

## Streszczenie rozprawy doktorskiej Piotra Stępnia:

„Struktura przestrzenna nanodysków jako modelu błony biologicznej stosowanego w badaniach białek błonowych”

Białka błonowe stanowią istotną część ludzkiego proteomu. Związane są one z szeregiem podstawowych mechanizmów fizjologicznych, a upośledzenie ich działania wiąże się ze stanami patologicznymi, których konsekwencją mogą być choroby nowotworowe, autoimmunizacyjne oraz neurodegradacyjne. Z badaniami białek błonowych wiąże się jednak szereg trudności. Badania z wykorzystaniem metod *in vivo* nie dostarczają dokładnych informacji na poziomie molekularnym, natomiast metody *in vitro* wymagają zastosowania sztucznych układów modelowych, ze względu na hydrofobowy charakter białek błonowych. Najbardziej obiecującym układem zyskującym na popularności w ostatnich latach są nanodyski.

Nanodyski to fragmenty dwuwarstwy lipidowej stabilizowane przez homodimer białek rusztowania MSP1 (ang. *Membrane Scaffold Protein*). Poprzez modyfikację długości białek MSP można otrzymać nanodyski o różnej średnicy od kilku do kilkunastu nanometrów. Do zrębu dwuwarstwy lipidowej występującej w nanodyskach można wprowadzić białko błonowe i badać je jako efektywnie rozpuszczalne w roztworach polarnych. Nanodyski są obecnie złotym standardem układów naśladujących błony biologiczne zapewniających stabilność białkom błonowym. Wykorzystywane są one w badaniach strukturalnych z użyciem metod takich jak mikroskopia krio-elektronowa i jądrowy rezonans magnetyczny, a także w badaniach funkcjonalnych.

Z wprowadzeniem nawet tak obiecującego układu modelowego, jakim są nanodyski, należy jednak postawić pytanie, czy wyniki otrzymywane w takim sztucznym układzie mają przeniesienie do kontekstu biologicznego. Struktura białek MSP1 stabilizujących nanodyski została dokładnie opisana i zrozumiana w ostatnich latach. Mimo to badania dotyczące części lipidowej nanodysków są mniej liczne i nie dostarczają kompletnych informacji o przestrzennej organizacji oraz dynamice błony lipidowej. Informacje te są niezbędne w kontekście eksperymentów *in vitro* dotyczących białek błonowych, jako że białka te są wysoce czułe na swoje otoczenie lipidowe, zarówno w ramach czysto fizykochemicznych oddziaływań jak i tych specyficznych. Do właściwego funkcjonowania i scharakteryzowania funkcji takich białek konieczne jest otoczenie lipidowe porównywalne z tym występującym w układach biologicznych pod względem zarówno uporządkowania jak i składu.

Celem pracy było szczegółowe zbadanie struktury nanodysków o różnym składzie lipidowym, a także o różnych rozmiarach. Informacje o strukturze i dynamice badanych błon lipidowych zostały pozyskane z wykorzystaniem elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) oraz szeregu sond spinowych. By określić wpływ białek różnej długości na dwuwarstwę lipidową zbadane zostały nanodyski o rozmiarach odpowiednio 9,7 oraz 12,8 nm przygotowane zarówno z nasyconych jak i częściowo nienasyconych lipidów. Otrzymane wyniki zostały porównane z wynikami pozyskanymi dla klasycznie używanego modelu błony – liposomami. W pracy została przeprowadzona analiza zebranych widm EPR połączona z dopasowaniem do nich modelu ruchu znacznika, z użyciem symulacji widmowych. Wyniki doświadczalne zostały również zestawione z wynikami symulacji dynamiki molekularnej.

Przedstawiane w tej pracy wyniki pozwoliły na szczegółową charakterystykę dynamiki i uporządkowania lipidów w badanych układach. Pokazano, że obecność białka MSP stabilizującego nanodyski zaburza ich strukturę w porównaniu do tej obecnej w liposomach.

Dla obszaru głów polarnych w nanodyskach zaobserwowano zmniejszenie upakowania lipidów, zwiększenie ich mobilności oraz wzrost penetracji wody do tego rejonu względem liposomów.

