

*Amfipatyczne cząsteczki origami DNA jako narzędzia do
badań procesów zachodzących na powierzchniach błon
biologicznych*

Dr Aleksander Czogalla

Uniwersytet Wrocławski

Wydział Biotechnologii

Autoreferat (załącznik 2)

Wrocław, 2016

I. Imię i nazwisko

Aleksander Czogalla

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

1. doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii, Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, 2007, tytuł rozprawy doktorskiej: Badania strukturalne domeny wiązania lipidów erythrocytarnej spektryny beta metodą ukierunkowanego znakowania spinowego, promotor: prof. dr hab. Aleksander F. Sikorski
2. magister biotechnologii (w zakresie biologii molekularnej), Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego, 2003, promotor: prof. dr hab. Aleksander F. Sikorski

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1. od 01.03.2010: adiunkt, Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego
2. 01.05.2013 – 31.08.2014: staż podoktorski, Paul Langerhans Institute Dresden, University Hospital Carl Gustav Carus of TU Dresden, Dresden, Niemcy
3. 01.12.2010 – 30.04.2013: staż podoktorski, Biotechnology Center of the TU Dresden (BIOTEC), Dresden, Niemcy
4. 10.04.2007 – 28.02.2010: technolog, Przedsiębiorstwo Produkcji Farmaceutycznej HASCO-LEK S.A. / Centrum Badawczo-Rozwojowe NOVASOME Sp. z o.o. we Wrocławiu

- IV. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 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, poz. 595 ze zm.)

A) Tytuł osiągnięcia naukowego

Amfipatyczne cząsteczki origami DNA jako narzędzia do badań procesów zachodzących na powierzchniach błon biologicznych

Powyższe osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu publikacji wymienionych poniżej. Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zawarte są w Załączniku 4, a oświadczenia współautorów publikacji stanowią Załącznik 5.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Czogalla A**, Petrov EP, Kauert DJ, Uzunova V, Zhang Y, Seidel R, Schwille P. 2013. *Switchable domain partitioning and diffusion of DNA origami rods on membranes*. Faraday Discussions. 161. 31-43. discussion 113-150
[IF₂₀₁₃ = 4,194] [punkty MNiSW = 35]
2. **Czogalla A**, Kauert DJ, Seidel R, Schwille P, Petrov EP. 2015. *DNA origami nanoneedles on freestanding lipid membranes as a tool to observe isotropic-nematic transition in two dimensions*. Nano Letters. 15. 649-655.
[IF₂₀₁₄ = 13,592] [punkty MNiSW = 45]
3. **Czogalla A**, Kauert DJ, Franquelim HG, Uzunova V, Zhang Y, Seidel R, Schwille P. 2015. *Amphipathic DNA origami nanoparticles to scaffold and deform lipid membrane vesicles*. Angewandte Chemie International Edition. 54. 6501-6505.
[IF₂₀₁₄ = 11,261] [punkty MNiSW = 45]

4. **Czogalla A***, Franquelim HG, Schwille P. 2016. *DNA nanostructures on membranes as tools for synthetic biology*. Biophysical Journal. 110. 1698-1707.

[IF₂₀₁₄ = 3,972] [punkty MNiSW = 35]

* - autor korespondencyjny

- c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania. Odnośniki do prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zostały wyróżnione pogrubioną czcionką i znakiem (*)

Błony biologiczne są niezbędnymi elementami każdej żywej komórki. Wynika to nie tylko z ich roli jako selektywnie przepuszczalnych struktur oddzielających wnętrze komórki od środowiska i zapewniających właściwą organizację strukturalną i funkcjonalną na poziomie subkomórkowym, ale także z ich udziału w wielu fundamentalnych procesach życiowych, takich jak konwersja energii, przekazywanie sygnału, selektywny transport i kształtowanie wyspecjalizowanych kompartmentów błonowych. Chociaż właściwości fizykochemiczne błon komórkowych w przeważającej mierze determinowane są przez tworzące je lipidy, to jednak za przebieg wspomnianych procesów biologicznych odpowiadają w dużej mierze integralne i peryferyjne białka błonowe. Mechanizm działania poszczególnych elementów błonowych oraz ich wzajemne oddziaływania są w ostatnich latach przedmiotem bardzo intensywnych badań. W tym kontekście szczególne znaczenie ma podejście eksperymentalne polegające na rekonstrukcji poszczególnych białek lub kompleksów białkowych w modelowych systemach błonowych (1). Strategia ta pozwala zmniejszyć stopień komplikacji badanego układu, co idzie w parze z możliwością precyzyjniejszej kontroli parametrów podczas eksperymentu. Ponadto, możliwym staje się zdefiniowanie zestawu cech strukturalnych i funkcjonalnych badanego układu, niezbędnych do odtworzenia poszczególnych procesów komórkowych. Jednak często napotykanym problemem przy próbach zastosowania tej strategii jest brak możliwości uzyskania odpowiednich ilości białek błonowych o stabilnej strukturze i zachowanej funkcjonalności, a także problemy z utrzymaniem ich natywnego stanu w trakcie eksperymentu. Potencjalnym rozwiązaniem jest zastosowanie syntetycznych cząsteczek obdarzonych cechami strukturalnymi i funkcjonalnymi białek

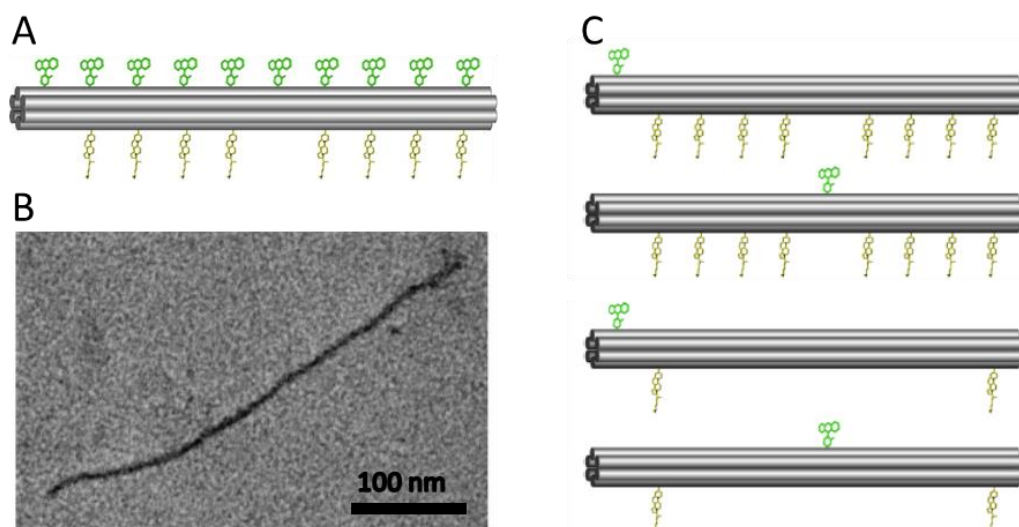
uczestniczących w danym procesie życiowym. Co więcej, taka strategia pozwala wyjść poza ograniczenia narzucone przez układy naturalne i umożliwia poznanie mechanizmów omawianych procesów w bardziej uniwersalnym ujęciu. Takie możliwości otwiera technika origami DNA (2), której innowacyjność polega na wykorzystaniu kwasów nukleinowych jako materiału do tworzenia dwu- i trójwymiarowych obiektów w nanometrowej skali (3). Tworzenie takich nanostruktur polega na łączeniu ze sobą ściśle określonych odcinków długiej cząsteczki jednoniciowego DNA za pomocą zestawu krótkich oligonukleotydów (4). Nici DNA hybrydują ze sobą zgodnie z komplementarnością ich sekwencji odtwarzając lokalnie podwójną nić o konformacji helikalnej. Pojedyncze oligonukleotydy mogą wiązać się do kilku odcinków długiej cząsteczki DNA, co w rezultacie prowadzi do utworzenia regularnej matrycy równoległych helis cechującej się zwiększoną sztywnością swej struktury. Wprowadzenie insercji lub delecji w sekwencji oligonukleotydów pozwala uzyskać struktury o zadanej krzywiznie bądź skręceniu wzdłuż pęczka helis (5). Ponadto, pojedyncze struktury origami DNA mogą być w sposób hierarchiczny łączone ze sobą za pośrednictwem oligonukleotydów hybrydujących z kilkoma dużymi cząsteczkami jednoniciowego DNA (3, 6). W konsekwencji technika origami DNA pozwala na niemal nieograniczone możliwości kształtowania cząsteczek. Ogromny potencjał niesie ze sobą także możliwość przyłączania do poszczególnych oligonukleotydów różnorodnych grup funkcyjnych bądź strukturalnych, dzięki czemu elementy te można rozlokować na przestrzeni cząsteczki z nanometrową precyzją (7). Dzięki temu możliwe jest konstruowanie molekuł obdarzonych niemal dowolnym zestawem cech strukturalnych i funkcyjnych (8) a także tworzenie rusztowań molekularnych mających bardzo szerokie spektrum zastosowań, m.in. jako molekuł funkcyjnych i strukturalnych w biologii (9), w organizacji przestrzennej wieloskładnikowych kompleksów białkowych (10), w badaniach reakcji chemicznych na poziomie pojedynczych cząsteczek (11) oraz w tworzeniu wyrafinowanych nośników substancji leczniczych (12).

