



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Prof. dr hab. Sławomir Sęk
Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii,
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych UW
ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa
tel: +48 22 552 6661
e-mail: slasek@chem.uw.edu.pl

Warszawa, 07-09-2021

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marty Majewskiej
pt. „Electrochemical, spectroscopic and atomic force microscopy studies of mechanisms
of antimicrobial peptides interactions with model biological membranes”**

Praca doktorska mgr inż. Marty Majewskiej została zrealizowana w ramach Międzynarodowych Studiów Doktoranckich w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk pod kierownictwem prof. dr hab. Włodzimierza Kutnera oraz dr Piotra Pięty. W swojej pracy doktorantka skupiła się na zagadnieniach związanych z charakterystyką fizykochemiczną dwuwarstw lipidowych i wykorzystała je jako platformy testowe do weryfikacji mechanizmów działania dwóch peptydów antybiotykowych o charakterze membranolitycznym. Ponadto przebadła wpływ wybranych nitrofenoli, stanowiących toksyczne składniki cząstek zawieszonych w zanieczyszczonym powietrzu na strukturę biomimetycznych membran lipidowych. Tematyka przedstawionej do recenzji pracy jest bardzo interesująca i niewątpliwie aktualna w szerokim kontekście ochrony zdrowia, w szczególności w odniesieniu do rosnących potrzeb poszukiwania nowych związków antybiotykowych, których wykorzystanie nie skutkowałoby lekoopornością bakterii. Praca ma zatem istotny wymiar interdyscyplinarny.

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim i obejmuje łącznie 147 stron (nie licząc objaśnień, spisu rysunków, spisu osiągnięć etc.). Została ona podzielona na cztery części, gdzie pierwsza obejmuje wprowadzenie literaturowe, druga odnosi się do zastosowanych materiałów, procedur eksperymentalnych oraz technik instrumentalnych, trzecia część zawiera szczegółowe omówienie i interpretację uzyskanych wyników, a czwarta, zamykająca rozprawę obejmuje zwięzłe podsumowanie oraz perspektywę możliwości

dalszych badań. Literatura została bardzo dobrze dobrana z uwzględnieniem najważniejszych publikacji w omawianej tematyce, jednocześnie nie pominięto tych najbardziej aktualnych. Warto podkreślić, że praca jest bardzo czytelna i starannie przygotowana od strony edytorskiej. Na początku rozprawy zamieszczono przegląd literaturowy, który w mojej opinii dostarcza czytelnikowi bardzo dobre i przejrzyste wprowadzenie w zagadnienia badawcze będące przedmiotem pracy, a jednocześnie pokazuje, że Autorka doskonale zgłębiła podjętą tematykę. Kolejno omówiono strukturę oraz właściwościami peptydów antybiotykowych, jak również opisano znane z literatury mechanizmy ich działania na membrany lipidowe. W dalszej części Autorka pracy skupiła się na membranach biologicznych. Opisano budowę cząsteczek lipidów oraz możliwe struktury różnorodnych faz lipidowych. W kolejnych rozdziałach składających się na część literaturową, Autorka przedstawiła biomimetyczne modele membran ze szczególnym uwzględnieniem układów planarnych formowanych na stałych podłożach. W tej części znajdujemy również opis metod przygotowywania tego typu układów oraz zwięzły przegląd dotychczasowego stanu wiedzy w odniesieniu do fizykochemicznej charakterystyki biomimetycznych membran lipidowych osadzonych na stałym podłożu. W kolejnym rozdziale przedstawiono przegląd literatury dotyczącej badania oddziaływań peptyd-membrana lipidowa. Ze względu na pokaźną liczbę prac w tym zakresie, Autorka ograniczyła się do konkretnego przykładu - katelicydyny LL-37, która była przedmiotem jej badań eksperymentalnych. Tę część pracy zamyka rozdział opisujący cel i motywację dla podjętych badań. W tym miejscu warto nadmienić, że część literaturowa została przedstawiona w bardzo przejrzysty i uporządkowany sposób.

