Prof. dr hab. Krzysztof Gwoździński
Katedra Biofizyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Piotra Stępnia

pt. *„Struktura przestrzenna nanodysków jako modelu błony biologicznej stosowanego w badaniach białek błonowych”* wykonanej w Zakładzie Biofizyki oraz w Zakładzie Biochemii Fizycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Pani dr hab. Anny Wiśniewskiej-Becker.

Badania stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej mgr Piotra Stępnia dotyczą struktur lipidowych przy użyciu nanodysków. Białka integralne zakotwiczone w dwuwarstwie lipidowej błony komórkowej są odpowiedzialne za import i eksport wielu cząsteczek niezbędnych do funkcjonowania komórki oraz jej komunikację z otaczającym mikrośrodowiskiem. Izolowanie białek integralnych z błony przy użyciu detergentów wiąże się z utratą aktywności funkcjonalnej oraz może prowadzić do ich agregacji i precypitacji. Aby uniknąć zmian w strukturze białka wbudowuje się je w natywną błonę lub micelę detergentu, które naśladują właściwości błony biologicznej. Jednak rozpuszczanie w detergentach, liposomach lub monowarstwach może również wpływać na właściwości badanego białka. Aby umożliwić badania białek w stanie natywnym wprowadzono metodę z zastosowaniem nanodysków, utworzonch z dwuwarstwy fosfolipidowej otoczonej stabilizującym, amfipatycznym, helikalnym białkiem szkieletowym. Taki model najlepiej odzwierciedla procesy zachodzące w błonach natywnych. Nanodyski membranowe są układami stabilnymi i monodyspersyjnymi. Ich unikalne właściwości znalazły zastosowania w badaniach enzymów, transporterów błonowych, kontroli stanu oligomeryzacji oraz badań strukturalnych.

Zespół Pani dr hab. Anny Wiśniewskiej-Becker od wielu lat zajmuje się badaniami błon modelowych, w tym nanodysków utworzonych z naturalnych lipidów zawierających

także naturalne komponenty, takie jak, karotenoidy i ksantofile. Są to unikalne badania, które umożliwiają poznanie mechanizmów oddziaływania tych związków z błonami, w tym również błonami fotoreceptorowymi.

W swojej pracy doktorskiej mgr Piotr Stępień podjął badania struktury nanodysków o różnym składzie lipidowym stabilizowanych przez szkieletowe, dobrze poznane białka helikalne MSP1.

Zastosowanie przez Doktoranta nanodysków umożliwiło badanie dynamiki lipidów w modelu zbliżonym do błony naturalnej.

W części teoretycznej rozprawy stanowiącej ok. 1/5 objętości rozprawy Autor omówił modele błon stosowanych w badaniach białek błonowych wprowadzając Czytelnika w aktualny stan wiedzy związany z budową miceli, biceli, liposomów oraz nanodysków, a także wpływem otoczenia lipidowego na aktywność białka błonowego uwzględniając wpływ cholesterolu oraz jego estru z kwasem bursztynowym. W dalszej części pracy Doktorant opisał techniki badawcze stosowane w badaniach wyżej wymienionych struktur lipidowych, takie jak, rozpraszanie dynamiczne światła, fluorescencja z pomiarem czasu życia stanu wzbudzonego oraz technikę elektronowego rezonansu paramagnetycznego.

Postawione cele rozprawy doktorskiej, mimo, że obszerne, zostały jasno sformułowane w postaci głównych i dodatkowych zagadnień zostały zrealizowane i opisane w dalszej części pracy.

Założone cele pracy uważam, za interesujące, bowiem umożliwiły porównanie dynamiki dwuwarstwy lipidowej w nanodyskach z obecną w liposomach.