W ramach przedstawionego osiągnięcia naukowego podjąłem się próby zastosowania technologii origami DNA w badaniach biofizycznych zjawisk zachodzących na powierzchni błon biologicznych. Potrzeba ta wynikała z ograniczeń współczesnej metodologii tego typu badań, co ma odzwierciedlenie w niedoborach wiedzy w tej dziedzinie. Przykładem mogą być wciąż nie do końca wyjaśnione

mechanizmy działania białek zakrzywiających dwuwarstwę lipidową, takich jak białka z rodziny BAR/F-BAR, w szczególności inicjacja ich oligomeryzacji oraz tworzenie funkcjonalnego rusztowania na powierzchni błony. Badania nad białkami w sztucznych systemach błonowych nie pozwalają zgłębić wszystkich aspektów tych procesów ze względu na ograniczone możliwości manipulacji pojedynczymi molekułami. Przewaga DNA jako materiału strukturalnego wynika przede wszystkim z mniejszej komplikacji struktury pierwszorzędowej, w porównaniu do białek, co czyni proces projektowania molekuł prostszym i bardziej przewidywalnym. Duże znaczenie w tym kontekście ma też stabilność pojedynczych nici DNA jak również ściśle kontrolowalna stabilność dupleksów. Podejście origami DNA otwiera nowe możliwości, gdyż umożliwia nie tylko selektywną funkcjonalizację cząsteczek o arbitralnym kształcie, ale pozwala także w precyzyjny sposób umieszczać znaczniki molekularne w obrębie molekuły, co ma bardzo duże znaczenie w analizie na poziomie pojedynczych molekuł.

Standardowo, cząsteczki DNA mogą oddziaływać z błonami biologicznymi tylko w określonych warunkach. Sytuacja taka ma miejsce jeśli dwuwarstwa lipidowa wzbogacona jest w lipidy kationowe, takie jak DOTAP (13), które jednak z reguły nie występują w naturalnych błonach. Do stabilnego zakotwiczenia DNA w błonie konieczne jest dołączenie do jego cząsteczki amfipatycznych grup chemicznych zdolnych do penetracji hydrofobowego zrębu dwuwarstwy lipidowej (14)*. Zastosowanie takiego podejścia w toku prowadzonych przez nas badań zaowocowało uzyskaniem pierwszej opisanej w literaturze struktury origami DNA zakotwiczonej w błonach fosfolipidowych (15)*. Wybór reszt cholesterolowych połączonych z DNA za pośrednictwem łącznika trietylenoglikolowego (TEG) podyktowany został obserwowaną przeze mnie wysoką efektywnością kotwiczenia krótkich oligonukleotydów do błony za ich pośrednictwem (Czogalla i wsp. - dane nieopublikowane). Tego typu kotwice błonowe nie wpływają znacząco na strukturę i dynamikę dwuwarstwy lipidowej oraz nie indukują kondensacji lipidów błonowych (16). W naszej pracy wykorzystaliśmy cząsteczki origami DNA o silnie wydłużonym kształcie (długość 422 nm, średnica 6 nm) i strukturze pęczka sześciu helis (ang. six-helix bundle), których właściwości mechaniczne zostały już wcześniej bardzo dobrze poznane (17). Osiem kotwic błonowych zostało rozmieszczonych symetrycznie po jednej stronie pęczka helis wzdłuż całej cząsteczki w postaci dwóch grup odległych od siebie o 84 nm, podczas gdy odległość pomiędzy poszczególnymi kotwicami w grupie wynosiła 42 nm. Po

przeciwnej stronie rozlokowano znaczniki fluorescencyjne (Alexa488) umożliwiające śledzenie zachowania się cząsteczek w mikroskopii konfokalnej (Rycina 1). Dzięki takiej funkcjonalizacji uzyskaliśmy struktury, które w sposób spontaniczny wiązały się do dwuwarstwy lipidowej ogromnych pęcherzyków jednowarstwowych (ang. giant unilamellar vesicles - GUVs) przy stężeniu soli zbliżonym do fizjologicznego (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5). Proces wiązania do błony w dużym stopniu był niezależny od jej składu lipidowego, obecności lipidów z ujemnie naładowaną częścią głowową i rozmiaru pęcherzyków (w zakresie średnicy 1-100 μm). Takie zachowanie było bezpośrednim odzwierciedleniem obecności kotwic cholesterolowych eksponowanych na powierzchni badanych cząsteczek origami DNA, gdyż analogiczne struktury pozbawione tych elementów funkcjonalnych wykazywały powinowactwo jedynie do błon zawierających dodatnio naładowane lipidy (np. DOTAP) w warunkach niskiej siły jonowej. Obiecujące wyniki opisanych eksperymentów stały się inspiracją do szerszego zastosowania lipofilnych nanostruktur origami DNA w badaniach błon lipidowych zarówno przez nasz jak i inne zespoły badawcze (14)*.



Rycina 1. Amfipatyczne nanostruktury origami DNA o architekturze pęczka sześciu helis. (A) Schemat nanostruktur z zaznaczonymi kotwicami cholesterolowymi (kolor żółty) oraz fluoroforami Alexa 488 (kolor zielony) (15)*. (B) Reprezentatywny obraz nanostruktury uzyskany za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). (C) Struktury origami DNA wykorzystane do analizy dyfuzji rotacyjnej i translacyjnej na powierzchni dwuwarstwy lipidowej (34)*.

Wieloskładnikowe modelowe systemy błon lipidowych mogą wykazywać koegzystencję faz, gdzie faza ciekłokrystaliczna nieuporządkowana (Ld) kontrastuje

pod względem uporządkowania i dyfuzji lateralnej lipidów z fazą ciekłokrystaliczną uporządkowaną (Lo). Wynika to z faktu, iż faza Ld złożona jest głównie z lipidów o dużym stopniu nienasycenia łańcuchów acylowych, z kolei uporządkowanie fazy Lo ma swoje źródło głównie w preferencyjnych oddziaływaniach niektórych fosfolipidów z cholesterolem (18). Zjawisko to leży u podstaw koncepcji tratw lipidowych, wydzielonych strukturalnie i funkcjonalnie kompartmentów błon żywych komórek (19, 20). Sens biologiczny tratw lipidowych polega na selektywnej rekrutacji lipidów i białek błonowych w obręb struktur błonowych o unikalnych właściwościach i funkcjach. Czynniki predestynujące białka do lokowania się w bardziej uporządkowanych domenach błonowych może być geometria ich domen przezbłonowych, selektywne oddziaływania z lipidami, bądź też odwracalna lub nieodwracalna lipidacja podczas obróbki potranslacyjnej (21). Intensywne badania nad tymi mechanizmami wciąż jednak nie doprowadziły do pełnej identyfikacji owych czynników oraz sposobu ich regulacji. Opisane przez nas amfipatyczne cząsteczki origami DNA lokalizowały się w przeważającej mierze w domenach Ld pęcherzyków GUV zbudowanych z trójskładnikowej mieszaniny lipidów (dioleilofosfatydylocholina, sfingomielina (lub dipalmitoilofosfatydylo-cholina), cholesterol w stosunku molowym 2:2:1) przy fizjologicznym stężeniu soli (15)*. Jednak po dodaniu do badanego układu jonów dwuwartościowych (Mg^{2+} lub Ca^{2+}) do końcowego stężenia 10 mM, następowała drastyczna zmiana objawiająca się pełną relokacją związanych z błoną cząsteczek origami DNA do domen Lo w czasie nie przekraczającym jednej godziny. Co więcej, proces ten był w pełni odwracalny poprzez chelatowanie jonów dwuwartościowych za pomocą EDTA. Najprawdopodobniej zjawisko to jest odzwierciedleniem oddziaływań jonowych DNA – lipidy, co sugeruje także wynik eksperymentu, w którym wprowadzenie do pęcherzyków liposomowych dodatnio naładowanego lipidu (DOTAP) lokującego się w fazie Ld skutkowało zahamowaniem opisanego zjawiska relokacji badanych struktur. Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska jest fakt, iż jony dwuwartościowe oddziałują z grupami fosforanowymi lipidów zwitterjonowych (takich jak sfingomielina i fosfatydylocholina) prowadząc to do zmiany orientacji części głowowych tych lipidów i nadania im pozornie dodatniego ładunku wypadkowego (22). Co więcej, wiązanie jonów dwuwartościowych do błon zbudowanych z lipidów zwitterjonowych jest tym słabsze im większy stopień nienasycenia łańcuchów acylowych tych lipidów (23). Tym samym, pod względem współczynnika podziału pomiędzy błonowe fazy Ld i Lo, duże struktury origami DNA

zakotwiczone w błonie za pośrednictwem grup funkcyjnych TEG-cholesterol różniły się zasadniczo od krótkich oligonukleotydów kotwiczonych do błony w analogiczny sposób. Te ostatnie nie wykazywały żadnych preferencji względem lokowania się do domen lipidowych (Czogalla i wsp. - dane nieopublikowane). Zjawisko modulowanej jonami dwuwartościowymi relokacji związanych z błonami cząsteczek pomiędzy domenami o różnym stopniu uporządkowania dwuwarstwy lipidowej nie zostało dotychczas zidentyfikowane, jednak może mieć duże znaczenie biologiczne. Wiele procesów komórkowych wiąże się z masowym napływem jonów wapnia do cytosolu. W świetle przedstawionych wyników jest wielce prawdopodobne, że napływ ten indukuje relokację pewnych białek błonowych do tratw lipidowych, a tym samym wpływa na funkcjonalność wielocząsteczkowych kompleksów błonowych. Wyniki te otwierają także nowe możliwości konstruowania nanomateriałów (w tym cząsteczek biologicznie aktywnych) funkcjonalizujących błony biologiczne w selektywny i czuły na warunki środowiskowe sposób.

