

Autoreferat

Dominik Drabik

Katedra Inżynierii Biomedycznej

Wydział Podstawowych Problemów Techniki

Politechnika Wrocławska

Spis Treści

1. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.....	3
2. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
3. Omówienie osiągnięć	5
3.1. Tytuł osiągnięcia	5
3.2 Wprowadzenie.....	5
3.3 Właściwości wyłaniające błony lipidowej	10
3.4 Organizacja błony, a jej homeostaza	23
3.5 Konsekwencje zaburzenia homeostazy właściwości błony.....	30
3.5 Podsumowanie.....	32
3.6 Bibliografia.....	37
4. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.	40
5. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.....	44
6. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.	49
6.1 Międzynarodowe i krajowe nagrody oraz stypendia za działalność naukową	49
6.2 Ukończone szkolenia i zdobyte certyfikaty.....	50

1. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Doktor Dyplom uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych z wyróżnieniem w dyscyplinie Inżynieria Biomedyczna nadany uchwałą Komisji ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Inżynieria Biomedyczna na Politechnice Wrocławskiej w dniu 3 czerwca 2020 r.

Tytuł rozprawy doktorskiej: Rozwój metod doświadczalnych do wyznaczania parametrów mechanicznych błon lipidowych

Promotor: prof. dr hab. inż. Marek Langner.

Magister Inżynier Dyplom ukończenia studiów II-stopnia na kierunku Fizyka Techniczna w specjalności Nanoinżynieria z wynikiem bardzo dobrym. Uzyskanie tytułu magistra inżyniera w dniu 9 lipca 2014r.

Praca: „Dyfuzja agregatów lipidowych badana techniką fluorescencyjnej spektroskopii korelacyjnej”

Promotor: dr inż. Magdalena Przybyło

Inżynier Dyplom ukończenia studiów I-stopnia na kierunku Fizyka Techniczna w specjalności Nanoinżynieria z wynikiem bardzo dobrym. Uzyskanie tytułu inżyniera w dniu 29 stycznia 2013.

Praca: „Charakterystyka stabilności mikroelektromechanicznych krzemowo germanowych rezonatorów (MEMS)”

Promotor: dr hab. inż. Ewa Rysiakiewicz-Pasek

2. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Politechnika Wrocławska

10.2020-obecnie Adiunkt badawczo-dydaktyczny, Katedra Inżynierii Biomedycznej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska.

10.2018-09.2019 Stypendysta-doktorant w projekcie Etiuda, Katedra Inżynierii Biomedycznej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska.

12.2016-06.2019 Stypendysta-doktorant w projekcie Opus, Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska.

03.2017-03.2019 Asystent naukowy, Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska.

Uniwersytet Wrocławski

07.2020-06.2023 Adiunkt badawczy, Zakład Cytobiochemii, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski. Zatrudnienie jako wykonawca w projekcie NCN Sonata Bis zatytułowanym „Molecular mechanisms of selectivity for membrane signaling lipids: phosphatidic acid and ceramide-1-phosphate”.

Instytut Koloidów i Interfejsów Maxa Plancka

02-05.2022 Gościnny post-doc, Laboratorium Biofizyki, Instytut Koloidów i Interfejsów Maxa Plancka, Poczdam, Niemcy. W ramach pobytu realizowano projekt zatytułowany „Mechanical characterization of phosphatidic-acid-enriched model asymmetrical membranes using micropipette aspiration technique”.

Centrum Nauk Fizycznych i Technologii (FTMC)

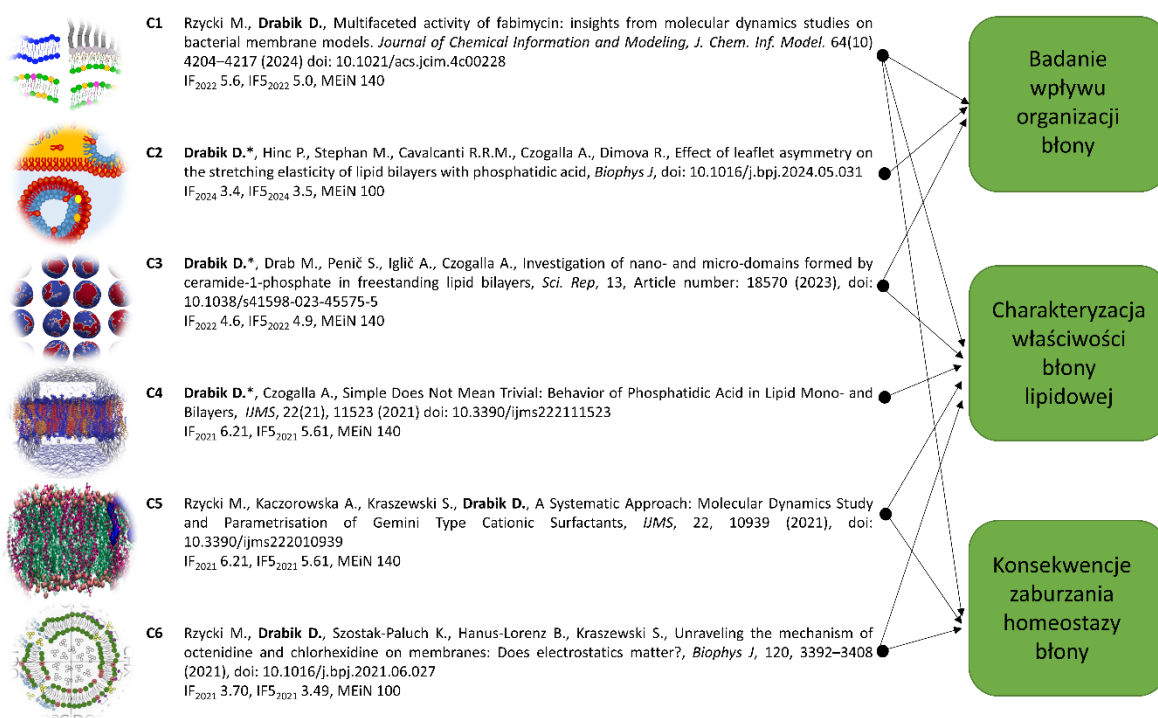
05-11.2019 Staż naukowy, Departament Nano-inżynierii, Centrum Nauk Fizycznych i Technologii, Wilno, Litwa. W ramach pobytu realizowano projekt Etiuda zatytułowany “Mechanical characterization of phosphatidic-acid-enriched model asymmetrical membranes using micropipette aspiration technique”.

Międzyuczelniane Centrum Mikroelektroniki (IMEC)

06-09.2012 Młodszy Badacz, Relability Department, Interuniversity Microelectronics Centre (IMEC), Heverlee, Belgia.

3. Omówienie osiągnięć

Sekcja ta przedstawia cykl sześciu powiązanych tematycznie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Niniejszy autoreferat zawiera merytoryczne ujęcie mojego osiągnięcia naukowego, jak i w sposób precyzyjny określa mój wkład w powstanie cyklu sześciu prac naukowych obejmujących trzy zagadnienia badawcze zgodnie ze schematem zilustrowanym na Rys. 1. Sumaryczny IF cyklu publikacji wynosi **29.72**, natomiast sumaryczna liczba punktów MNiSW cyklu wynosi **760**.



Rys 1. Powiązanie artykułów zaprezentowanych w cyklu z omawianymi zagadnieniami w autoreferacie.

3.1. Tytuł osiągnięcia

Konsekwencje zaburzenia homeostazy parametrów błony lipidowej dla jej funkcjonalności, stabilności i organizacji

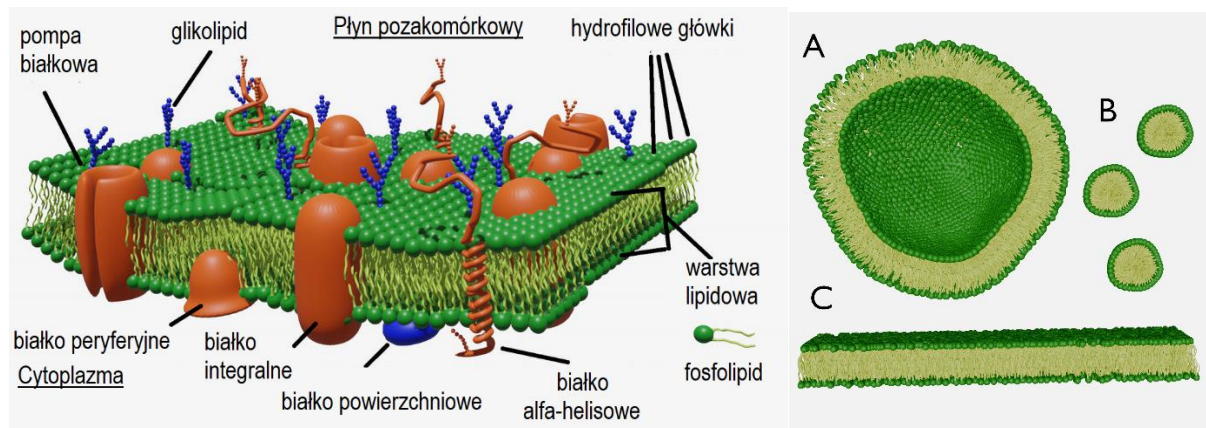
3.2 Wprowadzenie

Błony komórkowe, stanowiące zewnętrzną otoczkę każdej komórki, są niezbędnym elementem umożliwiającym jej funkcjonowanie. Jeszcze 30 lat temu ich roli przypisywano mniejsze znaczenie niż dzisiaj, a je same postrzegano jako pasywne rusztowanie komórek nie mające szczególnego wpływu na ich funkcjonowanie. W ostatnich latach to podejście się diametralnie zmieniło. Obecnie wiemy, że błony komórkowe pozwoliły na uformowanie i funkcjonowanie życia komórkowego w znany nam sposób [1]. W jednej z dotyczących hipotez ambiogenezy zlokalizowane w otworach hydrotermalnych w oceanach lub na masach lądowych wulkanów aminokwasy nie były w stanie przetrwać poza swoim naturalnym środowiskiem. Synergia z amfifilowym przodkiem lipidów pozwoliła na stworzenie otoczki,