W dalszej części pracy Autor omówił stosowane w badaniach substancje oraz przygotowanie próbek do pomiarów przy użyciu różnych metod badawczych. Przedstawił otrzymywanie i oczyszczanie białek MSP1D1, MSP1E3D1 oraz proteazy TEV z bakterii *E. coli*, potrzebnych do tworzenia nanodysków. Nanodyski oraz liposomy utworzone były z trzech podstawowych lipidów DMPC (1,2-dimirystoilo-fosfatydylocholiny), POPC (1-palmitoilo-2-oleoilo-fosfatydylocholiny) oraz POPG (1-palmitoilo-2-oleoilo-fosfatydyloglicerolu) i ich kombinacji z cholesterolem i jego estrem bursztynianowym (CHS). Zachowanie optymalnych proporcji wszystkich składników łącznie z białkami decyduje o właściwościach utworzonych nanodysków. Autor zastosował pięć znakowanych spinowo (pochodnych doksylowych) analogów fosfatydylocholiny, z których jeden miał znakowaną głowę polarną T-PC (dipalmitoilo-2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksyl-

fosfatydylocholina), a pozostałe n-PC (1-palmitoilo-2-stearyno-(n-doksyl)-fosfatydylocholina) znakowany łańcuch węglowodorowy estrowo związanego kwasu tłuszczowego z grupą doksylową umieszczoną w różnej odległości od grupy karboksylowej (5-PC, 10-PC, 12-PC i 16-PC). Użycie kilku sond umożliwiło określenie ruchliwości łańcuchów węglowodorowych na różnych głębokościach dwuwarstwy lipidowej w nanodyskach i liposomach. Autor prowadził badania w temperaturach 293K i 310K, odpowiednio poniżej i powyżej temperatury przejścia fazowego (T_m). Na uwagę zasługuje niezależnie przeprowadzona symulacja ruchu rotacyjnego sond spinowych w oparciu o model MOMD (microscopic order macroscopic disorder), która umożliwiła uzyskanie dodatkowych informacji o mobilności sond spinowych oraz zawadach przestrzennych (sterycznych) w ich mikrośrodowisku. Doktorant doskonale opanował technikę tworzenia nanodysków z obu białek MSP1, które uzyskane z niezależnych preparatyk nieznacznie różniły się średnicą hydrodynamiczną.

Do określenia ruchliwości sondy spinowych oprócz czasów korelacji rotacyjnej (τ_{2B} i τ_{2C}) dla widm izotropowych, Autor określił również szerokość linii niskopolowej widma, maksymalne rozszczepienie widma ($2A_{zz}$) oraz stosunek linii środkowopolowej do linii wysokopolowej widma (sonda T-PC). Parametry te były podobne dla dwuwarstw w liposomach utworzonych z nienasyconego lipidu POPC i nasyconego DMPC, ale różniły się w porównaniu z dwuwarstwami w nanodyskach zawierających oba białka MSP1.

Natomiast dla sond n-PC (5-PC, 10-PC, 16-PC) obliczony został parametr uporządkowania (S_{mol}) oraz wartość maksymalnego rozszczepienia widma. Wartość tego parametru była nieznacznie wyższa w nanodyskach niż liposomach dla obu temperatur (293 i 310K), co świadczy o wyższym stanie ich uporządkowania. Jednak największa różnica wystąpiła dla dwuwarstw utworzonych z DMPC w temperaturze 310K, co związane było z przejściem fazowym tego lipidu.

Na podstawie parametru $2A_{zz}$ Autor wyznaczył profile polarności dwuwarstw lipidowych utworzonych z POPC i DMPC wykazując znaczne różnice w dla tego parametru we wnętrzu dwuwarstwy lipidowej w nanodyskach w porównaniu z liposomami stosując sondy n-PC. Różnice w profilach polarności występowały także w nanodyskach zawierających białko MSP1D1 w porównaniu do białka MSP1E3D1. Zastosowanie sondy T-PC wykazało znaczny wzrost polarności jej otoczenia w nanodyskach w porównaniu do liposomów. Parametr ten był także wyższy nanodyskach zawierających białko MSP1E3D1 niż zbudowanych z białka MSP1D1. Aby dodatkowo opisać ruch znaczników Autor dokonał

dopasowania widm teoretycznych do doświadczalnych uzyskując bardzo wysoki poziom dopasowania. Uwzględnił także rozkłady prawdopodobieństwa dla kątów dostępnych dla sondy T-PC w badanych układach w temperaturach 293 i 310K.