Bardzo ważnym atrybutem cząsteczek związanych z dwuwarstwą lipidową jest ich dyfuzja w płaszczyźnie błony. Szczególnie interesująca jest dynamika molekuł o wydłużonym kształcie, oddziałujących z błoną lipidową równolegle względem płaszczyzny tej ostatniej. Steryczne interakcje pomiędzy takimi cząsteczkami przyłączonymi do błony, co można w wielu przypadkach odnieść do układu dwuwymiarowego, mogą skutkować przejściem fazowym od struktury izotropowej do nematycznej. Tego typu przejścia fazowe mogą mieć fundamentalne znaczenie w funkcjonowaniu układów biologicznych. Pojawienie się fazy nematycznej może mieć duży wpływ na charakter wiązania peptydów o wydłużonym kształcie do błon lipidowych (24), a także ściśle odnosić się do lokalnej krzywizny błony (25). Badania eksperymentalne oraz przewidywania teoretyczne przeprowadzone w ostatnich latach wskazują, że pierwszym etapem procesu odkształcania błon biologicznych z udziałem białek z rodziny BAR, retikulonów oraz kaweolin jest samoorganizacja związanych z błonami białek w domeny nematyczne (26-29). Podkreślić należy, że każde z wymienionych białek charakteryzuje się wydłużonym kształtem cząsteczek. W tym kontekście zaprojektowane przez nas struktury origami DNA złożone z pięciu helis stanowiły odpowiednie narzędzie do badania omawianych procesów. Już wstępne obserwacje z użyciem techniki odzysku fluorescencji po fotobłaknięciu (FRAP, ang. fluorescence recovery after photobleaching) wykazały, że ruchliwość

cząsteczek origami DNA była zależna od ich stężenia na powierzchni błony **(15)***. Aby uzyskać bardziej szczegółowe dane o tym procesie, zastosowaliśmy technikę spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS, ang. fluorescence correlation spectroscopy) do analizy cząsteczek origami DNA różniących się od siebie jedynie obecnością znaczników w ściśle określonych pozycjach. Sondy fluorescencyjne ulokowano w centralnej części cząsteczki lub na jednym z jej końców (Rycina 1). Tak przygotowane cząsteczki origami DNA swobodnie dyfundowały na powierzchni ogromnych pęcherzyków jednowarstwowych zbudowanych z DOPC (dioleilofosfatydylocholiny) w środowisku wodnym (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,5). Jednak krzywe korelacyjne uzyskane przy niskich gęstościach powierzchniowych (poniżej 2 cząsteczek μm^{-2}) każdej z wymienionych cząsteczek różniły się znacząco od siebie. Objawiało się to szybszym zanikiem funkcji autokorelacyjnej w przypadku struktur znakowanych na końcu pęczka sześciu helis. Przyczyną tego zjawiska jest udział składowej rotacyjnej dyfuzji związanych z błoną struktur origami DNA. Jeśli środek masy cząsteczki jest znakowany fluorescencyjnie, a znacznik ma swobodę reorientacji w nanosekundowej skali czasowej, fluktuacje fluorescencji w technice FCS są odzwierciedleniem ruchów środka masy cząsteczki. Jeśli jednak cząsteczka o wydłużonym kształcie i długości większej lub równej średnicy przekroju objętości detekcji zostanie wyznakowana fluorescencyjnie na jednym z jej końców, fluktuacje fluorescencji niosą ze sobą dodatkowo informacje o rotacji cząsteczki i jej dynamice konformacyjnej. Ostatni z wymienionych parametrów ma marginalne znaczenie w przeprowadzonych eksperymentach FCS ze względu na długość sztywności (ang. persistence length) znacznie przekraczającą długość badanych molekuł (17).

Analiza i interpretacja wyników uzyskanych w powyższych eksperymentach FCS wymagały opracowania przez nas nowego modelu pozwalającego na wyznaczenie współczynników dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej na podstawie funkcji korelacyjnej **(15)***. Punktem wyjścia było założenie, że współczynniki dyfuzji wzdłuż i w poprzek długiej osi badanych cząsteczek (odpowiednio D_{\parallel} i D_{\perp}) nie różnią się znacząco od siebie. Ma to uzasadnienie dla związanych z błonami fosfolipidowymi cząsteczek, których długość jest porównywalna bądź mniejsza niż tzw. długość Saffmana-Delbrücka (l_{SD}) (30). Biorąc pod uwagę przybliżoną wartość lepkości powierzchniowej błon zbudowanych z DOPC (13) oraz lepkość wody (31) w warunkach pomiarowych, l_{SD} ma wartość bardzo zbliżoną do długości badanych struktur origami DNA, co

uzasadnia pominięcie zjawiska anizotropii dyfuzji w naszym układzie badawczym. Funkcja autokorelacji fluorescencji może mieć bezpośrednie przełożenie na średnio-kwadratowe przemieszczenie (MSD, ang. mean square displacement) (32). Ruchy Browna znacznika fluorescencyjnego zlokalizowanego w środku masy cząsteczki origami DNA nie są zależne od dyfuzji rotacyjnej więc MSD jest liniową funkcją czasu. Dla tej samej cząsteczki znakowanej na jednym z końców dyfuzja rotacyjna wpływa na zależność czasową MSD w krótkich przedziałach czasowych. Adaptując wcześniej opublikowane wyniki (32), uzyskaliśmy równanie, które pozwoliło powiązać zjawisko dyfuzji rotacyjnej z pozornie zwiększonym współczynnikiem dyfuzji obserwowanym w naszych eksperymentach **(15)***. Funkcja autokorelacji FCS dla cząsteczki wykonującej ruchy Browna w przestrzeni dwuwymiarowej płaszczyzny ogniskowej w obrębie objętości detekcji mikroskopu konfokalnego wyraża się równaniem: $G(\tau) = [\langle N \rangle (1 + \langle r^2(\tau) \rangle / r_0^2)]^{-1}$, gdzie $\langle r^2(\tau) \rangle$ to MSD znacznika fluorescencyjnego przyłączonego do cząsteczki, a $\langle N \rangle$ to średnia liczba cząsteczek w objętości detekcji. Jeżeli fluorofor jest przyłączony do środka masy cząsteczki o wydłużonym kształcie, FCS niesie ze sobą jedynie informacje o dyfuzji translacyjnej $\langle r^2(\tau) \rangle = \langle r_{\text{środek}}^2(\tau) \rangle = 4D_T\tau$. W przypadku gdy fluorofor znajduje się na końcu cząsteczki, funkcja autokorelacji FCS odzwierciedla zarówno dyfuzję translacyjną jak i rotacyjną $\langle r^2(\tau) \rangle = \langle r_{\text{koniec}}^2(\tau) \rangle = 4D_T\tau + 1/2L^2(1 - \exp(-D_R\tau))$. Zastosowanie opracowanego przez nas podejścia do analizy uzyskanych danych eksperymentalnych pozwoliło wyznaczyć współczynnik dyfuzji translacyjnej dla związanych z błoną cząsteczek origami DNA znakowanych fluorescencyjnie w środku masy na $D = 1,39 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ oraz współczynnik dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej dla analogicznych cząsteczek znakowanych na jednym z końców na odpowiednio $D = 1,42 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ i $D_R = 87 \text{rad}^2 \text{s}^{-1}$. Godnym podkreślenia jest fakt, że uzyskane przez nas wartości współczynników dyfuzji są bardzo zbliżone do wyników rozważań teoretycznych (33). Opracowana przez nas metoda analizy dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej na powierzchniach błon biologicznych nabiera szczególnej wartości w perspektywie niedoboru alternatywnych metod o zbliżonej precyzji, pozwalających określać wspomniane parametry dla cząsteczek submikrometrowej wielkości.

Kolejnym krokiem było zastosowanie opracowanej przez nas metody opartej o FCS do śledzenia zmian dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej w funkcji stężenia cząsteczek origami DNA na powierzchni dwuwarstwy lipidowej zbudowanej z DOPC **(34)***. W celu