W kolejnej części rozprawy przedstawiono opis wykorzystywanych w badaniach materiałów, procedur eksperymentalnych oraz wykorzystywanych technik instrumentalnych. W tym ostatnim przypadku warto zwrócić uwagę na niesłychanie informatywny opis w szczególności w odniesieniu do techniki PM IRRAS, gdzie w przejrzysty sposób zaprezentowano metodę optymalizacji warunków pomiarowych, korekcję widm oraz metodykę wyznaczania orientacji cząsteczek zaadsorbowanych na stałym podłożu. Warto zaznaczyć, że omawiany rozdział pozwala doskonale zrozumieć i odtworzyć warunki eksperymentalne również w przypadku pozostałych stosowanych w pracy technik instrumentalnych.

W następnej części pracy zaprezentowano wyniki badań, które omówiono w czterech sekcjach. Pierwsza z nich dotyczy topograficznej i nanomechanicznej charakterystyki osadzonej na micy dwuwarstwy DMPC w fazie P_{β} , której formowanie indukowane jest

obecnością tris(hydroksymetylo)aminometanu. Efekt ten jest znany z dostępnej literatury (patrz przykładowo: Mou et al. *Biochemistry* 1994, 33, 15, 4439–4443. Należy jednak podkreślić, że istotnym elementem nowości jest zaobserwowanie tej fazy w przypadku pojedynczej dwuwarstwy osadzonej na powierzchni stałego substratu. Jak dotąd obecność fazy P_{β} była odnotowywana tylko w przypadku wielowarstw. Co więcej, w przedstawionej do recenzji rozprawie opisano po raz pierwszy szczegółową analizę właściwości nanomechanicznych membrany DMPC w fazie P_{β} , wykazując w jej obrębie zróżnicowanie wartości modułu Younga potwierdzające obecność lipidów zarówno w fazie ciekłej, jak i żelowej. W drugiej sekcji omówiono wyniki badań odnoszące się do mechanizmu działania bakteriocyny BacSp222 na biomimetyczną membranę lipidową, ze szczególnym uwzględnieniem zmian konformacyjnych peptydu wynikających z oddziaływania z dwuwarstwą. Przedstawione rezultaty są bardzo interesujące i pokazują nietypowe zachowanie bakteriocyny w porównaniu do większości peptydów antybiotykowych. W przeciwieństwie do tych ostatnich peptyd BacSp222 nie ulega zmianom konformacyjnym w wyniku oddziaływania z membraną lipidową, a jego działanie skutkuje zmianami w orientacji i konformacji łańcuchów acylowych lipidów. Dodatkowo, obrazowanie AFM ujawniło membranolityczne działanie peptydu oraz możliwość formowania porów, co pokazuje, że spektrum działania bakteriocyn może być szersze niż wynika to z dostępnej literatury. W pracy zaprezentowano również po raz pierwszy w jaki sposób bakteriocyna ulega zmianom orientacji w dwuwarstwie pod wpływem zmian pola elektrycznego. Zaobserwowano, że w przypadku znacząco ujemnych potencjałów peptyd zmienia orientację i ulega stopniowym zmianom w strukturze drugorzędowej, co może być efektem zmian w stopniu hydratacji lipidów. W trzeciej sekcji omawianego rozdziału zaprezentowano efekt działania wybranych nitrofenoli na strukturę oraz stabilność syntetycznych membran składających się z lipidów występujących w płucach. W tym miejscu z pewnością należy docenić nowatorskie podejście do problemu, albowiem tego typu strategia testowania efektów oddziaływania substancji toksycznych zawartych w powietrzu nie była jak dotąd opisana w literaturze. Wnioski płynące z badań opisanych w rozprawie są dość jednoznaczne i wskazują na możliwość przenikania nitrofenoli przez membrany lipidowe z jednoczesnym zaburzeniem ich struktury oraz właściwości nanomechanicznych. Wreszcie czwarta sekcja rozdziału eksperymentalnego przedstawia opis wyników badań nad oddziaływaniem katelicydiny LL-37 z biomimetyczną membraną o składzie odzwierciedlającym błonę bakterii. Doktorantka bardzo umiejętnie wykorzystała kombinację technik elektrochemicznych, spektroskopowych oraz obrazowanie AFM, wykazując, że dość powszechnie zakładany dla peptydu LL-37 mechanizm

formowania porów jest wątpliwy. Bardziej prawdopodobnym mechanizmem działania peptydu wydaje się być model dywanowy, gdzie peptyd kumuluje się na powierzchni membrany, a w efekcie po przekroczeniu pewnego krytycznego stężenia powierzchniowego dochodzi do dezintegracji filmu lipidowego.