Analiza danych uzyskanych przy użyciu różnych sond, dla których wyznaczono parametr uporządkowania S_0 oraz parametr R (prostopadłe) związany z częstotliwością dyfuzji rotacyjnej, wykazała wyższy stopień uporządkowania łańcuchów węglowodorowych lipidów w nanodyskach powyżej temperatury przejścia fazowego (POPC w 293K oraz POPC i DMPC w 310K) oraz niższy, poniżej przejścia fazowego (DMPC w 293K). W tym przypadku Autor również uwzględnił rozkład prawdopodobieństwa dla kątów dostępnych dla sondy 16-PC.

Natomiast przeprowadzone badania nanodysków i liposomów przy użyciu sondy 12-PC ujawniły obecność dwóch populacji różniących się stopniem unieruchomienia (szybkiej i wolnej). Udział obu składowych w funkcji temperatury był bardziej wyeksponowany w nanodyskach niż liposomach utworzonych z obu lipidów (POPC i DMPC). Obecność składowej szybkiej w nanodyskach wskazuje na obecność lipidów w fazie płynnej nieuporządkowanej obecnej w lipidach granicznych. Natomiast lipidy ze składowa wolną w niższych temperaturach wykazywały uporządkowanie charakterystyczne dla lipidów poniżej przejścia fazowego (faza żelu), w lipidach utworzonych z POPC (w zakresie temperatur: 275-293K), a w lipidach DMPC (w zakresie temperatur: 297-305K). Jak pisze Autor, wynik jest interesujący, bowiem dla tych temperatur (powyżej przejścia fazowego) lipidy powinny występować w fazie płynnej nieuporządkowanej.

Przeprowadzone badania temperaturowe obu nanodysków MSP1D1 i MSP1E3D1 zbudowanych z lipidów POPC oraz DMPC umożliwiły obliczenie udziału procentowego i entalpii swobodnej (310K) oraz parametrów termodynamicznych, entalpii i entropii związanych z przejściem składowej szybkiej w wolną.

Ze wzrostem temperatury następuje rozluźnienie struktury nandysków i obserwuje się wzrost udziału populacji odpowiadającej lipidom granicznym. Dla lipidów umieszczonych centralnie w dwuwarstwie obserwuje się spadek parametru uporządkowania oraz wzrost częstotliwości rotacyjnej. Jak wykazał Autor, w nanodyskach zawierających DMPC powyżej 310K szybkość rotacyjna lipidów w dwuwarstwie była znacznie wyższa niż lipidów granicznych. Podobny efekt był obserwowany w tej samej temperaturze dla nanodysków utworzonych z POPC. Dodatkowo w wyższych temperaturach lipidy części centralnej

nanodysków przechodziły z fazy żelowej do fazy ciekłej uporządkowanej z powodu wysokiego ciśnienia lateralnego wywołanego obecnością białka MSP1.

Przeprowadzona analiza dwuwarstw lipidowych DMPC poniżej przejścia fazowego wykazała różnice w uporządkowaniu w porównaniu z obserwowanymi powyżej T_m. Obliczone wartości parametru uporządkowania (S_{mol}) sond 5-PC i 16-PC były niższe w nanodyskach niż liposomach, co wskazuje, że część lipidów znajduje się w stanie mniejszego uporządkowania (nie występuje w fazie żelu). Natomiast wyższą wartość tego parametru otrzymano dla sondy 10-PC, co jak wyjaśnia Autor, najprawdopodobniej spowodowane było wyższym ciśnieniem lateralnym na tej głębokości związanym z obecnością białka MSP1, co zostało potwierdzone niższą częstotliwością rotacyjną (R) dla sond 10-PC i 12-PC.

Powyżej temperatury przejścia fazowego białka MSP1 porządkowały strukturę dwuwarstwy. Wpływ ten był mniejszy lub porównywalny dla nanodysków zawierających MSP1E3D1 w porównaniu z nanodyskami MSP1D1, co związane jest wielkością nanodysków. Podobny efekt był również obserwowany w przypadku określonej hydrofobowości dwuwarstw lipidowych.