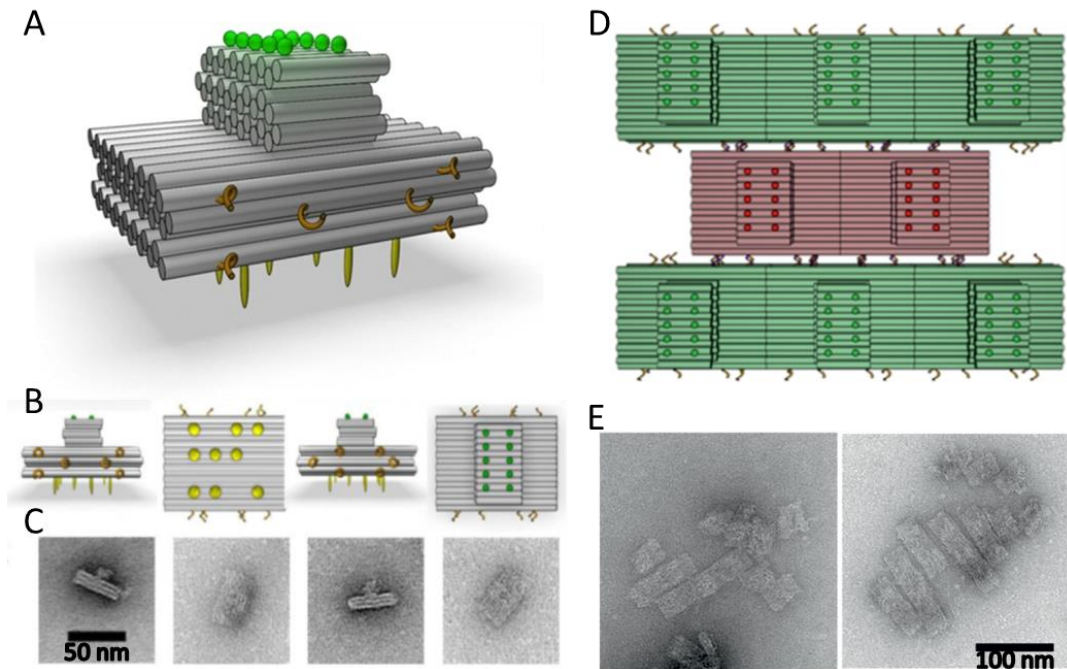
uniknięcia wpływu zjawiska dyfuzji kolektywnej na mierzone parametry, konieczne było zastosowanie dwóch populacji cząsteczek znakowanych różnymi fluoroforami. Alexa 488 przyłączana była do cząsteczek, których dyfuzję translacyjną i rotacyjną mierzono tak jak to opisano powyżej. Z kolei fluoroforem Alexa 647 znakowano cząsteczki, które służyły do zwiększenia gęstości cząsteczek na powierzchni błony. Ostatni z wymienionych parametrów określany był na podstawie sumy amplitudy uzyskanych funkcji autokorelacyjnych mierzonych w dwóch niezależnych kanałach detekcji fluorescencji. Wyznaczone wartości współczynników dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej badanych cząsteczek origami DNA pozostawały na stałym poziomie przy gęstości cząsteczek nieprzekraczającej $2 \mu\text{m}^{-2}$. Warty podkreślenia jest fakt, że tempo dyfuzji zależy od ilości reszt cholesterolowych, dzięki którym badane struktury kotwiczą się do błony. Wartości obu z wymienionych współczynników dyfuzji wzrosły znacząco wraz ze zmniejszeniem liczby kotwic błonowych na powierzchni cząsteczek origami DNA. Na tej podstawie można wnioskować, że badane struktury rzeczywiście znajdują się na powierzchni błony, a jedynymi elementami penetrującymi dwuwarstwę lipidową są kotwice cholesterolowe. Przy gęstości cząsteczek origami DNA przekraczającej $2 \mu\text{m}^{-2}$ obserwowaliśmy systematyczny spadek wartości współczynników dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej wraz ze wzrostem stężenia molekuł na powierzchni błony, przy czym efekt ten był bardziej wyraźny w przypadku dyfuzji rotacyjnej. Opisane zjawisko należy traktować jako odzwierciedlenie postępującego zwiększenia częstotliwości wzajemnych oddziaływań sterycznych pomiędzy cząsteczkami origami DNA. W tym kontekście godnym podkreślenia jest fakt, że przebieg zależności wartości znormalizowanych (względem wartości ekstrapolowanych dla nieskończonego rozcieńczenia) współczynników jest taki sam dla cząsteczek origami DNA o ośmiu i dwóch kotwicach lipidowych. Tym samym jako pierwsi zaobserwowaliśmy inicjację zjawiska przejścia z fazy izotropowej do fazy nematycznej w płaszczyźnie błony biologicznej. Uzyskane wyniki odnieśliśmy do przeprowadzonych przez nas symulacji Monte Carlo (MC) dynamiki sztywnych obiektów o stosunku długości do średnicy dążącym do nieskończoności w przestrzeni dwuwymiarowej (34)*. W okolicach punktu przejścia z fazy izotropowej w fazę nematyczną, co miało miejsce przy gęstościach cząsteczek sugerowanych we wcześniejszych pracach teoretycznych (35), zaobserwowaliśmy stukrotny spadek wartości współczynnika dyfuzji rotacyjnej względem wartości dla nieskończonego rozcieńczenia, podczas gdy dla współczynnika dyfuzji translacyjnej zaobserwowano 2,5-krotny spadek. Co

najważniejsze, zależność współczynników dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej od gęstości cząsteczek wyznaczona w przeprowadzonych przez nas symulacjach ma przebieg zgodny z wspomnianymi powyżej wynikami eksperymentalnymi uzyskanymi za pomocą metody FCS. Fakt ten świadczy o tym, że główną rolę w obserwowanym przez nas zjawisku przejścia od fazy izotropowej do fazy nematycznej na powierzchni błon biologicznych odgrywają bezpośrednie interakcje steryczne pomiędzy cząsteczkami origami DNA. Uzyskane przez nas wyniki mogą mieć bezpośrednie odniesienie do danych opublikowanych dla białek zakrzywiających błony (np. z rodziny BAR). Wynika z nich, że pierwszym etapem krytycznym dla funkcji biologicznej pełnionej przez te białka o wydłużonym kształcie cząsteczek jest ich organizacja w fazy nematyczne na powierzchni błony (28). Przejścia fazowe od struktury izotropowej do nematycznej mają także kluczowe znaczenie w wielu innych systemach, m.in. w organizacji przestrzennej cząstek tworzących nano-przyrządy, w spontanicznym składaniu cząstek wirusów na powierzchniach czy też podczas samoorganizacji włókien amyloidowych na granicy dwóch ośrodków płynnych (36-38).

Odształcanie błon lipidowych przy udziale błonowych białek peryferyjnych zależy nie tylko od gęstości cząsteczek tych białek na powierzchni dwuwarstwy lipidowej, lecz opiera się także na oligomeryzacji jednostek białkowych. Propagacja zjawiska lokalnego odształcania błon przez białka z rodziny BAR jest ściśle związana z ich oligomeryzacją w ściśle uporządkowane rusztowanie na powierzchni błon (39). Pierwoplanową rolę odgrywają tu oddziaływania lateralne pomiędzy poszczególnymi monomerami. Z kolei charakter generowanych odształceń ściśle zależy od geometrii białkowych powierzchni oddziałujących z dwuwarstwą lipidową, co może skutkować pojawieniem się wpukleń (generowanych przez białka BAR i F-BAR) (40) lub uwypukleń (I-BAR) (41) błon komórkowych, bądź też stabilizacją planarnych struktur błonowych (PinkBAR) (42). Proces oligomeryzacji białek BAR był przedmiotem wielu badań, wciąż jednak brakuje pełnego opisu jego fizykochemicznych podstaw. Jednym z rozwiązań może być zastosowanie w badaniach tego zjawiska molekuł o większych możliwościach modulacji poszczególnych parametrów strukturalnych i funkcjonalnych w porównaniu do natywnych białek. Dlatego postanowiliśmy zbudować struktury origami DNA wykazujące cechy białek z rodziny BAR, które zidentyfikowano jako niezbędne w procesie zakrzywiania błon **(43)***. Przede wszystkim, struktury te posiadały

powierzchnię oddziaływania z błoną o zdefiniowanej geometrii oraz powierzchnie boczne umożliwiające wiązanie innych monomerów. Konieczność kontrolowania procesu oligomeryzacji wymusiła na nas przygotowanie dwóch populacji tego typu cząsteczek (A i B) (Rycina 2). Ich cechą wspólną była struktura przestrzenna cząsteczki wraz z dziewięcioma kotwicami błonowymi (TEG-cholesterol) eksponowanymi z płaskiej powierzchni o wymiarach 40 x 50 nm. Po przeciwnej stronie cząsteczki ulokowano dziesięć fluoroforów Alexa 488 (cząsteczki A) lub Alexa 647 (cząsteczki B) ułatwiających analizę zachowania się cząsteczek na powierzchni dwuwarstwy lipidowej. Oligomeryzacja struktur była możliwa dzięki wzajemnej komplementarności 11-sto nukleotydowych jednoniciowych wysięgników, w liczbie sześciu na dwóch przeciwległych powierzchniach lateralnych cząsteczek każdej z populacji. Odpowiedni dobór wzajemnie komplementarnych sekwencji wysięgników skutkowało tym, że cząsteczki danej populacji nie oligomeryzowały ze sobą, jednak struktury A wiązały się do struktur B w ściśle określony sposób tworząc bardzo regularny układ naprzemiennie następujących po sobie rzędów złożonych z jednej populacji cząsteczek origami DNA, a kolejne rzędy były przesunięte względem siebie o połowę szerokości monomeru (Rycina 2). Takie zachowanie obserwowaliśmy w mikroskopii elektronowej dla origami DNA niezwiązanych z błonami lipidowymi, jednak oligomeryzacja zachodziła w ograniczonym stopniu, a większość oligomerów złożona była z mniej niż piętnastu monomerów. W swoich badaniach skoncentrowaliśmy się jednak na zachowaniu się tych struktur po ich zakotwiczeniu w błonach pęcherzyków lipidowych zbudowanych z DOPC, używając mikroskopii konfokalnej i spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS). Zgodnie z naszymi przewidywaniami wszystkie badane struktury origami DNA spontanicznie wiązały się do powierzchni pęcherzyków lipidowych i dyfundowały swobodnie w dwuwymiarowej przestrzeni powierzchni błony. Współczynnik dyfuzji translacyjnej przy niskiej gęstości cząsteczek ($<4 \mu\text{m}^{-2}$) wynosił około $2,5 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, co stanowi około 1,6 krotność wartości współczynnika dyfuzji translacyjnej opisanych wcześniej amfipatycznych pęczków sześciu helis związanych z błoną (15, 34). Podobnie jak ostatnie z wymienionych, zarówno cząsteczki A jak i B wykazywały preferencyjne oddziaływania z fazami Ld lub Lo błon wykazujących separację faz, odpowiednio w nieobecności lub obecności jonów dwuwartościowych (Czogalla i wsp. – dane nieopublikowane), co może sugerować, że ta właściwość amfipatycznych origami DNA jest niezależna od wielkości i kształtu cząsteczek. Niezwykle interesujące okazały się obserwacje pęcherzyków lipidowych mających na