W ostatniej części pracy zestawiono najważniejsze wnioski oraz zwięźle przedstawiono perspektywę dalszych badań. Ogólnie praca jest na bardzo wysokim poziomie zarówno od strony technicznej, jak i merytorycznej. Po lekturze całej rozprawy nasuwa się jednak kilka uwag oraz pytań, do których warto byłoby się ustosunkować. Poniżej zostały one szczegółowo wypunktowane:

- W rozdziale dotyczącym membran biologicznych oraz modelowych na stronie 7 opisany został podział fosfolipidów, gdzie między innymi czytamy, że polarne grupy glicerofosfolipidów zawierają cholinę połączoną przez grupę fosforanową do glicerolu. Cholina nie jest jedyną możliwością w przypadku tej klasy związków, czego przykładem są choćby przedstawione na rysunku 1.3-1 struktury obejmujące etanoloaminę, glicerol, serynę czy też inozytol.
- Na rysunku 1.3-3 nie wymieniono panelu (g), choć opis znajdującej się tam struktury widnieje pod ilustracją.
- Rozdział 1.4.2. zatytułowany został „Small unilamellar vesicles fusion”. Warto zwrócić uwagę, że fuzja jest tylko jednym z etapów całego procesu osadzania dwuwarstwy lipidowej poprzez rozkładanie liposomów. Niemniej jednak, termin „fusion” rzeczywiście pojawia się dość powszechnie w literaturze w odniesieniu do całego procesu formowania dwuwarstwy lipidowej tą metodą.
- Na stronie 62 w odniesieniu do równania 2.2.3-11 brakuje objaśnienia czym jest kąt $\theta_{C=O}$.
- Na stronie 70, Autorka stwierdza, że podjęte badania mają na celu rozszerzenie wiedzy na temat właściwości fizycznych dwuwarstwy DMPC w fazie P_{β} w warunkach fizjologicznych. To stwierdzenie wydaje się być nieco niezrozumiałe, ponieważ zachowanie takich warunków wymagałoby raczej wykonania eksperymentów w temperaturze 37 °C, podczas gdy faza P_{β} występuje w temperaturach niższych o przynajmniej 15 °C.
- Na tej samej stronie mowa jest o fazie L_{β} , która charakteryzuje się uporządkowaniem łańcuchów acylowych i maksymalnym ich nachyleniem względem normalnej do

powierzchni dwuwarstwy. Skoro nachylenie jest maksymalne, to oznaczałoby to kąt bliski 90° . Zatem bardziej zasadne byłoby mówić o minimalnym nachyleniu względem normalnej do powierzchni.

- Na stronie 71 przedstawiono skład buforów stosowanych podczas obrazowania dwuwarstwy DMPC. Jaką rolę w przypadku buforu (a) odgrywa EDTA?
- Na stronie 72 przedstawiono wyniki pomiaru grubości filmu lipidowego DMPC osadzonego na powierzchni miki, która wynosi około ~ 6 nm w obszarach topograficznie niższych, do ~ 9 nm w obszarach topograficznie wyższych. Obydwie wartości przekraczają podwojoną długość cząsteczki DMPC, skąd zatem pewność, że rzeczywiście mamy do czynienia z pojedynczą dwuwarstwą?
- Na stronie 74 Autorka opisuje zanik pofałdowanej struktury dwuwarstwy DMPC. Nasuwa się tutaj pytanie, czy efekt ten nie może być związany ze stopniowym wzrostem siły jonowej roztworu w wyniku parowania wody w ciągu 6-8 h obrazowania?
- Na stronie 87 znajdujemy opis kątów nachylenia łańcuchów acylowych lipidów które wynoszą odpowiednio 37° w nieobecności oraz 23° w obecności peptydu BacSp222. Dane przedstawione na rysunku 3.2-6 wskazują jednak, że sytuacja jest odwrotna, tj. obecność peptydu powoduje zwiększenie nachylenia łańcuchów. Wspomniana wyżej nieścisłość jest powielona również we wnioskach w rozdziale 3.2.6 (strona 96), gdzie autorka stwierdza, że łańcuchy są mniej nachylone względem normalnej do powierzchni w obecności peptydu.
- Rysunek 3.3-2 przedstawia voltamperogramy cykliczne zarejestrowane na elektrodach złotych zmodyfikowanych modelowymi membranami lipidowymi. Od czego pochodzi słaby sygnał zlokalizowany przy potencjale około -0.25 V?
- Rysunek 3.3-3 prezentuje widma impedancyjne zarejestrowane dla elektrod złotych zmodyfikowanych membranami lipidowymi przed i po 20 h inkubacji w roztworze mieszaniny nitrofenoli. Czy w tym przypadku wykonano pomiar kontrolny po 20 h w nieobecności nitrofenoli celem oceny stabilności warstwy?
- Na stronie 110, znajdujemy opis zmian właściwości mechanicznych dwuwarstwy DMPC przed i po ekspozycji na działanie nitrofenoli. Zaobserwowano wyraźny spadek wartości modułu Younga z około 32 MPa do około 13 MPa. Obydwie wartości są jednak znacznie wyższe od modułu Younga wyznaczonego dla gładkiej dwuwarstwy DMPC opisanej w rozdziale 3.1.3. Wspomniany moduł wynosił w