która chroniła je przed zewnętrznymi czynnikami tworząc tak zwaną proto-komórkę [2, 3]. Jedną z podstawowych i niezaprzeczalnych funkcji współczesnych błon komórkowych jest bycie selektywną i ochronną barierą pomiędzy wnętrzem i zewnątrz komórki. Selektywną w tym znaczeniu, że dzięki mechanizmowi transportu aktywnego (pompy) i masowego, i pasywnego, umożliwia on precyzyjne dostarczanie materiałów niezbędnych do jej życia oraz wydzielanie produktów przemiany materii. Aktywny transport odbywa się przez zlokalizowane w błonie pompy. Same pompy pozwalają również na wytworzenie gradientu jonów, co pozwala na utrzymanie potencjału błonowego niezbędnego dla przebiegu transbłonowych procesów metabolicznych. Poza opisanym aktywnym transportem, błony są zdolne też do transportu masowego (z angielskiego: *bulk transport*), czyli endocytozy i egzocytozy, oraz transportu pasywnego, czyli dyfuzji międzybłonowej i osmozy. Z kolei rola ochronna błony jest szczególnie widoczna w przypadku mikrobów. Mikroby występują na całym globie ziemskim, a także wewnątrz organizmów żywych. Ich przystosowanie się do tak ekstremalnych warunków odbywa się poprzez wydzielanie pęcherzyków błonowych. Ich mechanizm polega na rozprzestrzenianiu czynników wirulencji, w tym toksyn i enzymów degradacyjnych, do środowiska pozakomórkowego. Po uwolnieniu pęcherzyki działają ofensywnie jako mechanizm dostarczania czynników wirulencji, a także defensywnie, wspomagając kolonizację gospodarza i przetrwanie organizmu w nieprzyjnym środowisku [4]. Błony posiadają również zdolność do przyjmowania złożonych kształtów, a w konsekwencji do fluktuacji i pofałdowania, co pozwala na znaczące zwiększenie powierzchni aktywnej, na której mogą zachodzić procesy biochemiczne. Jest to szczególnie widoczne w wewnętrznych błonach mitochondrium, w których pofałdowana błona pozwala na upakowanie adenozyno-5'-trifosforanów, które to pośredniczą w przekazywaniu energii za pomocą syntezy ATP w ADP i umożliwiają oddychanie komórkowe [5]. Podobną organizację można zaobserwować w chloroplastach, jednak rolę błony wewnętrznej w mitochondrium przejmuje błona tylakoidowa [6]. Sam kształt błony może również być wyzwalaczem procesów biologicznych, jak to pokazano na przykładzie białka K-Ras. Jest to małe białko z rodziny białek G zakotwiczone w błonie plazmatycznej, które reguluje proliferację komórek. Wykazano, że występowanie onkogennego mutantu białka K-Ras, K-RasG12V, jest preferowane w płaskich błonach o niskiej krzywiznie. Koreluje to z większą stymulacją wzrostu i proliferacji płaskich komórek [7]. Błony lipidowe odpowiadają też pośrednio za komunikację międzykomórkową – spontanicznie tworzone nano-platformy sygnalizacyjne, i w konsekwencji agregacja na nich białek odpowiadających za komunikację takich jak kinazy serynowo-treoninowe pozwalają na wysyłanie i odbieranie informacji za pomocą sygnałów elektrochemicznych [8]. Błony stanowią też płaszczyznę, umożliwiającą powstawanie kompleksów białkowo-błonowych, co zademonstrowano na przykładzie fosfolipaz A₂ (dokładnie na przykładzie połączenia dwóch enzymów GIVA cPLA2 oraz GIVA iPLA2 w symulacji z błoną POPC) [9].

Błony komórkowe, chociaż różnią się między sobą składem w zależności od organu czy komórki, mają wspólne podstawowe elementy budulcowe. Podstawowy skład każdej błony to cząsteczki lipidów ustrukturyzowanych w podwójną błonę (zwaną dwuwarstwą) dzięki efektowi hydrofobowemu, różne białka, które się w niej znajdują oraz cukry. Większość błon plazmatycznych składa się w około 50% z lipidów i w 50% z białek, przy czym części

węglowodanowe glikolipidów i glikoprotein stanowią od 5 do 10% masy błony [10]. W przypadku lipidów jest to dość obszerna grupa cząsteczek, w ujęciu z perspektywy błony, składająca się przede wszystkim z fosfolipidów, a w następnej kolejności z glikolipidów, steroli, pozostałych kwasów tłuszczowych i lipidów. W podgrupie fosfolipidów, w zależności od różnic w budowie główki lipidowej mamy najpowszechniej występującą fosfatydylocholinę (odpowiada za regulowanie fizycznych właściwości błony) oraz fosfatydyloetanoloaminę (reguluje krzywiznę błony i ciśnienie na błonie), a także mające znacznie mniejszy udział ilościowy fosfatydyloserynę (utrata jej asymetrycznego rozkładu indukuje apoptozę), fosfatydyloglicerol (zapewnia płynność i stabilność błony), kwas fosfatydowy (odpowiedzialny za syntezę *de novo* lipidów i udział w kaskadzie sygnalizacji wewnątrzkomórkowej) oraz fosfatydyloinozytole (cząsteczki sygnałowe oraz pośredniczące w transporcie przez błonę). Glikolipidy są cząsteczkami zbudowanymi z lipidowej części, do której przyłączone są fragmenty cukrowe. Przykładem takiej cząsteczki jest lipopolisacharyd (LPS), składający się z lipidowej części nazwanej lipidA, rdzenia łączącego oraz O-antygeny będącego powtarzalnym polisacharydem powiązanym wiązaniami glikozydowymi. Do kategorii innych kwasów tłuszczowych i lipidów można zakwalifikować przede wszystkim sfingolipidy (alternatywne cząsteczki sygnałowe, posiadające niezależne od fosfolipidów ścieżki syntezy), sterole (w szczególności cholesterol występujący w komórkach eukariotycznych, ergosterol - w grzybach, fitosterole - w roślinach oraz hopanoidy - w komórkach prokariotycznych; mają one duży wpływ na organizację i sztywność błony) oraz bardziej „egzotyczne” lipidy specyficzne dla danego typu komórki jak na przykład lipidy fenolowe. W zależności od przyjętej klasyfikacji rozpuszczalne w błonach sterydy i hormony (takie jak calciferol, filochinon czy menachinon) mogą również być uznane jako tłuszcze. Różnorodność budowy i licznosc elementów składowych sprawiają, że określenie konkretnego wpływu poszczególnego składnika na jej zachowanie bywa utrudnione (Rys2, lewy panel). W tym celu stosuje się w badaniach biofizycznych uproszczone modele błon biologicznych. Są to błony lipidowe – sztucznie stworzone błony składające się z precyzyjnie zdefiniowanego składu lipidowego i (jeśli istnieje taka konieczność) odpowiednich białek. W zależności od metody preparatyki, spotykamy się z trzema podstawowymi strukturami. Pierwszym z nich jest liposom (Rys 2, prawy panel A) – sferyczny pęcherzyk składający się z dwuwarstwy lipidowej. W wewnętrznej części znajdują się hydrofobowe łańcuchy acylowe, które są zarówno od zewnątrz jak i wewnątrz chronione przed kontaktem z polarnymi cząsteczkami wody za pomocą hydrofilowych główek. Liposomy występują w licznych wariacjach w zależności od rozmiaru (małe pęcherzyki o średnicy do 100 nm, duże pęcherzyki o średnicy od 100 do 500 nm oraz mikroliposomy o średnicach powyżej 0.5 μm) oraz złożoności przestrzennej (jednowarstwowe, wielowarstwowe oraz oligopęcherzykowe). Najczęściej spotykaną notacją jest trzyliterowy skrót, np. GUV, gdzie pierwsza litera oznacza rozmiar (S-small, L-large, G-giant), druga litera organizację przestrzenną (U-unilamellar, M-multilamellar, O-oligo-vesicular), a trzecia jest po prostu skrótem od angielskiej nazwy pęcherzyka (V-vesicles).



Rys 2. Lewy panel: Złożoność błony komórkowej. Prawy panel: Uproszczone modele błony lipidowej z uwzględnieniem najczęściej spotykanych struktur samo-organizacyjnych: (A) Liposom, (B) Micele, (C) Błona lipidowa.