powierzchni oba typy struktur (A i B). Dyfuzja cząsteczek origami DNA była znacząco spowolniona, a mierzone wartości współczynników dyfuzji były odwrotnie proporcjonalne do gęstości cząsteczek. Efekt ten był szczególnie wyraźny po przekroczeniu progu $4 \mu\text{m}^{-2}$. Powyżej $10 \mu\text{m}^{-2}$ dyfuzja niemal całkowicie zanikała, co wiązało się z dużymi zaburzeniami krzywych autokorelacyjnych FCS. Drastyczne spowolnienie dyfuzji objawiało się także brakiem odzysku fluorescencji po fotoblaknięciu (FRAP) dla cząsteczek origami DNA na powierzchni pęcherzyków lipidowych, przy czym nie miało to wpływu na dyfuzję lipidowych analogów fluorescencyjnych (takich jak DiD, Dil) znajdujących się w dwuwarstwie. Przy gęstościach cząsteczek w zakresie $5\text{-}10 \mu\text{m}^{-2}$ obserwowaliśmy także pojawienie się dużych oligomerów na powierzchni pęcherzyków, których obraz w mikroskopii konfokalnej był identyczny w obu kanałach fluorescencyjnych (dla Alexa 488 i Alexa 647), co wskazuje na mechanizm oligomeryzacji zgodny z wcześniej przedstawionymi założeniami (Rycina 2D). Podobny obraz powstawania oligomerów (łat oligomerowych) na pęcherzykach lipidowych był wcześniej opisany dla białek opłaszczających błony biologiczne (44, 45). Nawet przy niższych gęstościach cząsteczek origami DNA (gdy pokrycie powierzchni wynosiło około 1% powierzchni błony) mogliśmy stwierdzić wzajemne wiązanie się struktur A i B w spektroskopii wzajemnej (krzyżowej) korelacji fluorescencji (FCCS) **(43)***. Obserwowana duża amplituda krzywej FCCS świadczyła o dużym udziale frakcji kompleksów A+B, a stopień wzajemnej korelacji obliczony według wcześniej zaproponowanej metody (46) wynosił około 65%. Chcąc upewnić się, że obserwowana oligomeryzacja wynika z lateralnych oddziaływań pomiędzy dwoma populacjami cząsteczek mediowanych przez hybrydujące oligonukleotydy, przeprowadziliśmy analogiczne badania dla nanostruktur A i B pozbawionych tych oligonukleotydów. W tej sytuacji stopień wzajemnej korelacji spadł poniżej 20%, co świadczy o drastycznym osłabieniu wzajemnych oddziaływań, a mierzone współczynniki dyfuzji nie odbiegały od wartości zarejestrowanych dla monomerów A lub B analizowanych indywidualnie.



Rycina 2. Amfipatyczne nanostruktury origami DNA wykazujące zdolność do oligomeryzacji. (A) Schemat struktury nanocząsteczek: kotwice cholesterolowe (kolor żółty), fluorofory Alexa 488 (kolor zielony), lepkie oligonukleotydy (kolor pomarańczowy). (B) Schemat struktury nanocząsteczek w różnych orientacjach oraz (C) odpowiadające im obrazy uzyskane przy pomocy transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). (D) Schemat oligomeryzacji dwóch populacji nanocząsteczek (z fluoroforami Alexa488 – kolor zielony, lub z fluoroforami Alexa 647 – kolor czerwony) oraz obraz TEM oligomerów **(43)***.

Zasadniczą kwestią było zbadanie czy skonstruowane przez nas cząsteczki origami DNA są zdolne do deformacji błon biologicznych przy odpowiedniej gęstości cząsteczek na powierzchni błony. Dobrze scharakteryzowanym punktem odniesienia dla naszych badań było białko z rodziny BAR – amfizyna. Stopień pokrycia błony cząsteczkami amfizyny niezbędny do deformacji dwuwarstwy lipidowej został oszacowany na około $1000 \mu\text{m}^{-2}$ (47). Po porównaniu powierzchni oddziałującej z błoną dla domeny BAR amfizyny (ok. $45 \text{ nm}^2/\text{cząsteczkę}$ według PDB ID: 4ATM) oraz dla badanej struktury origami DNA (ok. $2000 \text{ nm}^2/\text{cząsteczkę}$) ustaliliśmy, że gęstość cząsteczek origami DNA przekraczająca $10 \mu\text{m}^{-2}$ powinna odpowiadać wspomnianej wartości stopnia pokrycia błony niezbędnej do deformacji błony. Przeprowadzone przez nas obserwacje mikroskopowe pęcherzyków lipidowych świadczą, że obecność oligomeryzujących ze sobą struktur A i B na ich powierzchni w stężeniu przekraczającym $10 \mu\text{m}^{-2}$ powoduje wydatne odkształcenie się błon tych pęcherzyków w stosunku do ich wyjściowego, sferycznego kształtu **(43)***. Powstałe po

oligomeryzacji origami DNA rusztowanie stabilizowało oddziałującą z nim błonę, co objawiało się zwiększoną odpornością mechaniczną pęcherzyków (Czogalla i wsp. – dane nieopublikowane). Podkreślić należy, że podobne odkształcenia pęcherzyków lipidowych nie były obserwowane w analogicznych eksperymentach z użyciem struktur A i B pozbawionych wysięgników oligonukleotydowych. Fakt ten wskazuje na kluczową rolę międzycząsteczkowych oddziaływań lateralnych w procesie odkształcania dwuwarstwy lipidowej indukowanej cząsteczkami oddziałującymi z powierzchnią błony. Obserwowane planarne deformacje błony można bezpośrednio odnieść do odkształceń dwuwarstwy lipidowej pęcherzyków powodowanych przez białko PinkBAR (42). Godnym podkreślenia jest fakt, że indukcja analogicznych zmian morfologicznych najprawdopodobniej wynika z płaskiej geometrii powierzchni oddziałującej z błoną zarówno w przypadku białka PinkBAR jak i naszych struktur origami DNA. Zastosowanie techniki origami DNA pozwoliło nam w jednoznaczny sposób zdefiniować rolę oligomeryzacji cząsteczek peryferyjnych w procesie opłaszczania i odkształcania błon lipidowych oraz uzyskać dowody na korelację geometrii oddziałujących z błoną powierzchni cząsteczek z charakterem generowanych odkształceń dwuwarstwy lipidowej. Dalsze badania nad wspomnianymi aspektami wymagają skonstruowania nanocząsteczek DNA o różnym stopniu zakrzywienia powierzchni oddziałujących z dwuwarstwą lipidową oraz wymiarach jak najbardziej zbliżonych do znanych białek zakrzywiających błonę. Bardziej wymagające będzie stworzenie cząsteczek origami DNA oddziałujących z ujemnie naładowanymi lipidami błonowymi, analogicznie do wspomnianych białek.

Omówione prace stanowią znaczący krok w stronę niestandardowego podejścia eksperymentalnego do badań procesów zachodzących na powierzchni błon biologicznych. W zainicjowanym przez nas podejściu eksperymentalnym większy nacisk położony jest na poznanie natury i mechanizmów tych procesów niż na strukturę i funkcje cząsteczek odpowiedzialnych za przebieg tych procesów w warunkach naturalnych. Zastosowanie nanostruktur origami DNA pozwala w bardzo precyzyjny i selektywny sposób manipulować elementami strukturalnymi i funkcjonalnymi cząsteczek w układzie, co wraz z kontrolą kluczowych parametrów systemów *in vitro* umożliwia precyzyjniejsze zdefiniowanie poszczególnych etapów procesu biologicznego. Takie podejście eksperymentalne umożliwiło nam uzyskanie wielu dotychczas nieosiągalnych informacji o procesach wiązania, dyfuzji i

oligomeryzacji molekuł na powierzchni dwuwarstwy lipidowej. Przegląd najnowszej literatury wskazuje, że zapoczątkowane przez nas badania są kontynuowane przez wiele grup badawczych znajdujących coraz szersze zastosowania amfipatycznych struktur origami DNA.

Główne wyniki stanowiące osiągnięcie naukowe:

1. Uzyskano pierwsze amfipatyczne nanostruktury origami DNA.
2. Scharakteryzowano wiązania amfipatycznych nanostruktur origami DNA do błon o różnym składzie lipidowym oraz określono wpływ wybranych jonów jedno i dwuwartościowych na ten proces.
3. Określono zachowanie się wspomnianych nanostruktur na błonach wykazujących separację faz ciekłokrystalicznych Ld/Lo.
4. Opracowano nową metodologię pomiaru dyfuzji cząsteczek, która po raz pierwszy pozwoliła na precyzyjne określenie dwóch składowych dyfuzji: rotacyjnej i translacyjnej dla cząsteczek submikrometrowych na powierzchni błon lipidowych metodą spektroskopii korelacji fluorescencji.
5. Po raz pierwszy scharakteryzowano zależność wartości współczynników dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej od gęstości cząsteczek o wydłużonym kształcie na powierzchni błony, a tym samym opisano przejście fazowe od struktury izotropowej do nematycznej.
6. Uzyskano nanostruktury origami DNA zdolne do kontrolowanej oligomeryzacji na powierzchni błon biologicznych.
7. Odtworzono proces odkształcania dwuwarstwy lipidowej przy użyciu nanostruktur origami DNA i określono parametry strukturalne i funkcjonalne kluczowe dla tego procesu.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Przedmiotem moich zainteresowań w trakcie realizacji pracy licencjackiej była proteoliza spektryny przez kalpainy w stanach patologicznych komórek. Wiele publikacji wskazuje, że kalpaina, proteaza cysteinowa zależna od jonów wapnia, jest

jednym z enzymów wewnątrzkomórkowych aktywowanych w pierwszej kolejności w stanach neurodegeneracyjnych. Z kolei spektryna, główny element szkieletu błonowego komórek, jest substratem tej proteazy, a charakterystyczne fragmenty proteolityczne tej reakcji stanowią wczesny objaw uruchomienia kaskady mechanizmów prowadzących do śmierci komórek nerwowych. Podjęte przeze mnie próby podsumowania i usystematyzowania wiedzy w tym zakresie zaowocowały opublikowaniem artykułu przeglądowego (48).

