lipidowych bogatych w sfingomielinę. Wykazano, że wprowadzenie melityny do środowiska błon biomimetycznych w niskich stężeniach skutkowało stopniową ewolucją zmian strukturalnych dwuwarstw - obserwowano tworzenie się defektów w strukturze biomimetyków oraz przemiany strukturalne towarzyszące wnikaniu peptydu do wnętrza błony. Przy czym działanie melityny widoczne było przede wszystkim w obszarach matrycy lipidowej zawierającej w przewodzie składnik glicerofosfolipidowy - DOPC. Domeny lipidowe wzbogacone w sfingolipid i cholesterol wykazywały wysoką odporność wobec działania melityny. Zaobserwowano tworzenie się nowej, nietrwałej struktury powierzchniowej charakterystycznej dla warunków odpowiadających istnieniu stanu przejściowego pomiędzy fazą ciekłą nieuporządkowaną ( $L_{\alpha}$ ) i ciekłą uporządkowaną ( $L_{\beta}$ ). Zwiększenie stężenia melityny implikowało praktycznie całkowite zniszczenie błon biomimetycznych. Wykorzystano również zmodyfikowane sondy mikroskopu AFM do obrazowania i badania siły oddziaływania pomiędzy cząsteczkami unieruchomionymi na ich powierzchni a składnikami otrzymywanych dwuwarstw lipidowych. W wyniku chemicznej modyfikacji, na powierzchni sond AFM unieruchomione zostało białko lizenina oraz tryptofan. Zastosowanie spektroskopii sił umożliwiło ocenę siły oddziaływania pomiędzy zmodyfikowaną powierzchnią sondy, czyli cząsteczkami lizeniny lub tryptofanu, a składnikami lipidowymi błon biomimetycznych. Zaobserwowano, że lizenina wykazuje tendencję do specyficznego wiązania się z powierzchnią błon biomimetycznych w obszarach bogatych w sfingomielinę (wartość siły wiązania cząsteczek sfingomieliny przez lizeninę, została oszacowana na ~125 pN). Użycie sond z zakotwiczonymi na ich powierzchni cząsteczkami tryptofanu pozwoliło natomiast na weryfikację postulowanych w literaturze doniesień odnośnie wpływu tego aminokwasu na właściwości lizeniny i jego kluczowe znaczenie w procesie wiązania się białka z powierzchnią błon komórkowych.

Kolejnym celem pracy doktorskiej było wykazanie jakie czynniki determinują siłę napędową wzmocnienia siły oddziaływania pomiędzy sfingolipidami a cholesterolem, w porównaniu do innych fosfolipidów. Wysokorozdzielcze zdjęcia otrzymane za pomocą skaningowej mikroskopii tunelowej umożliwiły molekularną analizę struktur adsorpcyjnych fosforodihydroceramidu (1-fosforo-N-palmitoilo-D-*erythro*-dihydroceramidu, PDHC) oraz mieszaniny fosforodihydroceramid/cholesterol na powierzchni substratu złotego Au(111).

Wykazano, że orientacja cząsteczek PDHC na powierzchni substratu w dużym stopniu determinowana jest poprzez oddziaływania pomiędzy substratem i łańcuchami alkilowymi. Natomiast oddziaływania pomiędzy polarnymi głowami i niepolarnymi łańcuchami alkilowymi wpływają na orientację cząsteczek w strukturze warstwy adsorpcyjnej implikując lamelną architekturę warstwy. Mikroskopia EC-STM umożliwiła również zarejestrowanie zdjęć molekularnej warstwy adsorpcyjnej mieszaniny PDHC/cholesterol. Ich analiza pozwoliła na zaobserwowanie znaczących różnic w kinetyce mechanizmu tworzenia molekularnej struktury adsorpcyjnej oraz różnic w samych strukturach warstw tworzonych przez mieszaniny PDHC i fosfolipidów z cholesterolem. Co więcej, utworzona warstwa adsorpcyjna PDHC/cholesterol nie wykazywała korelacji strukturalnej z jakąkolwiek znaną strukturą warstw powierzchniowych fosfolipidów, cholesterolu i ich mieszanin. Pozwala to wnioskować o odmiennym charakterze oddziaływania sfingolipidu z cholesterolem w porównaniu do glicerofosfolipidów.

Wyniki badań uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej zostały opublikowane w czasopismach międzynarodowych: *Imaging & Microscopy* oraz *Langmuir*.