Drugim powszechnie spotykanym sposobem organizacji lipidów są micle (Rys 2, prawy panel B). Są to bardzo małe pęcherzyki składające się tylko z jednej warstwy lipidowej z łańcuchami acylowymi zorientowanymi do wewnątrz pęcherzyka. W wyniku tego ich rozmiar jest ograniczony, nie posiadają również możliwości transportu substancji hydrofilowych. Zarówno liposomy jak i micle mogą swobodnie występować w roztworze. Jest to przewaga nad trzecią powszechnie spotykaną organizacją lipidów, czyli planarną błoną lipidową (Rys 2, prawy panel C). Planarne ustrukturyzowanie błony jest powszechnie stosowane we wszelkiego rodzaju symulacjach, np. z wykorzystaniem dynamiki molekularnej czy Monte Carlo. W warunkach eksperymentalnych planarne błony osiąga się poprzez osadzanie lipidów na specjalnie do tego przygotowanych wspierających podłożach. Mamy wtedy do czynienia z wspieranymi błonami lipidowymi (SLB, z angielskiego: *supported lipid bilayers*). Warto jednak zwrócić uwagę, że dokonywanie charakteryzacji SLB jest zagadnieniem dość kontrowersyjnym, a powszechna jest opinia, że błona wsparta na podłożu ze złota czy pokrytego sfunkcjonalizowanymi białkami lub zawieszona na porowatej powierzchni nie będzie zbliżona w swoich właściwościach fizykochemicznych do swobodnie organizującej się błony jak na przykład w przypadku liposomu. Poza tymi trzema najpowszechniejszymi organizacjami lipidów istnieją również inne, często zaplanowane do konkretnych badań lub realizacji konkretnego eksperymentu. Jako przykład można tutaj podać nano-dyski lipidowe, niewielkie dyski składające się z lipidów ustrukturyzowanych za pomocą białek stabilizujących (np. białka MSP takie jak apolipoproteina), służące do badania białek transbłonowych (integralnych) w zbliżonych do naturalnych warunkach.

Niezależnie od sposobu ustrukturyzowania, błony lipidowe są, w ujęciu biofizycznym, obiektem materii miękkiej o określonych właściwościach fizykochemicznych. Z kolei prawidłowa fizjologia błony wymaga zachowania określonych właściwości biofizycznych [11, 12]. Prowadzi to do powstania pojęcia homeostazy błony, a dokładniej mówiąc homeostazy parametrów błony lipidowej, czyli stanu równowagi szerokiego zakresu właściwości fizykochemicznych błony celem umożliwienia jej prawidłowego fizjologicznego funkcjonowania.

Podczas swoich badaniach zaobserwowałem, że jeżeli dojdzie do niewielkiego zaburzenia równowagi parametrów, to błony są w stanie spontanicznie ją odzyskiwać na przykład przez lokalną zmianę składu lipidowego [13]. Natomiast duże odchylenie może już doprowadzić do zaburzenia funkcjonowania błony, a w skrajnym przypadku, do nieodwracalnego zaburzenia jej organizacji i/lub funkcjonowania. Doprowadziło to do tego, że zacząłem badać efekty takich zaburzeń, które to nazwałem zaburzeniem homeostazy parametrów błony. Określam tak na tyle znaczącą zmianę przynajmniej jednego parametru opisującego właściwości błony lipidowej, że znacząco utrudniony jest powrót do wartości optymalnej za pomocą na przykład wspomnianej wcześniej lokalnej zmiany składu lipidowego. Tego typu zmiana może doprowadzić do poważnych i potencjalnie nieodwracalnych zmian w funkcjonowaniu błony komórkowej. Przykładami takich zmian są między innymi utrata przepuszczalności błony lub zaburzenie jej organizacji [14]. Podejrzewa się, że choroby neurodegeneracyjne, takie jak Alzheimer, są po części wynikiem utraty homeostazy właściwości błony i idącą za nimi utratą jej funkcji [15]. Pokazano zarówno nie wprost na przykładzie macierzy zewnątrzkomórkowej [16, 17] jak i wprost na błonach [18, 19], że zmiana właściwości błony jest też powiązana z procesem starzenia. Wraz z wiekiem właściwości błony oddalają się od optymalnej dla siebie homeostazy, przez co ich funkcje są coraz gorzej realizowane. Zmiany, które skutkują zwiększeniem ciśnienia lub napięcia na błonie mogą nawet doprowadzić do nieodwracalnego pęknięcia błony [20].

Opis tej tematyki podzieliłem na trzy części:

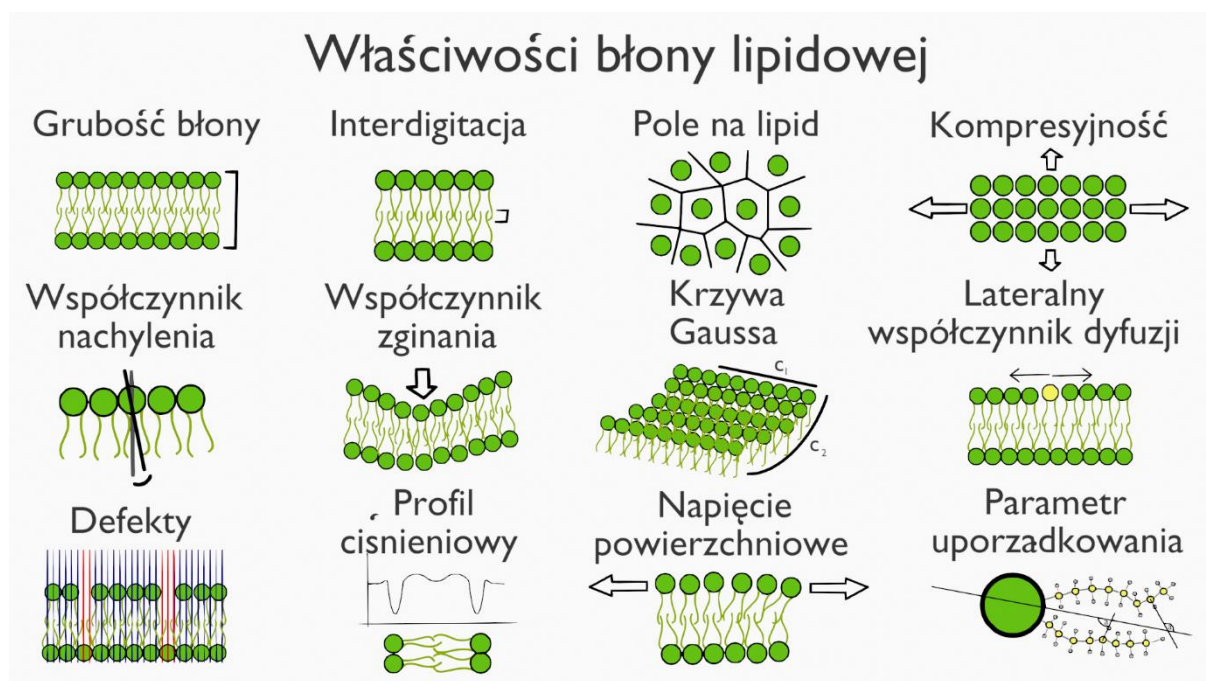
W ramach pierwszej części opiszę parametry fizykochemiczne błony z wyszczególnieniem moich osiągnięć w tym temacie. W głównym zakresie będę się skupiał na podejściu opartym na charakterystyce błony z wykorzystaniem metody dynamiki molekularnej, a przeprowadzone przeze mnie eksperymenty będę przywoływał w ramach weryfikacji czy otrzymane parametry mają pokrycie w układzie rzeczywistym.

W ramach drugiej części zwrócę uwagę na wpływ organizacji przestrzennej na właściwości fizykochemiczne błony, w szczególności na występowanie domen i asymetrię błony.

W ramach trzeciej części przedstawię skutki zaburzenia homeostazy błony biologicznej, zarówno na przykładach literaturowych jak i w przeprowadzonych przeze mnie badaniach.