Moja praca magisterska opierała się na identyfikacji białka bakteryjnego, które wykazywało reaktywność z przeciwciałami skierowanymi przeciwko podjednostce beta spektryny. W tym czasie kontrowersyjnym zagadnieniem była potencjalna obecność spektryny lub białek spektrynopodobnych w organizmach niezwierzęcych. Pomimo iż raportowano istnienie tego typu białek w komórkach roślinnych, wątpliwości mogło budzić wykorzystywane podejście eksperymentalne oparte jedynie o reaktywność elementów białkowych komórek roślinnych z przeciwciałami rozpoznającymi epitopy spektryny (49, 50). Naszym celem było zastosowanie alternatywnego podejścia umożliwiającego jednoznaczne zidentyfikowanie „spektrynopodobnego” białka w komórkach *E.coli* (51). Optymalizacja metody izolacji tego białka pozwoliła nam uzyskać preparat o wysokiej czystości, który następnie analizowaliśmy z użyciem spektrometrii masowej. Pozwoliło to na identyfikację wspomnianego białka jako chaperoniny GroEL. Brak podobieństwa strukturalnego pomiędzy spektryną i GroEL skłonił nas do szukania podobieństw na poziomie sekwencji aminokwasowej, co doprowadziło do znalezienia potencjalnego epitopu wspólnego dla obu białek.

W trakcie pięciomiesięcznego stażu w laboratorium kierowanym przez dr Makusa Brauna (Bonn, Niemcy) uczestniczyłem w projekcie dotyczącym polimeryzacji i reorganizacji aktyny w grawitropizmie ryzoidów *C.globularis*. Uzyskane przez nas wyniki wskazują na fundamentalną rolę białek kontrolujących polimeryzację aktyny, takich jak czynnik depolimeryzujący aktynę (ADF), profilina, wilina w polaryzacji komórki i reakcji grawitropicznej ryzoidów (52).

Celem mojego projektu doktorskiego były badania strukturalne zależnej od ankiry domeny wiązania lipidów spektryny beta. Badania w tej tematyce były przeze mnie kontynuowane także po uzyskaniu tytułu doktora. Jednym z głównych elementów spajających szkielet błonowy z dwuwarstwą lipidową jest ankiryna. To wielodomenowe białko o różnorodnych funkcjach zasługuje na szczególną uwagę, co było przesłanką

do przygotowania przez nas pracy przeglądowej na temat jego udziału w różnorodnych szlakach komórkowych (53). Ankiryne wiąże się między innymi ze spektryną oraz integralnymi białkami błonowymi, takimi jak białko przenoszące aniony (AE1), i tym samym stanowi o właściwościach mechanicznych błon plazmatycznych. Duże znaczenie fizjologiczne oddziaływania ankiryne – spektryna zostało spotęgowane zidentyfikowaniem w obrębie N-końcowej części spektrynowej domeny wiążącej ankiryne miejsca oddziaływania z lipidami (54). Wyniknęła stąd pilna potrzeba poznania struktury przestrzennej wspomnianej domeny. W naszych badaniach skoncentrowaliśmy się na ekspresjonowanych w komórkach bakteryjnych fragmentach erythrocytarnej spektryny beta obejmujących domenę wiązania ankiryne. Zastosowaliśmy metodę ukierunkowanego znakowania spinowego (SDSL) w połączeniu z spektroskopią elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Własne doświadczenia z wspomnianą metodologią oraz bogate źródła literaturowe stały się podstawą przygotowanej przez nas pracy przeglądowej opisującej spektrum zastosowań SDSL i EPR w biologii strukturalnej (55). W pierwszym etapie realizacji omawianego projektu skoncentrowaliśmy się na pomiarze odległości pomiędzy poszczególnymi parami reszt aminokwasowych na podstawie analizy stopnia poszerzenia widma EPR wynikającego z wzajemnych oddziaływań wprowadzonych do białka znaczników spinowych (56). Uzyskane w ten sposób wyniki podparte analizą spektroskopii dichroizmu kołowego oraz modelowaniem komputerowym pozwoliły stworzyć pierwszy model strukturalny N-końcowej części spektrynowej domeny wiązania ankiryne (57). Kontynuacja tych badań polegała na ich rozszerzeniu o analizę wzajemnej odległości oraz ruchliwości znaczników spinowych wprowadzonych w ściśle określone miejsca zarówno w obrębie badanej domeny jak i poza nią, przed i po związaniu badanych fragmentów białkowych z błonami lipidowymi (58). Pozwoliło nam to opisać zmiany konformacyjne badanej struktury indukowane oddziaływaniem z lipidami polegające na częściowej destabilizacji trzeciorzędowej struktury trójhelikalnej oraz wyjaśnić mechanizm interakcji jej reszt hydrofobowych z dwuwarstwą lipidową. Komplementarne wyniki uzyskaliśmy przy użyciu metod fluorescencyjnych opartych o pomiar zmian widma emisji i wygaszania fluorescencji reszt tryptofanu (59). W późniejszym czasie trzy zespoły badawcze niezależnie od siebie opublikowały wyniki badań krystalograficznych spektrynowej domeny wiązania ankiryne (60-62). Modele krystalograficzne okazały się w dużej mierze zbieżne z modelem opracowanym wcześniej przez nas, jednak ostatni z wymienionych wnosił do całości obrazu bardzo

dużo dodatkowych informacji odnoszących się zarówno do detali strukturalnych białka znajdującego się w bardziej zbliżonym do fizjologicznego środowisku wodnym, jak i do zmian konformacyjnych związanych z funkcją fizjologiczną pełnioną przez badaną domenę białkową (63). Kontynuacja naszych badań nad domeną wiązania lipidów spektryny beta zaowocowała identyfikacją czterech reszt hydrofobowych odgrywających największą rolę w zależnych od ankiryiny oddziaływaniach z błonami (64). Praca ta oparta na dogłębnej analizie z użyciem modelowych systemów błonowych, metod modelowania struktur białkowych jak również komórek w hodowlach *in vitro* oraz izolowanych erytrocytów doprowadziła nas także do wyjaśnienia znaczenia fizjologicznego badanego miejsca w oparciu o jego rolę w stabilizacji struktury spektrynowego szkieletu błonowego. Z kolei prowadzone przez nas badania nad interakcjami spektryny z ankiryną dowiodły szczególnego znaczenia oddziaływań hydrofobowych w tworzeniu stabilnego kompleksu obu białek oraz pozwoliły na identyfikację reszt aminokwasowych kluczowych dla tego typu oddziaływań w obrębie ankirynowej domeny ZU5 (65).

W kręgu moich zainteresowań badawczych jest także zagadnienie oddziaływań innych peryferyjnych białek błonowych z dwuwarstwą lipidową. Szczególnie interesująca w tym kontekście jest kwestia mechanizmów specyficznego rozpoznawania lipidów sygnałnych, takich jak fosfatydyloinozytoli i kwasu fosfatydowego. Ta tematyka była już wcześniej bardzo szeroko eksplorowana, jednak zagadką wciąż pozostaje stosunkowo niska specyficzność większości zidentyfikowanych dotychczas domen białkowych względem poszczególnych klas lipidów błonowych (66). Nasuwa to przypuszczenie, że białka rozpoznają nie tylko poszczególne cząsteczki lipidowe w dwuwarstwie, ale także fizyczne właściwości tej ostatniej, takie jak stopień uporządkowania lipidów, krzywizna i ładunek powierzchniowy. Skłoniło nas to do zaproponowania modelu, opisanego w jednej z naszych prac przeglądowych (1). W modelu tym bardzo ważną rolę w oddziaływaniach lipid-białko odgrywa sposób prezentacji lipidów w obrębie błony co może objawiać się m.in. zmianami konformacyjnymi główek polarnych lipidów, wpływem na ich jonizację jak i zwiększoną ekspozycją rozpoznawalnych przez białka elementów cząsteczek lipidowych. Wynika to z dużej różnorodności chemicznej komponentów lipidowych błon biologicznych, co skutkuje bogactwem różnego rodzaju interakcji pomiędzy komponentami i zmiennością parametrów fizykochemicznych dwuwarstwy. Dlatego,

jak podkreślamy w omawianej pracy przeglądowej, w badaniach nad specyficznością białek peryferyjnych ważne jest użycie różnych, wzajemnie komplementarnych modelowych systemów błonowych. Takie właśnie podejście zastosowaliśmy w badaniach nad specyficznością domeny FYVE białka Spir wchodzącego w skład kompleksu inicjującego polimeryzację aktyny na powierzchni błon pęcherzyków transportowych (67). Dzięki użyciu m.in. pęcherzyków lipidowych o szerokim spektrum średnicy oraz kilku komplementarnych względem siebie metod eksperymentalnych udało nam się wykazać, że wspomniana domena wiąże się niespecyficznie do błon o negatywnym ładunku, co z kolei wpływa na jej oddziaływania intramolekularne. Intensywne badania nad specyficznością oddziaływania białek peryferyjnych z lipidami sygnałnymi są przez nas kontynuowane z naciskiem na określenie wpływu innych lipidów na prezentację fosfatydyloinozytoli i kwasu fosfatydowego w błonie. Dotychczas uzyskane wyniki wskazują na duży wpływ cholesterolu na oddziaływania białek ze wspomnianymi fosfolipidami (Czogalla i wsp. – publikacja w przygotowaniu). Ma to ogromne znaczenie biologiczne w kontekście istnienia stromego gradientu stężenia cholesterolu w błonach organelli na szlaku sekrecyjnym komórek eukariotycznych.