Autor ocenił również wpływ ładunku w cząsteczkach lipidów na strukturę nanodysków. Dwuwarstwy utworzone z lipidów POPC/POPG zawierające ujemnie naładowaną głowę polarną nie wpływały w większym stopniu na mobilność sond w rejonie łańcuchów węglowodorowych. Obserwowano natomiast szybszą rotację sondy T-PC w temperaturze 310K, co Autor tłumaczy niższym ciśnieniem lateralnym w części polarnej spowodowanej odpychaniem się głów polarnych POPG.

W dalszej części pracy Autor określił wpływ cholesterolu oraz jego estru z kwasem bursztynowym na badane układy. Porządkujący wpływ steroli na dwuwarstwy lipidowe Autor określił na podstawie czasów życia sondy fluorescencyjnej n-dibutylopochodnej naftalenu z kationem pirydyniowym (di-nANEPPDHQ) lokującej się prostopadle do powierzchni dwuwarstwy lipidowej. Wstępne badania z zastosowaniem tej sondy wykazały wzrost uporządkowania lipidów w nanodyskach przez CHS. Mimo, że sterole porządkują dwuwarstwy lipidowe to wpływ cholesterolu był większy niż jego estru, co prawdopodobnie spowodowane jest inną jego lokalizacją, głębiej położoną. Znaczne różnice między wpływem obu steroli obserwowano w temperaturze 293K stosując sondę T-PC. Jednak więcej informacji na temat różnic między sterolami uzyskano dzięki symulacjom widmowym części polarnej oraz w głębszych rejonach dwuwarstwy lipidowej. CHS powodował wzrost uporządkowania lipidów w sąsiedztwie głów polarnych oraz na wszystkich głębokościach

dwuwarstwy w porównaniu z nanodyskami nie zawierającymi tego sterolu. Ester cholesterylu prowadził również do wzrostu bariery hydrofobowej w porównaniu z nanodyskami pozbawionymi CHS.

Na tle wyników uzyskanych w rozprawie Autor uwzględnił zastosowanie nanodysków w badaniach białek błonowych. Wysokie ciśnienie lateralne wpływające na uporządkowanie łańcuchów węglowodorowych w dwuwarstwie lipidowej może również wpływać na aktywność białek błonowych w niej zanurzonych dotyczy to szczególnie jej centralnej części.

Jak wykazał Autor, wpływ białka MSP1 oraz CHS na strukturę dwuwarstwy jest sumaryczny, co powoduje silne upakowanie oraz wzrost ciśnienia lateralnego. Może to wpływać na funkcjonalność białek do niej wprowadzonych.

Praca mgr Piotra Stępnia wnosi nowe, istotne informacje związane z dynamiką dwuwarstwy lipidowej w nanodyskach, uporządkownia łańcuchów węglowodorowych oraz oddziaływań z białkami MSP1. Oprócz przeprowadzonych badań doświadczalnych, Autor dokonał również analizy metodą symulacji widm EPR otrzymując spójne wyniki. Wprowadzenie białek okalających dwuwarstwę prowadziło do wzrostu uporządkowania lipidów w głębszych rejonach, co było związane z wyższym ciśnieniem lateralnym. Ponieważ, doświadczalny pomiar parametru uporządkowania daje uśrednione informacje na temat uporządkowania łańcuchów węglowodorowych zastosowanie symulacji widm umożliwiło określenie szybkości rotacji sondy spinowej oraz zawad sterycznych wpływających na jej mobilność. W błonach utworzonych z POPC Autor obserwował obniżenie dyfuzji rotacyjnej sond 10-PC oraz 12-PC, co potwierdzało najwyższe ciśnienie lateralne na tej głębokości dwuwarstwy lipidowej. W przypadku nanodysków utworzonych DMPC efekt ten był widoczny dla sondy 12-DS, co Autor próbuje wyjaśnić krótszą długością łańcuchów węglowodorowych w tym lipidzie i w związku z tym, inną lokalizacją względem białek MSP1 okalających dwuwarstwę. Wzrost stopnia upakowania lipidów był również widoczny w przypadku sondy T-PC. Wyznaczona bariera hydrofobowości była wyższa dla nanodysków niż liposomów, co Autor tłumaczy spadkiem zawartości wody, w tym rejonie dwuwarstwy i ciaśniejszym upakowaniem łańcuchów węglowodorowych. Stosując sondę 16-PC, wykazał, że w najgłębszym rejonie dwuwarstwy ruch sondy w nanodyskach staje się bardziej anizotropowy niż w liposomach, co potwierdził dokonując pomiaru rozkładu prawdopodobieństwa przyjmowania przez nią różnych kątów w czasie rotacji. Obecność białka MSP1 wywołuje ciśnienie lateralne, które wpływa na ruchliwość lipidów. Dla lipidów