tamtym przypadku ~ 1.5 MPa. Z czego wynika taka rozbieżność? Czy przed eksperymentem wykonywano pomiary kalibracyjne przykładowo na próbkach PDMS?

- W przypadku badań peptydu LL-37 zaobserwowano, że jego oddziaływanie z modelowymi filmami lipidowymi unieruchomionymi na powierzchni elektrod skutkuje zmianami pojemności (strona 115). Autorka słusznie zauważa, że może być to wynikiem zmian właściwości dielektrycznych membrany oraz zmian jej grubości. Można oczekiwać, że obecność peptydu w dwuwarstwie przyczyni się do zwiększenia jego efektywnej stałej dielektrycznej, a jednocześnie może spowodować zmniejszenie grubości membrany lipidowej. Warto byłoby przedyskutować, czy obserwowane zmiany pojemności potwierdzają lub zaprzeczają takiemu scenariuszowi.
- Na stronie 117 przedstawiono między innymi wyniki obrazowania AFM modelowej membrany lipidowej składającej się z mieszaniny fosfatydylocholin oraz fosfatydylogliceroli. W obrębie dwuwarstwy wyróżniono trzy rodzaje domen o odmiennej grubości. Odpowiednio domeny o największej grubości ~ 5.7 nm przypisano do ciekłego układu POPC/POPG, pośredniej grubości ~ 4 nm do układu w fazie żelowej DPPC/DPPG, a te o najmniejszej grubości ~ 3.4 nm do układu w fazie żelowej DMPC/DMPG. Nie do końca jest zrozumiałe, dlaczego najbardziej ciekły układ, a zatem charakteryzujący się największym stopniem nieuporządkowania został przypisany do najgrubszej domeny. Można by oczekiwać, że grubsze obszary membrany będą zdominowane przez długie nasycone lipidy w fazie żelowej, czyli w tym przypadku byłby to układ DPPC/DPPG. Warto przedstawić jakimi kryteriami kierowała się Autorka pracy identyfikując poszczególne domeny.
- Na stronie 126 znajduje się opis elektrochemicznej charakterystyki membran lipidowych poddanych działaniu peptydu LL-37. Dowiadujemy się, że oddziaływanie peptydu z dwuwarstwą lipidową wymusza zmianę kąta nachylenia lipidów od około 23° do wartości bliskich 50° (względem normalnej do płaszczyzny membrany). Opisane wyniki zostały zinterpretowane jako charakterystyczne dla tzw. modelu dywanowego, gdzie cząsteczki peptydu płasko adsorbują się na powierzchni membrany. Autorka w tym miejscu słusznie zauważa, że zwiększenie kąta nachylenia cząsteczek wpływa na grubość warstwy. Potwierdzają to obserwacje AFM, gdzie grubość warstwy maleje w obecności LL-37. Jednak niejasne jest stwierdzenie, że taka zmiana tłumaczy zmniejszenie pojemności membrany obserwowane w pomiarach impedancyjnych. Jeśli przyjmiemy prosty model, gdzie membrana stanowi materiał