Kolejnym zagadnieniem będącym w kręgu moich zainteresowań jest wykorzystanie pęcherzyków lipidowych (liposomów) jako nośników leków. Spore doświadczenie w tej dziedzinie zdobyłem w czasie pracy dla przemysłu farmaceutycznego. Jednak ze względu na aplikacyjny charakter prowadzonych przeze mnie prac publikacja uzyskanych wyników była w dużej mierze ograniczona. Reprezentatywną dla badań prowadzonych przeze mnie w tym okresie może być praca przeglądowa dotycząca liposomowych postaci cyklosporyny A (68). W późniejszym okresie brałem udział w badaniach dotyczących liposomowych nośników kwasów nukleinowych w celowanej terapii przeciwnowotworowej. Naszym celem było stworzenie formułacji liposomowych charakteryzujących się wysoką wydajnością transfekcji, stabilnością oraz specyficznością względem docelowych komórek nowotworowych. Udało się nam stworzyć nośniki wykazujące wszystkie te cechy dzięki zastosowaniu czynnika kompleksującego kwasy nukleinowe (lipid kationowy bądź polietylenoimina) oraz zamknięciu powstałych kompleksów w otoczce lipidowej posiadającej na swojej powierzchni zarówno łańcuchy polietylenoglikolowe, jak i przeciwciała skierowane przeciwko markerowi powierzchniowemu limfoidalnych

komórek nowotworowych (CD20) (69). Tak zbudowany nośnik oligonukleotydów antysensowych skierowanych przeciwko mRNA kodującym antyapoptotyczne białko Bcl-2 wykazywał wysoką skuteczność przeciwnowotworową zarówno w hodowlach komórkowych w warunkach *in vitro* jak i w testach na myszach z nowotworem indukowanym przez podskórne podanie komórek ludzkiego chłoniaka Burkitta. Nasz preparat został skonstruowany tak, aby możliwe było użycie różnych leków opartych o kwasy nukleinowe oraz różnych cząsteczek kierujących do swoistych komórek nowotworowych. Preparat ten został także objęty ochroną patentową (70).

1. **Czogalla, A., M. Grzybek, W. Jones, and U. Coskun. 2014. Validity and applicability of membrane model systems for studying interactions of peripheral membrane proteins with lipids. *Biochim Biophys Acta* 1841:1049-1059.**
2. Rothmund, P. W. 2006. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* 440:297-302.
3. Douglas, S. M., H. Dietz, T. Liedl, B. Hogberg, F. Graf, and W. M. Shih. 2009. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature* 459:414-418.
4. Castro, C. E., F. Kilchherr, D. N. Kim, E. L. Shiao, T. Wauer, P. Wortmann, M. Bathe, and H. Dietz. 2011. A primer to scaffolded DNA origami. *Nat Methods* 8:221-229.
5. Dietz, H., S. M. Douglas, and W. M. Shih. 2009. Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes. *Science* 325:725-730.
6. Zhang, C., Y. He, M. Su, S. H. Ko, T. Ye, Y. Leng, X. Sun, A. E. Ribbe, W. Jiang, and C. Mao. 2009. DNA self-assembly: from 2D to 3D. *Faraday Discuss* 143:221-233; discussion 265-275.
7. Simmel, F. C. 2012. DNA-based assembly lines and nanofactories. *Curr Opin Biotechnol* 23:516-521.
8. Douglas, S. M., I. Bachelet, and G. M. Church. 2012. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science* 335:831-834.
9. Derr, N. D., B. S. Goodman, R. Jungmann, A. E. Leschziner, W. M. Shih, and S. L. Reck-Peterson. 2012. Tug-of-war in motor protein ensembles revealed with a programmable DNA origami scaffold. *Science* 338:662-665.
10. Kuzyk, A., K. T. Laitinen, and P. Torma. 2009. DNA origami as a nanoscale template for protein assembly. *Nanotechnology* 20:235305.
11. Voigt, N. V., T. Topping, A. Rotaru, M. F. Jacobsen, J. B. Ravensbaek, R. Subramani, W. Mamdouh, J. Kjems, A. Mokhir, F. Besenbacher, and K. V. Gothelf. 2010. Single-molecule chemical reactions on DNA origami. *Nat Nanotechnol* 5:200-203.
12. Li, J., C. Fan, H. Pei, J. Shi, and Q. Huang. 2013. Smart drug delivery nanocarriers with self-assembled DNA nanostructures. *Adv Mater* 25:4386-4396.
13. Herold, C., P. Schwille, and E. P. Petrov. 2010. DNA condensation at freestanding cationic lipid bilayers. *Phys Rev Lett* 104:148102.
14. **Czogalla, A., H. G. Franquelim, and P. Schwille. 2016. DNA Nanostructures on Membranes as Tools for Synthetic Biology. *Biophys J* 110:1698-1707.**
15. **Czogalla, A., E. P. Petrov, D. J. Kauert, V. Uzunova, Y. Zhang, R. Seidel, and P. Schwille. 2013. Switchable domain partitioning and diffusion of DNA origami rods on membranes. *Faraday Discuss* 161:31-43; discussion 113-150.**
16. Bunge, A., M. Loew, P. Pescador, A. Arbusova, N. Brodersen, J. Kang, L. Dahne, J. Liebscher, A. Herrmann, G. Stengel, and D. Huster. 2009. Lipid membranes carrying lipophilic cholesterol-

- based oligonucleotides--characterization and application on layer-by-layer coated particles. *J Phys Chem B* 113:16425-16434.
17. Kauert, D. J., T. Kurth, T. Liedl, and R. Seidel. 2011. Direct mechanical measurements reveal the material properties of three-dimensional DNA origami. *Nano Lett* 11:5558-5563.
 18. Veatch, S. L., and S. L. Keller. 2003. Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys J* 85:3074-3083.
 19. Simons, K., and W. L. Vaz. 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33:269-295.
 20. Lingwood, D., and K. Simons. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327:46-50.
 21. Lorent, J. H., and I. Levental. 2015. Structural determinants of protein partitioning into ordered membrane domains and lipid rafts. *Chem Phys Lipids*.
 22. Ainalem, M. L., N. Kristen, K. J. Edler, F. Hook, E. Sparr, and T. Nylander. 2010. DNA binding to zwitterionic model membranes. *Langmuir* 26:4965-4976.
 23. Lis, L. J., W. T. Lis, V. A. Parsegian, and R. P. Rand. 1981. Adsorption of divalent cations to a variety of phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* 20:1771-1777.
 24. Almeida, P. F., and F. W. Wiegand. 2006. A simple theory of peptide interactions on a membrane surface: excluded volume and entropic order. *J Theor Biol* 238:269-278.
 25. Murugesan, Y. K., D. Pasini, and A. D. Rey. 2011. Microfibril organization modes in plant cell walls of variable curvature: a model system for two dimensional anisotropic soft matter. *Soft Matter* 7:7078-7093.
 26. Ramakrishnan, N., P. B. Sunil Kumar, and J. H. Ipsen. 2013. Membrane-mediated aggregation of curvature-inducing nematogens and membrane tubulation. *Biophys J* 104:1018-1028.
 27. Cui, H., C. Mim, F. X. Vazquez, E. Lyman, V. M. Unger, and G. A. Voth. 2013. Understanding the role of amphipathic helices in N-BAR domain driven membrane remodeling. *Biophys J* 104:404-411.
 28. Simunovic, M., C. Mim, T. C. Marlovits, G. Resch, V. M. Unger, and G. A. Voth. 2013. Protein-mediated transformation of lipid vesicles into tubular networks. *Biophys J* 105:711-719.
 29. Lipowsky, R. 2013. Spontaneous tubulation of membranes and vesicles reveals membrane tension generated by spontaneous curvature. *Faraday Discuss* 161:305-331; discussion 419-359.
 30. Petrov, E. P., and P. Schwille. 2008. Translational diffusion in lipid membranes beyond the Saffman-Delbruck approximation. *Biophys J* 94:L41-43.
 31. Kestin, J., M. Sokolov, and W. A. Wakeham. 1978. Viscosity of Liquid Water in Range -8-Degrees-C to 150-Degrees-C. *J Phys Chem Ref Data* 7:941-948.
 32. Winkler, R. G. 2007. Diffusion and segmental dynamics of rodlike molecules by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Chemical Physics* 127.
 33. Levine, A. J., T. B. Liverpool, and F. C. MacKintosh. 2004. Dynamics of rigid and flexible extended bodies in viscous films and membranes. *Physical Review Letters* 93.
 - 34. Czogalla, A., D. J. Kauert, R. Seidel, P. Schwille, and E. P. Petrov. 2015. DNA origami nanoneedles on freestanding lipid membranes as a tool to observe isotropic-nematic transition in two dimensions. *Nano Lett* 15:649-655.**
 35. Vink, R. L. C. 2009. The isotropic-to-nematic transition in a two-dimensional fluid of hard needles: a finite-size scaling study. *Eur Phys J B* 72:225-231.
 36. Hore, M. J. A., and R. J. Composto. 2010. Nanorod Self-Assembly for Tuning Optical Absorption. *ACS Nano* 4:6941-6949.
 37. Yoo, P. J., K. T. Nam, J. F. Qi, S. K. Lee, J. Park, A. M. Belcher, and P. T. Hammond. 2006. Spontaneous assembly of viruses on multilayered polymer surfaces. *Nat Mater* 5:234-240.
 38. Jordens, S., L. Isa, I. Usov, and R. Mezzenga. 2013. Non-equilibrium nature of two-dimensional isotropic and nematic coexistence in amyloid fibrils at liquid interfaces. *Nat Commun* 4.
 39. Frost, A., R. Perera, A. Roux, K. Spasov, O. Destaing, E. H. Egelman, P. De Camilli, and V. M. Unger. 2008. Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell* 132:807-817.