znajdujących się w pobliżu białka wpływ ten jest największy, prowadząc do spadku ich mobilności. O ile w najgłębszym rejonie dwuwarstwy występuje najwyższe upakowanie łańcuchów węglowodorowych, o tyle w pobliżu powierzchni było ono najmniejsze. Utworzone nanodyski charakteryzowały się wyższym uporządkowaniem dwuwarstwy w rejonie głębszym i niższym w przy powierzchni w porównaniu z liposomami, co Autor wyjaśnia wzrostem uwodnienia tego rejonu. Obliczony rozkład prawdopodobieństwa przyjmowanych kątów przez sondę T-PC wykazał większą amplitudę ruchu wahadłowego w stosunku do normalnej do powierzchni dwuwarstwy. Anizotropia ruchu sondy w liposomach była znacznie niższa niż w nanodyskach. Wzrost temperatury znosił ją w większym stopniu w liposomach w porównaniu z nanodyskami .

Dodatkowo Autor przedstawił model nanodysku otrzymanego w wyniku symulacji molekularnej oraz wyników doświadczalnych. Otrzymane rezultaty zostały poddane konfrontacji z uzyskanymi przez innych badaczy stosujących inne techniki badawcze,

w umiejętnie przeprowadzonej dyskusji.

Podsumowaniem wyników są liczne wnioski, jakie wyciągnął Autor z przeprowadzonych badań wynikające z głównego i dodatkowego celu pracy doktorskiej. Rozprawa doktorska ma układ klasyczny, jest napisana i zredagowana bardzo starannie, choć pojawiają się czasami drobne nieścisłości, o których poinformowałem Autora.

Chciałbym również dodać, że badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy były współfinansowane przez Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego –partnera Konsorcjum, które uzyskało status Krajowego Ośrodka Wiodącego (Know).

Mgr Piotr Stępień jest współautorem dwóch prac opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej: Piotr Stepien, Agnieszka Polit, Anna Wisniewska-Becker, Comparative EPR studies on lipid bilayer properties in nanodiscs and liposomes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1848, Part A, 2015, 60–66 oraz Skrobecki, Chmielińska, Bonarek, Stepien, Wisniewska-Becker, Dziedzicka-Wasylewska, and Polit, Sulpiride, Amisulpride, Thioridazine, and Olanzapine: Interaction with Model Membranes. Thermodynamic and Structural Aspects. ACS Chemical Neuroscience, 2017, *8*, 1543–1553.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem uważam, że rozprawa doktorska mgr Piotra Stępnia spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim określonym w art. 11 ustawy

o tytułach i stopniach naukowych (Dz. Ust. Nr 65/90, poz 386) dla rozprawy na stopień doktora. Pracę oceniam bardzo wysoko, ponieważ stanowi ona samodzielne i oryginalne opracowanie oraz rozwiązanie postawionych celów badań oraz wnosi nowe ważne informacje min. o dynamice lipidów w nanodyskach zawierających białka MSP1. Ponadto wskazuje na duży wkład pracy, Jego dużą wiedzę teoretyczną, umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych, co również jest niewątpliwą zasługą promotora, Pani dr hab. Anny Wiśniewskiej-Becker.

W oparciu o przedstawioną ocenę pracy, jej wysoki poziom metodyczny i merytoryczny oraz wartość ze względu na tematykę badań, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Piotra Stępnia do dalszych etapów przewodu doktorskiego, wnioskując o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą JM Rektora UJ.

Łódź, 13 listopada 2017 r.

Krzysztof Gwoździński