3.3 Właściwości wyłaniające błony lipidowej

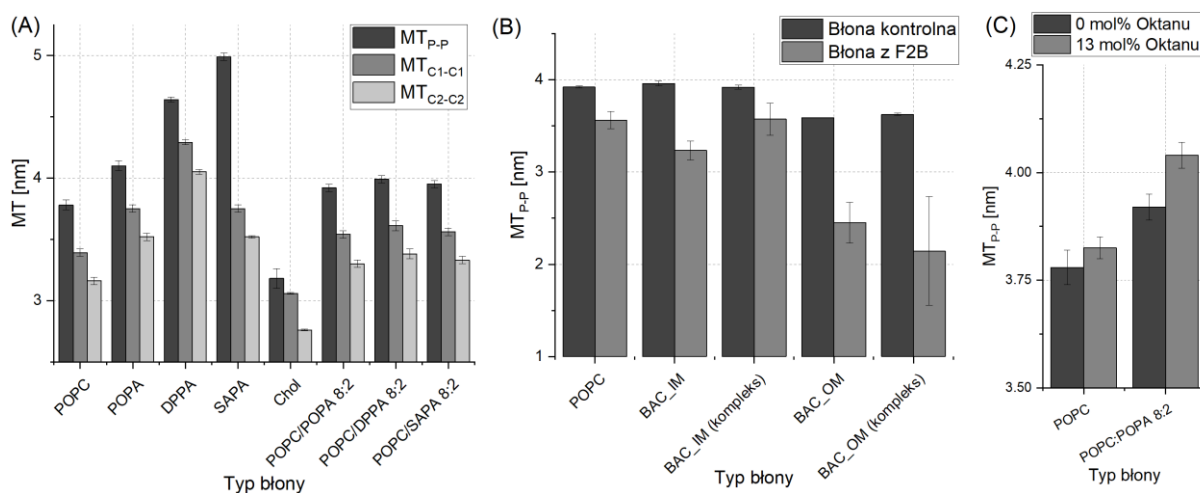
Błona lipidowa jest elementem powstałym wskutek złożenia z mniejszych cząsteczek – lipidów. Pozwala to na zróżnicowane podejście do opisu jej właściwości. Najprostszym podejściem wydaje się charakterystyka elementów budulcowych, lipidów. Jednakże, tego typu podejście byłoby niewystarczające, gdyż ignorowałoby tak zwane właściwości wyłaniające się lub właściwości emergentne (z angielskiego: *emerging properties*) – są to właściwości które nie są widoczne w poszczególnych elementach systemu, ale pojawiają się dopiero gdy owe elementy zostaną połączone. Przykład dokładnie wykonanej przeze mnie charakterystyki systemów z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej znajduje się np. w pracy [C4]. Schematy przedstawiające zobrazowany charakter omawianych właściwości są przedstawione na rysunku 3. Warto tutaj zwrócić uwagę, że rzadkim podejściem jest tak gruntowna charakterystyka błony, w pracach przeważnie jest ona ograniczona do pojedynczych parametrów. W swoich badaniach skupiłem się na złożonej charakterystyce parametrów błon, która to pozwala mi na obserwację homeostazy (lub jej zaburzeń) w ramach każdego z parametrów.



Rys 3. Poglądowy rysunek przedstawiający wizualizację wyznaczanych parametrów w prezentowanej w tym autoreferacie charakterystyki błony lipidowej.

Grubość i zazębienie błony. Pierwszym z opisywanych właściwości błony jest jej **grubość**. Wbrew intuicyjnemu wnioskowi, że jest to po prostu suma długości składowych lipidów po obu stronach, wartość ta potrafi się znacząco różnić w zależności od przyjętych punktów odniesienia. Jest ona miarą oddziaływania między łańcuchami acylowymi cząsteczek lipidowych między warstewkami. Istnieją doniesienia pokazujące zależność między wahaniami grubości błony, a różnymi krytycznymi zjawiskami błonowymi takimi jak wymiana komórkowa, tworzenie porów i wiązanie białek, które są ściśle związane z funkcjonalnością komórek [21]. Wykazano też zależność między grubością błony a jej płynnością i przepuszczalnością [22]. W ujęciu biologicznym zmiany grubości błony mogą prowadzić do

powstawania domen sygnalizacyjnych przez lateralne przeniesienie małych zakotwiczonych w lipidach białek Ras1 i H-Ras z rodziny GTPaz z tratw lipidowych [23]. Zmiana tego typu może nastąpić np. w zjawisku niedopasowania hydrofobowego, czyli sytuacji, w której hydrofobowa grubość regionu transbłonowego białka nie odpowiada hydrofobowej grubości błony, w której jest zlokalizowana. Z kolei w ujęciu biofizycznym, zmniejszenie grubości błony prowadzi do zmniejszenia bariery energetycznej, co ułatwia wbudowywanie się białek do błony [24]. W pracy [C4] dla wybranych błon przyjąłem trzy punkty odniesień – fosfor (P) oraz atomy węgla C1 i C2. Jak pokazano na rysunku 4.A, wybór ten znacząco wpływa na wartość. W przypadku błony złożonej z lipidów SAPA (18:0-20:4) różnica między grubością błony wynosi 1.24 nm. Uwzględnienie tego czynnika jest szczególnie krytyczne przy porównywaniu wartości do parametrów eksperymentalnych. Z racji, że grubość badanych przeze mnie błon nie została wyznaczona eksperymentalnie, to w takich przypadkach w swoich badaniach stosuję sposób liczenia grubości błony fosfor-fosfor, czyli wyliczam położenie atomów fosforu w każdej z warstw lipidowych.



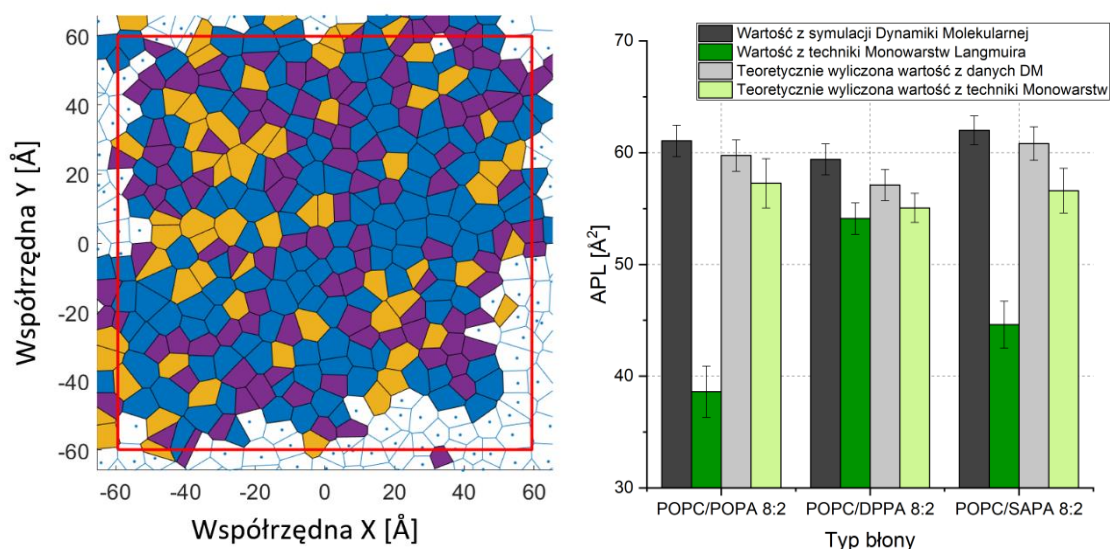
Rys 4. (A) Różnice między wyznaczonymi parametrami grubości błony w zależności od przyjętego odnośnika (z pracy [C4]), (B) różnice w grubości błony przed i po inkorporacji cząsteczki antybakteryjnej F2B (z pracy [C1]), (C) różnice między wyznaczonymi parametrami w zależności od zanieczyszczenia błony 13 mol% węglowodorem oktanem (z pracy [C2]).

W przypadku badania wpływu wbudowywania się cząsteczki do błony na jej właściwości, dodatkowy element może znacząco wpłynąć na grubość błony. Tego typu analizę wykonałem na przykładzie antybakteryjnej cząsteczki F2B w pracy [C1], a same różnice przedstawiam na rysunku 4.B. Podobne podejście zastosowałem w pracy [C5], w której to badałem wpływ różnych cząsteczek typu gemini (symetrycznych dwuogonowych detergentów) na grubość błony. Jednak w przypadku tych cząsteczek grubość błony nie była parametrem ulegającym dużej zmianie. Dodatkowo, obecność zanieczyszczeń w błonie może wpływać na jej grubość, co zademonstrowałem na przykładzie obecności oktanu w pracy [C2], a same różnice przedstawiłem na rysunku 4.C. Wadą wybranej w tej pracy eksperymentalnej metody jest podejrzenie o pozostawieniu śladowych ilości oleju mineralnego w rejonie łańcuchów acylowych. Celem weryfikacji na ile tego typu zanieczyszczenie może modyfikować parametry błony wykonałem tego typu badania. Parametr grubości błony jest też, chociaż nie wprost, powiązany z drugą właściwością błony – **interdigitacją** albo zazębieniem (z angielskiego: *interdigitation*). Zdefiniowana jest ona jako szerokość nakładania się rozkładów mas dwóch

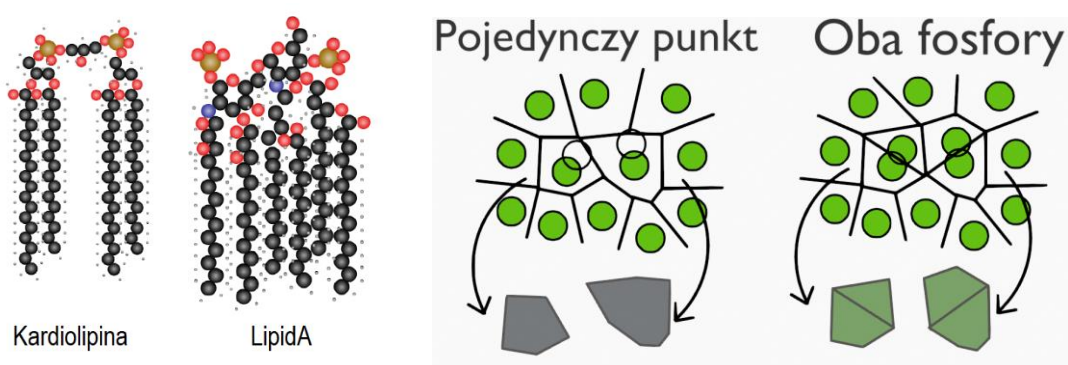
listków wzdłuż normalnej błony. Wspólnie z grubością błony daje informację na temat oddziaływania ogonów lipidowych między warstewkami błony oraz pozwala na oszacowanie występowania sprzężenia między nimi (z angielskiego: *interleaflet coupling*). Warto zaznaczyć, że łączenie tych dwóch parametrów dość rzadko występuje w literaturze, a samo występowanie sprzężenia między warstewkami jest dopiero zaczęło być uznawane jako zjawisko kilka lat temu, co sprawia, że ten rodzaj wykonywanej przeze mnie analizy jest dość unikalny. W przypadku braku obecności sprzężenia ze wzrostem grubości błony będzie obserwowany odpowiednio proporcjonalny spadek ząbienia. W przypadku braku takiej zależności mamy do czynienia ze sprzężeniem. Samo sprzężenie między-warstewkowe jest kluczowym aspektem tworzenia domen i jest potencjalnie kluczowe dla funkcjonowania biologii błony komórkowej [25].