40. Qualmann, B., D. Koch, and M. M. Kessels. 2011. Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *EMBO J* 30:3501-3515.
41. Zhao, H., A. Pykalainen, and P. Lappalainen. 2011. I-BAR domain proteins: linking actin and plasma membrane dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 23:14-21.
42. Pykalainen, A., M. Boczkowska, H. Zhao, J. Saarikangas, G. Rebowski, M. Jansen, J. Hakanen, E. V. Koskela, J. Peranen, H. Vihinen, E. Jokitalo, M. Salminen, E. Ikonen, R. Dominguez, and P. Lappalainen. 2011. Pinkbar is an epithelial-specific BAR domain protein that generates planar membrane structures. *Nat Struct Mol Biol* 18:902-907.
43. **Czogalla, A., D. J. Kauert, H. G. Franquelim, V. Uzunova, Y. Zhang, R. Seidel, and P. Schwille. 2015. Amphipathic DNA origami nanoparticles to scaffold and deform lipid membrane vesicles. *Angew Chem Int Ed Engl* 54:6501-6505.**
44. Kaufmann, A., V. Beier, H. G. Franquelim, and T. Wollert. 2014. Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly. *Cell* 156:469-481.
45. Manneville, J. B., J. F. Casella, E. Ambroggio, P. Gounon, J. Bertherat, P. Bassereau, J. Cartaud, B. Antony, and B. Goud. 2008. COPI coat assembly occurs on liquid-disordered domains and the associated membrane deformations are limited by membrane tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16946-16951.
46. Weidemann, T., R. Worch, K. Kurgonaitė, M. Hintersteiner, C. Bokel, and P. Schwille. 2011. Single cell analysis of ligand binding and complex formation of interleukin-4 receptor subunits. *Biophys J* 101:2360-2369.
47. Sorre, B., A. Callan-Jones, J. Manzi, B. Goud, J. Prost, P. Bassereau, and A. Roux. 2012. Nature of curvature coupling of amphiphysin with membranes depends on its bound density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:173-178.
48. **Czogalla, A., and A. F. Sikorski. 2005. Spectrin and calpain: a 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells. *Cell Mol Life Sci* 62:1913-1924.**
49. De Ruijter, N. C., T. Ketelaar, S. S. Blumenthal, A. M. Emons, and J. H. Schel. 2000. Spectrin-like proteins in plant nuclei. *Cell Biol Int* 24:427-438.
50. Braun, M. 2001. Association of spectrin-like proteins with the actin-organized aggregate of endoplasmic reticulum in the Spitzenkorper of gravitropically tip-growing plant cells. *Plant Physiol* 125:1611-1619.
51. **Czogalla, A., P. Kwolek, A. Hryniewicz-Jankowska, M. Nietubyc, J. Leluk, and A. F. Sikorski. 2003. A protein isolated from Escherichia coli, identified as GroEL, reacts with anti-beta spectrin antibodies. *Arch Biochem Biophys* 415:94-100.**
52. Braun, M., J. Hauslage, A. **Czogalla**, and C. Limbach. 2004. Tip-localized actin polymerization and remodeling, reflected by the localization of ADF, profilin and villin, are fundamental for gravity-sensing and polar growth in characean rhizoids. *Planta* 219:379-388.
53. Hryniewicz-Jankowska, A., A. **Czogalla**, E. Bok, and A. F. Sikorski. 2002. Ankyrins, multifunctional proteins involved in many cellular pathways. *Folia Histochem Cytobiol* 40:239-249.
54. Hryniewicz-Jankowska, A., E. Bok, P. Dubielecka, A. Chorzalska, W. Diakowski, A. Jezierski, M. Lisowski, and A. F. Sikorski. 2004. Mapping of an ankyrin-sensitive, phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine mono- and bi-layer binding site in erythroid beta-spectrin. *Biochem J* 382:677-685.
55. **Czogalla, A., A. Pieciul, A. Jezierski, and A. F. Sikorski. 2007. Attaching a spin to a protein -- site-directed spin labeling in structural biology. *Acta Biochim Pol* 54:235-244.**
56. Rabenstein, M. D., and Y. K. Shin. 1995. Determination of the distance between two spin labels attached to a macromolecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8239-8243.
57. **Czogalla, A., A. R. Jaszewski, W. Diakowski, E. Bok, A. Jezierski, and A. F. Sikorski. 2007. Structural insight into an ankyrin-sensitive lipid-binding site of erythroid beta-spectrin. *Mol Membr Biol* 24:215-224.**
58. **Czogalla, A., K. Grzymajlo, A. Jezierski, and A. F. Sikorski. 2008. Phospholipid-induced structural changes to an erythroid beta spectrin ankyrin-dependent lipid-binding site. *Biochim Biophys Acta* 1778:2612-2620.**

59. Pazdzior, G., A. Chorzalska, A. **Czogalla**, T. Borowik, A. F. Sikorski, and M. Langner. 2009. Fluorescence approach to evaluating conformational changes upon binding of beta-spectrin ankyrin-binding domain mutants with the lipid bilayer. *Gen Physiol Biophys* 28:283-293.
60. Davis, L., K. Abdi, M. Machius, C. Brautigam, D. R. Tomchick, V. Bennett, and P. Michaely. 2009. Localization and structure of the ankyrin-binding site on beta2-spectrin. *J Biol Chem* 284:6982-6987.
61. Ipsaro, J. J., L. Huang, and A. Mondragon. 2009. Structures of the spectrin-ankyrin interaction binding domains. *Blood* 113:5385-5393.
62. Stabach, P. R., I. Simonovic, M. A. Ranieri, M. S. Aboodi, T. A. Steitz, M. Simonovic, and J. S. Morrow. 2009. The structure of the ankyrin-binding site of beta-spectrin reveals how tandem spectrin-repeats generate unique ligand-binding properties. *Blood* 113:5377-5384.
63. **Czogalla**, A., and A. F. Sikorski. 2010. Do we already know how spectrin attracts ankyrin? *Cell Mol Life Sci* 67:2679-2683.
64. Wolny, M., M. Grzybek, E. Bok, A. Chorzalska, M. Lenoir, A. **Czogalla**, K. Adamczyk, A. Kolondra, W. Diakowski, M. Overduin, and A. F. Sikorski. 2011. Key amino acid residues of ankyrin-sensitive phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine-lipid binding site of beta-spectrin. *PLoS One* 6:e21538.
65. Kolondra, A., M. Lenoir, M. Wolny, A. **Czogalla**, M. Overduin, A. F. Sikorski, and M. Grzybek. 2010. The role of hydrophobic interactions in ankyrin-spectrin complex formation. *Biochim Biophys Acta* 1798:2084-2089.
66. Moravcevic, K., C. L. Oxley, and M. A. Lemmon. 2012. Conditional peripheral membrane proteins: facing up to limited specificity. *Structure* 20:15-27.
67. Tittel, J., T. Welz, A. **Czogalla**, S. Dietrich, A. Samol-Wolf, M. Schulte, P. Schwille, T. Weidemann, and E. Kerkhoff. 2015. Membrane targeting of the Spir. formin actin nucleator complex requires a sequential handshake of polar interactions. *J Biol Chem* 290:6428-6444.
68. **Czogalla**, A. 2009. Oral cyclosporine A--the current picture of its liposomal and other delivery systems. *Cell Mol Biol Lett* 14:139-152.
69. Meissner, J. M., M. Toporkiewicz, A. **Czogalla**, L. Matuszewicz, K. Kuliczowski, and A. F. Sikorski. 2015. Novel antisense therapeutics delivery systems: In vitro and in vivo studies of liposomes targeted with anti-CD20 antibody. *J Control Release* 220:515-528.
70. **Czogalla**, A., K. Kuliczowski, J. Meissner, A. Sikorski, and M. Toporkiewicz. New targeted liposomal form of oligonucleotide-polyethyleneimine complex where complex is encapsulated with lipid bilayer, useful for producing drug for human blood neoplastic diseases treatment. WROCLAWSKIE CENT BADAN EIT & SP ZOO (WROC-Non-standard). 18. Patent Numbers: WO2015160270-A1 ; PL407947-A1

Aleksander Czogalla