Ruch lipidów wewnątrz nanodysków jest bardzo zaburzony przez obecność białek MSP1, wywołujących wysokie ciśnienie lateralne. W porównaniu z liposomami, ruch ten jest silnie anizotropowy, a sama dwuwarstwa lipidowa jest bardziej upakowana. Wnętrze lipidowe nanodysków zostało scharakteryzowane również jako posiadające wysoką barierę hydrofobową. Rozmiar nanodysków wpływa na opisane własności układu – im większa średnica nanodysku tym mniejsze uporządkowanie rejonu głów polarnych i wnętrza dwuwarstwy lipidowej.

Lateralna charakterystyka błon modelowych w nanodyskach ukazała również zmiany uporządkowania lipidów w zależności od ich odległości od białka MSP. W nanodyskach lipidy graniczące z białkami MSP znajdują się w fazie ciekłej nieuporządkowanej. Lipidy znajdujące się natomiast w centralnym obszarze nanodysków występują, nawet dla temperatur powyżej przejścia fazowego, w fazie żelowej lub w fazie ciekłej uporządkowanej porównywalnej z błonami lipidowymi zawierającym wysokie stężenie cholesterolu. Scharakteryzowane zostały również zmiany lateralnej organizacji lipidów w nanodyskach względem temperatury.

Nanodyski przybliżają w dobry sposób naturalnie wysoce „zatłoczone” błony biologiczne, odwzorowując zarówno wysokie stężenie białek jak i cholesterolu, bez potrzeby stosowania tych dodatków.

Dodatkowo przeprowadzone zostały badania wpływu CHS (ang. *Cholesteryl Hemisuccinate*) na układy błon biologicznych, które pokazały jego porządkujący wpływ na dwuwarstwę. CHS jest najczęściej stosowanym analogiem cholesterolu w kontekście białek błonowych. Jest on również najczęściej stosowanym steroidem w nanodyskach stabilizujących te białka. Wyniki uzyskane z jego wykorzystaniem interpretowane są jako te pozyskane dla cholesterolu. Stosując spektroskopię EPR oraz spektroskopię fluorescencyjną TCSPS (ang. *Time-Correlated Single Photon Counting*), scharakteryzowano w przedstawionej pracy wpływ CHS na naładowaną błonę liposomów i porównano go z wpływem obecności cholesterolu. Oba sterole okazały się zmieniać strukturę zbadanych modelowych błon w różny sposób, wskazując na to, iż CHS nie jest dobrym substytutem cholesterolu. Przeprowadzone badania wykazały, iż CHS wpływa na obszar głów polarnych diametralnie inaczej niż cholesterol. Obdarzona ładunkiem głowa polarna CHS zmniejsza ruchliwość lipidów w tym rejonie równocześnie nie pozwalając na zwiększoną penetrację wody do wnętrza dwuwarstwy lipidowej, typową dla błon zawierających cholesterol. Głębsza lokalizacja w błonie CHS i jego niedopasowanie steryczne do cząsteczek lipidowych uniemożliwiają również typowe dla cholesterolu zwiększenie płynności najgłębszych części dwuwarstwy.

Dodatkowo scharakteryzowany został również wpływ CHS na strukturę nanodysków. CHS znacząco zwiększa uporządkowanie dwuwarstwy lipidowej w nanodyskach. Obserwowany efekt porządkujący był wyższy niż ten scharakteryzowany dla liposomów z cholesterollem. Tak wysokie uporządkowanie może być nieadekwatne w badaniach białek błonowych. Dodatek steroli do nanodysków powinien być kontrolowany ze względu na oddziaływania specyficzne, a nie wpływ na samą dwuwarstwę lipidową.

Reasumując, w niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano techniki spektroskopii EPR, fluorescencyjne oraz modelowania molekularnego, by opisać strukturę dwuwarstwy lipidowej w modelu błony biologicznej jakim są nanodyski oraz scharakteryzować różnice we wpływie na dwuwarstwę cholesterolu i CHS. Otrzymane wyniki pokazują szczegółowy, przestrzenny obraz dynamiki oraz struktury dwuwarstwy lipidowej w nanodyskach, która wydaje się być bardzo dobrym modelem błon biologicznych. Udowodniono również znacznie różny wpływ CHS i cholesterolu na dwuwarstwę lipidową podważając adekwatność CHS jako analogu cholesterolu w badaniach białek błonowych.