Pole na lipid. Trzecim z powszechnie wyznaczanych parametrów błony jest „pole na lipid” (APL, z angielskiego: *area per lipid*). Sam parametr jest dość bezpośredni w swojej definicji, jest to średnie pole w błonie przypadające na pojedynczą cząsteczkę lipidu. Istnieją też wariacje tego parametru takie jak „pole na cząsteczkę” – gdy w systemie znajdują się inne cząsteczki niż lipidy czy nawet „objętość na lipid” – gdzie stosuje się przestrzenną tesselację pojedynczej molekuly celem oszacowania całej objętości w ujęciu przestrzennym. Parametr ten jest także obecnie powszechnie akceptowanym weryfikatorem czy dany system ma przełożenie w rzeczywistości. Zbyt duże odchylenie od zmierzonych eksperymentalnie wartości sugeruje problemy z symulowanym układem. Alternatywnym opisem tego parametru jest profil gęstości – im większa wartość pola na lipid tym mniejsza będzie obserwowana gęstość. Chociaż nie ma prac które by w sposób bezpośredni łączyły wartość pola na lipid z którymkolwiek aspektem funkcjonowania komórki, sam parametr jest często przedstawiany jako zależny od innych. Na przykład zaobserwowany spadek pola na lipid doprowadził do wzrostu ciśnienia na błonie oraz spadku odsłoniętych obszarów acylowych (zmniejszenie ilości defektów na błonie) [26]. Istnieje kilka sposobów wyznaczania tego parametru, z czego najbardziej powszechnym jest wyznaczenie rozmiaru symulowanego układu i podzielenie go przez liczbę cząsteczek w systemie. W swoich badaniach jednak stosuję bardziej szczegółową tesselację Voronoi, jest to podejście polegające na wyznaczeniu równoodległych punktów od każdej sąsiadującej cząsteczki, a następnie wykreślenia wielokątów dla poszczególnej cząsteczki celem wyliczenia pola dla każdej pojedynczej molekuly (Rys 5, lewy panel). Takie podejście gwarantuje większą dokładność wyznaczanych parametrów. W pracy [C4] dokonałem analizy zgodności systemów symulacyjnych z rzeczywistymi, co pokazałem na rysunku 5, panel prawy. Ponadto wyliczyłem teoretycznie wartości APL dla błon dwuskładnikowych bazując na odpowiednim stosunku lipidów oraz wartościach dla błon jednorodnych, odpowiednio dla danych z symulacji i eksperymentu, czyli np. dla błony POPC/POPA 8:2 $APL_{teoretyczne} = 0.8 \cdot APL_{POPC} + 0.2 \cdot APL_{POPA}$, gdzie APL_{POPC} i APL_{POPA} to wartości wyliczone dla błon jednorodnych. Otrzymane wyniki pokazały, że w każdym przypadku wartości otrzymane z eksperymentu były niższe niż te otrzymane w symulacjach. Co ciekawe, wartości wyliczone teoretycznie dla błon złożonych wykazały zbieżność z parametrami otrzymanymi z symulacji błony dwuskładnikowej za pomocą dynamiki molekularnej. Zbieżność ta dotyczyła zarówno teoretycznego wyliczenia na bazie danych dla błon jednorodnych z symulacji jak i jednorodnych monowarstw z eksperymentu. Tylko z eksperymentu przeprowadzonego na monowarstwie dwuskładnikowej

otrzymałem znacząco niższe wartości APL, w szczególności było to widoczne w przypadku błon POPC/POPA oraz POPC/SAPA. Zaobserwowany efekt pomiaru niższego APL przy technice eksperymentalnej w porównaniu do pozostałych podejść uzasadniłem występowaniem dwóch z. Pierwszym wyjaśnieniem była różnica w modelu błony, w technice monowarstw, jak sama nazwa wskazuje, mamy do czynienia z monowarstwami, których ogony acylowe są skierowane w górę i mają kontakt z powietrzem, a nie drugą monowarstwa, co nie ma miejsca w symulacji, gdzie jest analizowana pełna błona. Drugim wyjaśnieniem było silne sprzężenie ze sobą cząsteczek PC/PA, które z racji ograniczeń dynamiki molekularnej (każda cząsteczka jest opisana niezależnym polem siłowym, a sprzężenie cząsteczek wymaga ręcznej interwencji) nie była możliwa do zaobserwowania. Za drugim wytłumaczeniem przemawia praca w której ręcznie dokonano tego typu modyfikacji i wpłynęło to na samą błonę [27].



Rys 5. Lewy panel: Wizualizacja położenia fosforów górnej warstwy błony w danej klatce. Przeprowadzona analiza tessellację Voronoi pozwala na precyzyjną detekcję obszaru przypadającego na dany lipid. Prawy panel: Porównanie wartości APL otrzymanych z symulacji dynamiki molekularnej i eksperymentalnej techniki monowarstw. Ponadto zaprezentowano teoretyczne wyliczoną wartość z parametrów otrzymanych z homogenicznych błon (z pracy [C4]).



Rys 6. Lewy panel: Schematy budowy cząsteczek kardiolipliny i LipiduA (z pracy [C1]). Prawy panel: schematyczna wizualizacja wpływu nieuwzględnienia geometrii cząsteczki w analizie skutkująca odchyleniami w wartościach dla lipidów w błonie.

W przypadku analizy wpływu wbudowywania się cząsteczek na błonę należy zachować bardzo dużą ostrożność przy nazewnictwie parametru. Jeśli uwzględnimy cząsteczkę, to mamy do czynienia z opisanym wcześniej „polu na molekułę”. Natomiast jeśli nie interesuje nas pole cząsteczki, koniecznym jest jej uwzględnienie w analizie by nie przeszacować pola sąsiednich jej lipidów. Tego typu badania wykonałem w pracach [C1,C5]. Z racji faktu, że otrzymane wartości spełniają warunki rozkładu normalnego, średnia wartość wyliczana jako parametr z dopasowania rozkładu do histogramu z parametrów. Warto też podkreślić, że przyjęte przeze mnie podejście tessellacji Voronoi nie jest bez wad i w niektórych przypadkach może prowadzić do niedoszacowania lub przeszacowania parametru, jeśli nie zostanie to uwzględnione w analizie. Chodzi konkretnie o przypadek dużych molekuł takich jak kardiolipina czy lipidA. Jak zademonstrowano na schemacie na lewym panelu Rysunku 6, cząsteczki te są znacząco większe niż typowe lipidy oraz posiadają więcej niż jedną cząsteczkę fosforu. Przyjęcie reprezentacji jednego punktu dla tych cząsteczek prowadzi do błędnego wyznaczania pola na lipid zarówno dla niej, jak i dla cząsteczek sąsiadujących. Dlatego też musiałem usprawić to podejście - w pracach [C1, C6] wprowadziłem reprezentowanie takich cząsteczek przez dwa punkty odpowiadające położeniu fosforów i sumowaniu przypadającego pola (Rysunek 6, prawy panel).

Współczynnik zginania, energii nachylenia, kompresyjność, Gaussowska funkcja krzywizny. Kolejną grupą parametrów są parametry mechaniczne. Wyodrębnione na bazie modelu Helfricha opisują deformacje elastyczne, którym może być poddawana błona czy pęcherzyk. W klasycznym ujęciu są one dzielone na trzy składowe – napięcia zginające, napięcia kompresujące i ścinające oraz Gaussowską funkcję krzywizny odpowiadającą za kształt i jego przekształcenia. Napięcia zginające są opisane przez **współczynnik zginania** κ , który definiuje się jako energię jaką należy przyłożyć, by efektywnie wygiąć błonę. Parametr ten wyznaczam na bazie procedury fluktuacji przestrzeni rzeczywistej (z angielskiego: *real-space fluctuations*), którą to opracowałem jeszcze w trakcie mojego doktoratu. Podejście to pozwala na dodatkowe wyznaczenie **energii nachylenia**, który jest empirycznym parametrem służący jako miara sił powiązanych z przechyleniem danego typu molekuly/lipidu w błonie. Im większa jest wartość energii nachylenia tym większa bariera dla cząsteczki by nastąpiło jej odchylenie. Z kolei napięcia kompresujące, opisywane przez **kompresyjność** K_A , opisują odporność błony na zewnętrzne siły i naciski. Chociaż istnieje metoda liczenia tego parametru z fluktuacji rozmiaru symulowanego systemu, ma ona dość ograniczone zastosowanie oraz jej wynik zależy od przyjętego początkowego punktu referencyjnego. Zamiast tego w pracy [C4] zaimplementowałem metodę bazującą na fluktuacjach grubości błony [28]. W tym podejściu parametr a (odpowiadający opisanemu wcześniej polu na lipid APL) w członie równania Helfricha odpowiadającym za energię wychylenie pola błony od równowagi jest zastępowany grubością błony wykorzystując zależność $APL = V/MT$, gdzie V to objętość lipidu. Następnym krokiem przeprowadzana jest redukcja objętości z równania. Kroki te zaprezentowano w równaniu 1 (L określa odpowiednio górną i dolną warstwę błony). Następnie stosuje się przejście na zapis termodynamiczny za pomocą zasady ekwipartycji energii $\langle E \rangle = (0.5) \cdot k_B T$ (równanie 2, k_B to stała Boltzmannna, T to temperatura). Ponieważ energię E można też wyrazić jako energię stanu zdeformowanego na podstawie zasad mechaniki statystycznej, możliwe jest przejście z opisu termodynamicznego (wychyleń od