dielektryczny oddzielający dwie okładki płaskiego kondensatora, to odległość pomiędzy okładkami będzie zdefiniowana grubością dwuwarstwy lipidowej. Zwiększenie kąta nachylenia względem normalnej do powierzchni powoduje zmniejszenie grubości warstwy, a zatem odległość pomiędzy okładkami kondensatora będzie mniejsza. W efekcie pojemność powinna rosnąć, ponieważ jest ona odwrotnie proporcjonalna do odległości pomiędzy okładkami. Innymi słowy nie wpisuje się to w przedstawioną interpretację. Dodatkowo, jeżeli zgodnie z modelem dywanowym na membranie znajdują się cząsteczki peptydu, to one również mogą wpływać po pierwsze na grubość filmu na elektrodzie, a po drugie na wartość efektywnej stałej dielektrycznej warstwy, co również będzie przekładało się na mierzoną pojemność. Innymi słowy warto zrewidować przedstawioną w pracy interpretację.

Chciałbym jednak podkreślić, że przedstawione powyżej uwagi oraz pytania mają na celu jedynie doprecyzowanie bądź uściślenie pewnych kwestii i w żaden sposób nie wpływają na moją jednoznacznie pozytywną ocenę przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. W tym miejscu warto również podkreślić dotychczasowe osiągnięcia naukowe mgr inż. Marty Majewskiej, które oceniam jako zdecydowanie wyróżniające na tym etapie kariery naukowej. Na jej dorobek publikacyjny składa się 10 prac w cenionych międzynarodowych periodykach naukowych takich, jak *Bioelectrochemistry*, *Chemosphere*, czy też *Analytical Chemistry*. Co więcej, Doktorantka jest współautorką trzech zgłoszeń patentowych. Równie dobre wrażenie robi dorobek konferencyjny obejmujący 7 konferencji międzynarodowych, gdzie na dwóch Doktorantka wygłaszała ustne referaty. Bez wątpienia jest to przejaw dużej aktywności w zakresie upowszechniania swoich wyników badań.

Podsumowując, w mojej opinii przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest na wysokim poziomie naukowym i zawiera bardzo wartościowe wyniki badań. Pracę oceniam zdecydowanie pozytywnie i stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65/2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Marty Majewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również o wyróżnienie pracy mgr inż. Marty Majewskiej. Uzasadnieniem jest znaczenie i jakość zaprezentowanych w rozprawie wyników oraz bardzo dobry dorobek Doktorantki. Bardziej szczegółowo, mój wniosek umotywowany jest następującymi faktami:

- w przedstawionej do recenzji pracy po raz pierwszy opisano układ pojedynczej dwuwarstwy lipidowej występującej w fazie P_{β} , oraz szczegółowo scharakteryzowano jej właściwości nanomechaniczne.

- w pracy przedstawiono nowatorskie podejście do zagadnienia badania oddziaływań toksycznych związków zawartych w powietrzu z membranami lipidowymi.

- opisano mechanizm membranolytycznego działania katelicyny LL-37 na membrany lipidowe o składzie odzwierciedlającym błonę bakterii. W przeciwieństwie do często podpartych poszlakami doniesień literaturowych, wspomniany mechanizm nie opiera się na działaniu porotwórczym, ale raczej na dezintegracji błony według modelu dywanowego.

- wykazano nietypowe zachowanie peptydu antybiotykowego BacSp222, który w przeciwieństwie do większości tego typu peptydów nie podlega zmianom konformacyjnym w wyniku oddziaływania z membraną lipidową, ulega jednak reorientacji w zależności od natężenia zewnętrznego pola elektrycznego.

Podsumowując, badanie struktury oraz powiązanych właściwości biomimetycznych filmów lipidowych umożliwia lepsze zrozumienie mechanizmów funkcjonowania błon komórkowych. Ponadto, charakterystyka oddziaływań membran lipidowych z membranolytycznymi peptydami pozwala na poznanie mechanizmów przeciwbakteryjnego działania tego typu związków. Uzyskane wyniki mają zatem istotne znaczenie zarówno z punktu widzenia fizykochemii procesów membranowych, jak również biologii oraz badań z zakresu medycyny.