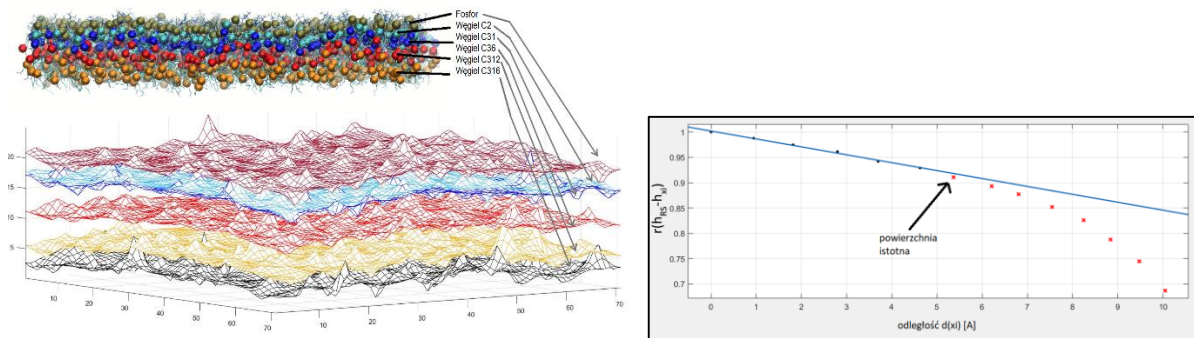
równowagi) do statystycznego (populacji wychyleń). W związku z tym prawdopodobieństwo danego zdarzenia można zdefiniować przez $p(\Delta apl/apl_o) = C \cdot \exp(-E/k_B T)$. Po implementacji podobnego przejścia dla zapisu fluktuacji grubości i po uporządkowaniu równania otrzymujemy zależność przedstawioną w równaniu 3.

$$E^L = \frac{1}{2} K_A^L APL_0^L \left(\frac{APL^L - APL_0^L}{APL_0^L} \right)^2 = \frac{1}{2} K_A^L APL_0^L \left(\frac{V/mt^L - V/mt_0^L}{V/mt_0^L} \right)^2 = \frac{1}{2} K_A^L APL_0^L \left(\frac{mt_0^L - mt^L}{mt^L} \right)^2 \quad (1)$$

$$K_A^L = \frac{1}{APL_0 \left(\frac{(mt^L - mt_0^L)^2}{(mt^L)^2} \right)} k_B T \quad (2)$$

$$-\frac{2k_B T}{APL_0^L} \ln p \left(\frac{mt_0^L - mt^L}{mt^L} \right) = K_A^L \left(\frac{mt_0^L - mt^L}{mt^L} \right) + C' \quad (3)$$

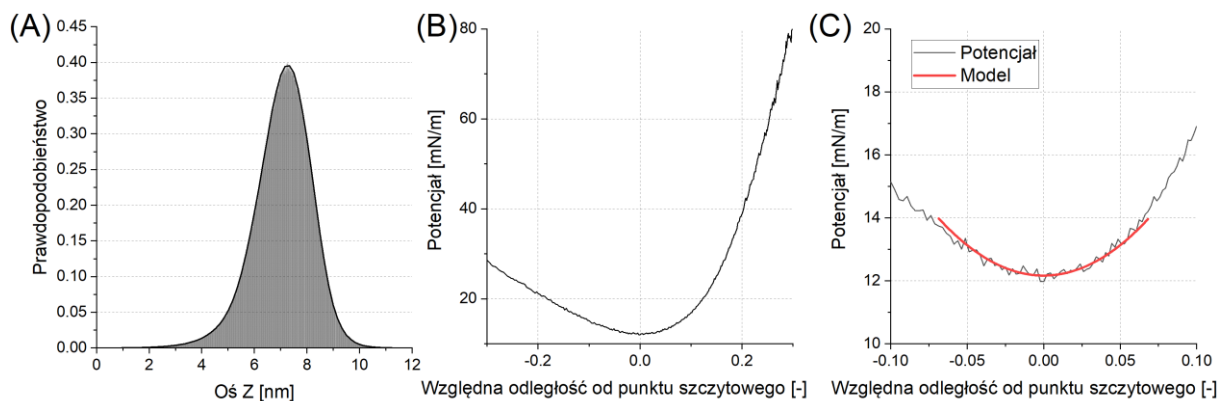
W podejściu krytyczna jest identyfikacja płaszczyzny referencyjnej. Jest to spowodowane tym, że powierzchnie blisko interfejsy (woda/lipid) fluktuują mniej z powodu napięcia międzyfazowego, z kolei im niższa powierzchnia (im bliżej środka błony) tym większe fluktuacje z powodu zwiększonej płynności łańcuchów lipidowych wokół płaszczyzny błony. W wyniku tego w zależności od wybranej powierzchni mamy do czynienia albo z tłumieniem fluktuacji (i niedoszacowaniem kompresyjności) albo ze zbyt dużą swobodą (i przeszacowaniem kompresyjności). W celu detekcji właściwej płaszczyzny wyznacza się pierwszą płaszczyznę dla pierwszego atomu węgla niepowiązanego z tlenem, następnie dla każdej kolejnej płaszczyzny i wyznacza się korelację z pierwszą płaszczyzną i liczy nachylenia w funkcji odległości między nimi. Następnie liczy się średnią nachyleń dla wszystkich powierzchni do powierzchni i . Jeśli nachylenie powierzchni i ma odchylenie od uśrednionego o więcej niż 10%, to dana pierwsza płaszczyzna i spełniająca ten warunek jest poszukiwaną płaszczyzną istotną. Proces ten zwizualizowano na rysunku 7.



Rys 7. Lewy panel: Określenie płaszczyzn referencyjnych dla wybranych atomów. Płaszczyzna fosforów zademonstrowana jedynie w celach wizualizacyjnych. Prawy panel: Średnia nachyleń dla powierzchni w funkcji odległości z zaznaczeniem poszukiwanej powierzchni.

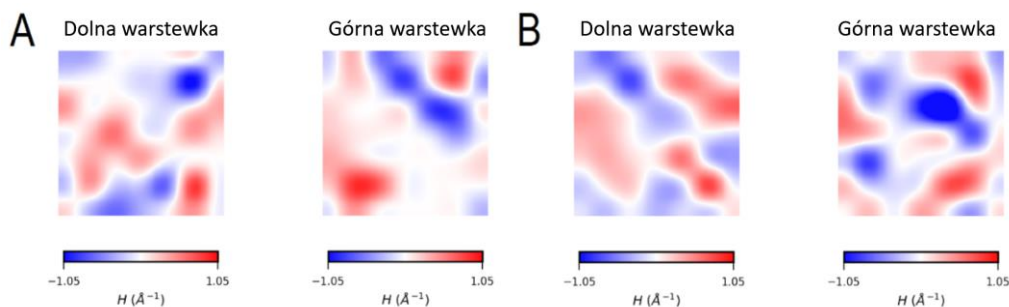
W kolejnych krokach następuje wyznaczenie lokalnych fluktuacji grubości dla każdego punktu siatki dla każdej klatki symulacji, oszacowanie rozkładu prawdopodobieństwa dla populacji i wyznaczenie wartości szczytowej oraz potencjału średniej siły. Następnie wyliczony zostaje zakres relatywnych zmian grubości (od 5 do 7%) poprzez losowy wybór próbek i weryfikację za pomocą wykresów kwantyl-kwantyl zgodności wybranych próbek z populacją normalną.

W ostatnim kroku kompresyjność jest liczona z równania 3, gdzie lewy człon równania to wyznaczony potencjał średniej siły (rysunek 8). Musiałem również usprawnić algorytm wyznaczania błędów, gdyż oryginalnie bazował on na tak zwanym bootstrapping polegająca na zdefiniowaniu bloków, w których ponownie pobierane są próbki danych w czasie, jak i przestrzeni. W swoim podejściu zastosowałem jednak wyznaczanie błędów na bazie losowo wybranych klatek symulacji i iteracji tego podejścia sto razy. Takie podejście gwarantuje, w mojej ocenie, dużo dokładniejsze wyznaczenie błędu parametru.



Rys 8. (A) Histogram lokalnych fluktuacji grubości błony dla górnej warstewki dla całej symulacji. (B) Wyznaczony potencjał średniej siły. (C) Dopasowanie równania 3 celem otrzymania wartości kompresyjności K_A , która w tym przypadku wyniosła 385.6 mN/m.

W pracy [C4] pierwszy raz zastosowałem to podejście, które następnie stało się dla mnie standardową procedurą później wykorzystaną w [C1,C2]. Warto zaznaczyć, że podejście do dawało wyniki praktycznie identyczne jak te otrzymywane przez mnie eksperymentalną techniką aspiracji mikropipetą, co pokazano w pracy [C2]. Z tą eksperymentalną techniką miałem okazję zapoznać się na gościnnym post-docu w instytucie Maksa Plancka w Niemczech. Jeśli zaś chodzi o samą **Gaussowską funkcję krzywizny**, jest to parametr opisujący kształt błony, będący często wypadkową parametru upakowania pojedynczych lipidów, a wyznaczenie tego parametru bywa wyzwaniem [29]. W matematycznym sensie jest to iloczyn dwóch współrzędnych topologicznych na płaszczyźnie błony. Przez znaczący czas był to parametr czysto teoretyczny, możliwości jego wyznaczenia były, zarówno eksperymentalnie jak i symulacyjnie, dość ograniczone. Obecnie istnieją dwa podejścia do wyznaczania modułu krzywizny – całka z ciśnienia pojedynczej warstwy błony dzielona przez współczynnik zginania lub z uśrednionej siatki pochodnych położenia referencyjnych atomów. W ramach pracy [C1] zastosowałem oba podejścia, jednak w ostatecznym rozrachunku zdecydowałem się na drugie z nich z powodów wynikających z ograniczenia samych symulacji. Na rysunku 9 zaprezentowałem otrzymane parametry Gaussowskiej funkcji krzywizny przed i po wbudowaniu przykładowych cząsteczek F2B do błony.



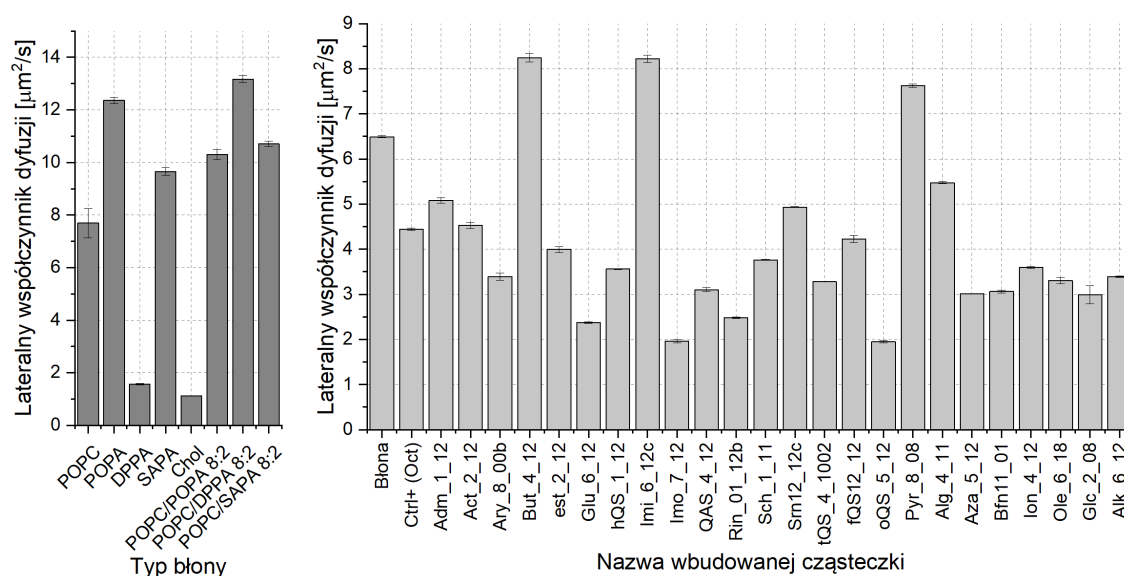
Rys 9. Średnie wartości Gaussowskiej funkcji krzywizny dla dolnej i górnej warstwy (A) przed i (B) po wbudowaniu antybakteryjnej cząsteczki F2B.

Jeśli chodzi o sam wpływ mechaniki błony na jej zachowanie, istnieje szereg takich przykładów. Jednak z racji faktu, aby nie doszło do tematycznego odwoływania się do mojej rozprawy doktorskiej której celem było wyznaczenie właściwości mechanicznych – współczynnika zginania i kompresyjności – technikami eksperymentalnymi i symulacyjnymi, to postanowiłem nie rozszerzać tego tematu w tym opisie. W tym opracowaniu skupiam się na pełnej charakterystyce błon i jej wpływowi na homeostazę parametrów. Przy okazji omawiania właściwości mechanicznych warto wspomnieć o fenomenologicznej zależności łączącej grubość błony oraz sprzężenie międzybłonowe z parametrami mechanicznymi znaną jako model szczotki polimerowej (z angielskiego: *polymer brush model*) [30, 31]. Model zaprezentowano w równaniu 3, gdzie d to grubość hydrofobowa (przeważnie wynosząca $\frac{2}{3}$ grubości błony), a α to miara sprzężenia między warstwami. Miara sprzężenia α wynosi od 12 (duże sprzężenie), przez 24 (klasyczna błona) aż do 48 (swobodnie poruszająca się monowarstwa). Chociaż początkowo przyjmowano, że miara sprzężenia jest wartością stałą dla wszystkich błon ($\alpha=24$), to badania nad coraz bardziej zróżnicowanymi składami błonami pokazują, że w zależności od składu i typu lipidów w błonie α się różni, a jej wartość jest wyznacznikiem oddziaływania między warstewkami. W związku z tym parametr ten stanowi dopełnienie parametrów mechanicznych błony o oddziaływanie między warstewkami (wpływające chociażby na zjawisko *flip-flopu*), jednak nie jest to bezpośredni parametr błony w tym sensie, że nie on jeszcze mierzalny bezpośrednio z techniki eksperymentalnej bądź symulacji. W ramach pracy [C2] początkowo rozważałem zastosowanie wspomnianego modelu, ale ostatecznie po dyskusji z innymi współautorami zdecydowaliśmy się na inne wyjaśnienie zjawisk obserwowanych w pracy.

$$\kappa \cdot \alpha = d^2 \cdot K_A \quad (3)$$

Współczynnik dyfuzji. Jednym z najważniejszych zjawisk gwarantujących funkcjonowanie życia jest dyfuzja – samorzutne rozprzestrzenianie się i przenikanie cząsteczek będące konsekwencją chaotycznych zderzeń między cząsteczkami. Dlatego też w przedstawionym przeze mnie opisie właściwości błony nie mogło zabraknąć tego współczynnika. Konkretnie **lateralnego współczynnika dyfuzji**, który opisuje ruch indywidualnych cząsteczek lipidu w ruchu równoległym do powierzchni błony. Zdolność cząsteczek do poruszania się w błonie często jest określana przez pojęcie płynności w odniesieniu do samej błony. Lateralna dyfuzja lipidów w błonach komórkowych jest spontanicznym procesem wykorzystywanym przez komórki w celu umożliwienia złożonej strukturalnej i dynamicznej reorganizacji białek oraz tworzenia domen sygnalizacyjnych [32]. Lateralna dyfuzja lipidów w jednorodnej błonie może

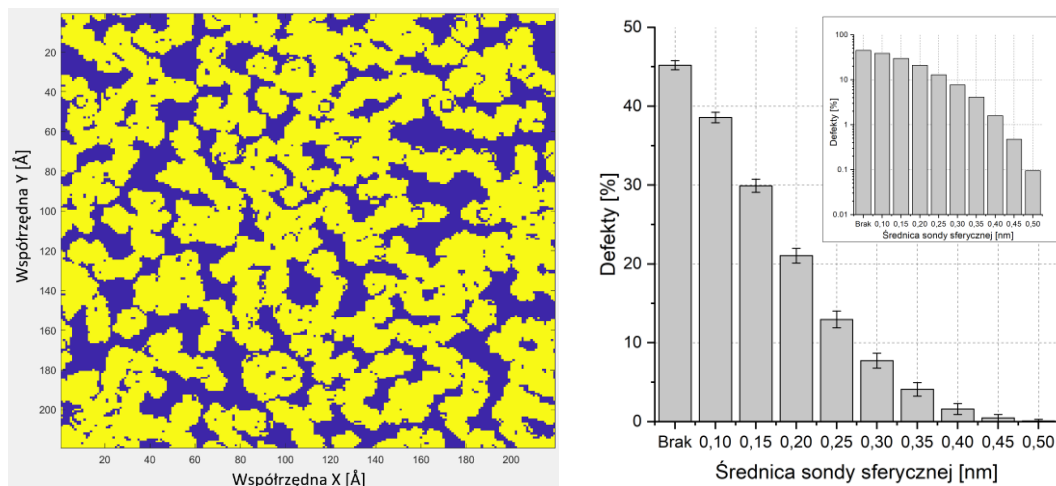
być opisana za pomocą ruchu Browna, jednakże w błonach niejednorodnych dyfuzja staje się bardziej złożona. W takich sytuacjach może ona być regulowana lokalnie, zwłaszcza poprzez interakcje między lipidami lub z białkami. Lokalne zmiany mogą też być skutkiem wystąpienia bodźców biologicznych, fizycznych, hormonalnych lub mechanicznych, co może implikować reorganizację błony, a w konsekwencji lokalnego ograniczenia ruchu lipidów i powstania domen strukturalnych i funkcjonalnych [33]. Samo zachowanie lipidów również ma wpływ na dyfuzję innych elementów w poprzek błony, na przykład protonów, które mogą wykazywać anomalną dyfuzję w zależności od samego składu błony [34]. W dokonywanej przeze mnie charakterystyce błony lateralny współczynnik dyfuzji wyliczam z wykorzystaniem gotowego oprogramowania *Diffusion Coefficient Tool* opartego na relacji Einsteina ze średnim przemieszczeniem kwadratowym wybranych typów lub atomów w symulowanym układzie [35]. Ogromną zaletą tego podejścia jest możliwość wyliczenia współczynnika dyfuzji danego typu lipidu czy nawet dyfuzji na różnych przestrzennych poziomach błony (ruch na poziomie hydrofilowych główek potrafi znacząco się różnić od ruchu w regionie łańcuchów acylowych czy na granicy warstw). W ramach pracy [C4] wyznaczyłem parametry lateralnej dyfuzji dla badanych błon (rysunek 10, lewy panel). Podobną analizę wykonałem w przypadku pracy [C3], gdzie badane były błony z ceramido-1-fosforanem. Technikę tą wykorzystałem też do wyznaczenia zmian współczynnika dyfuzji po wbudowaniu zewnętrznych cząsteczek. Przykładem takiej analizy jest praca [C5], gdzie parametr ten okazał się jednym z czterech najbardziej wrażliwych na wbudowywanie się cząsteczek typu Gemini. Wyniki pokazano na rysunku 10, panelu prawym. I chociaż dyfuzja nie jest ściśle związana z destrukcyjnym wpływem cząsteczek Gemini na błonę, pozwoliło to na wykazanie, że jest ona czynnikiem w tym procesie (prawdopodobnie na etapie selektywności). Pozwoliło to na zawężenie grupy poszukiwanych cząsteczek o silnym efekcie antybakteryjnym do 8 kategorii. Analogiczną analizę wykonałem w przypadku cząsteczek oktenidyny i chlorheksydydy [C6] oraz fabimicyny [C1].



Rys 10. Lewy panel: Wyznaczone parametry lateralnego współczynnika dyfuzji dla błon z kwasem fosfatydowym (praca [C4]). Prawy panel: Wyznaczone parametry lateralnego współczynnika dyfuzji dla modelu wewnętrznej błony bakteryjnej *E.coli* po wbudowaniu badanych cząsteczek typu gemini (praca [C5]).

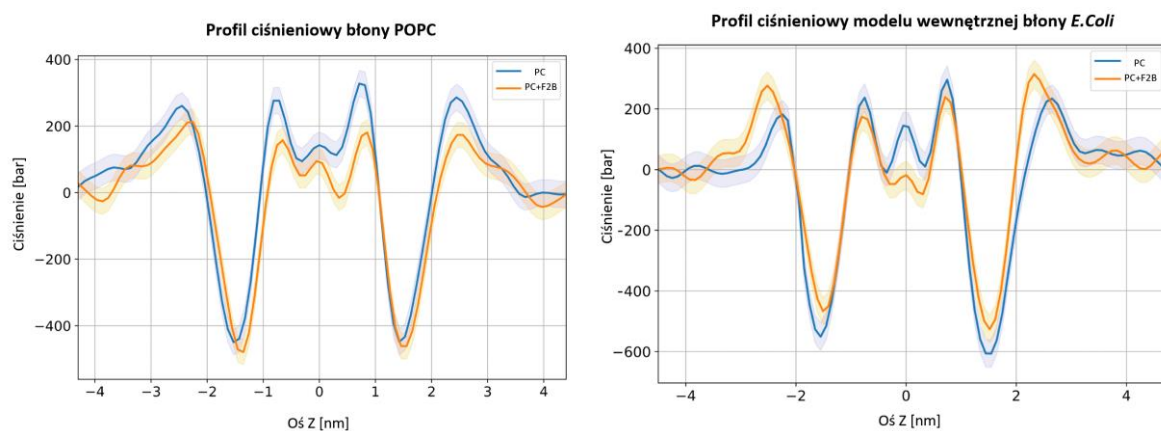
Defekty. Błona jako samoorganizujący się obiekt materii miękkiej jest narażona na powstawanie **defektów**. Co więcej, obecność defektów umożliwia występowanie zjawisk niezbędnych do funkcjonowania komórki takich jak na przykład inkorporacja białek do błony, a ilość defektów jest jednym z głównych czynników odpowiadających za jej przepuszczalność. Mimo to, defekty są parametrem dość rzadko wyznaczanym w pracach symulacyjnych na błonach lipidowych. Chociaż nie znalazłem doniesień literaturowych wykazujących współzależność obecności defektów z parametrami błony, to istnieją prace pokazujące, że defekty mogą być siłą napędową dla samego wbudowywania się białek do błony [36]. Jak pokazano na przykładzie wewnątrznie nieuporządkowanych białek (z angielskiego: *intrinsically disordered proteins*), na błonach z większymi defektami zaobserwowano zwiększone wbudowywanie. Te defekty, które są zlokalizowane na powierzchni błony, gdzie hydrofobowe wnętrze jest wystawione na działanie rozpuszczalnika w celu dostosowania się do dużej krzywizny, są szczególnie istotne w przypadku białek zawierających amfipatyczne helisy [37]. Rozmiar defektu w błonach może znacząco wpływać na powinowactwo wiązania i dynamikę białek. Stwierdzono, że większe defekty na zakrzywionych błonach promują fałdowanie domen wiążących w białkach, przy czym struktura defektu reaguje na związane białko, podczas gdy mniejsze defekty na płaskich błonach mogą hamować fałdowanie tej samej domeny białkowej [38]. Sugeruje to, że rozmiar i charakter defektów błonowych odgrywają kluczową rolę w modulacji zachowania strukturalnego wewnątrznie nieuporządkowanych białek po związaniu z błoną. Obecność defektów w błonach lipidowych może działać jako atrakcyjne miejsca dla białek, przy czym białka są przyciągane do regionów dwuwarstw lipidowych, gdzie wykrywano defekty hydrofobowe [39]. Defekty te służą jako kluczowe czynniki determinujące specyficzne wiązanie błonowe białek peryferyjnych, podkreślając ich znaczenie w procesach komórkowych [40]. Jak w przypadku większości parametrów, które nie są opisane na bazie modeli matematycznych, istnieje kilka sposobów definicji i określania defektów w błonach lipidowych. W moich badaniach przyjąłem definicję zaproponowaną w pracy Boyda i współpracowników [41]. W skrócie, objętość przestrzenna każdego atomu w błonie lipidowej obliczana jest na podstawie wartości promienia Van der Waalsa. Jeśli jest to atom wchodzący w skład główki hydrofilowej, jest on oznaczony jako polarny, w przeciwnym razie jako acylowy. Następnie następuje podzielenie przestrzeni XY symulacji na siatkę z niewielkimi odstępami (np. 0.5 Å). Dla każdego węzła siatki prowadzona jest linia normalna do czoła błony lipidowej i sprawdzane jest, czy zderzy się ona z atomem polarnym czy acylowym. W rezultacie otrzymywana jest dwuwymiarowa mapa, która służy do określenia frakcji powierzchni dwuwarstwy umożliwiającej dostęp do obszaru łańcucha acylowego (czyli defektu), jak pokazano na rysunku 11, panelu lewym. Aby zwiększyć dokładność wyznaczenia defektów poprzez nieuwzględnianie niewielkich obszarów wynikających chociażby z dyfuzji lipidu, otrzymane mapy są ponownie przetwarzane, stosuje się analizę sondy sferycznej. W każdym węźle siatki ustawia się sondę kulistą o promieniu od 0.1 do 0.5 nm. Jeżeli wszystkie węzły siatki w zasięgu tej sfery zostaną sklasyfikowane jako acyle, węzły te zostaną ostatecznie sklasyfikowane jako defekty. Na rysunku 11, panelu prawym, pokazano, jak wpływa zastosowana analiza sferyczna na oszacowanie ilości defektów na błonie POPC:DPPA 8:2. W pracy [C4] pierwszy raz zastosowałem to podejście, które następnie stało się dla mnie standardową procedurą do oceny defektów (choć nie zawsze finalnie wykorzystywaną), tak jak w pracach [C1, A1]. Chociaż sama metodyka i algorytm nie zostały przeze mnie,

konceptyjnie, zmieniona, wprowadzona przez mnie optymalizacja pozwoliła przyspieszyć wykonywaną analizę. Warto zaznaczyć, że wykonana przez mnie analiza w pracy [C4] doprowadziła do nawiązania współpracy w zakresie wykonywanych symulacji i analiz błon z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej z prof. Nadavem Amdursky z wydziału chemicznego w Technionie (Izraelskim Instytucie Technologicznym).



Rys 11. Lewy panel: dwuwymiarowa mapa defektów dla błony POPC:POPA 8:2, na żółto zaznaczono atomy należące do główki polarnej, z kolei na niebiesko są to atomy odpowiadające regionowi łańcuchów acylowych. Prawy panel: Wpływ średnicy sondy sferycznej na procent defektów wyznaczonych w analizie. Wstawka prezentuje dane w skali logarytmicznej. Dane z pracy [C4].

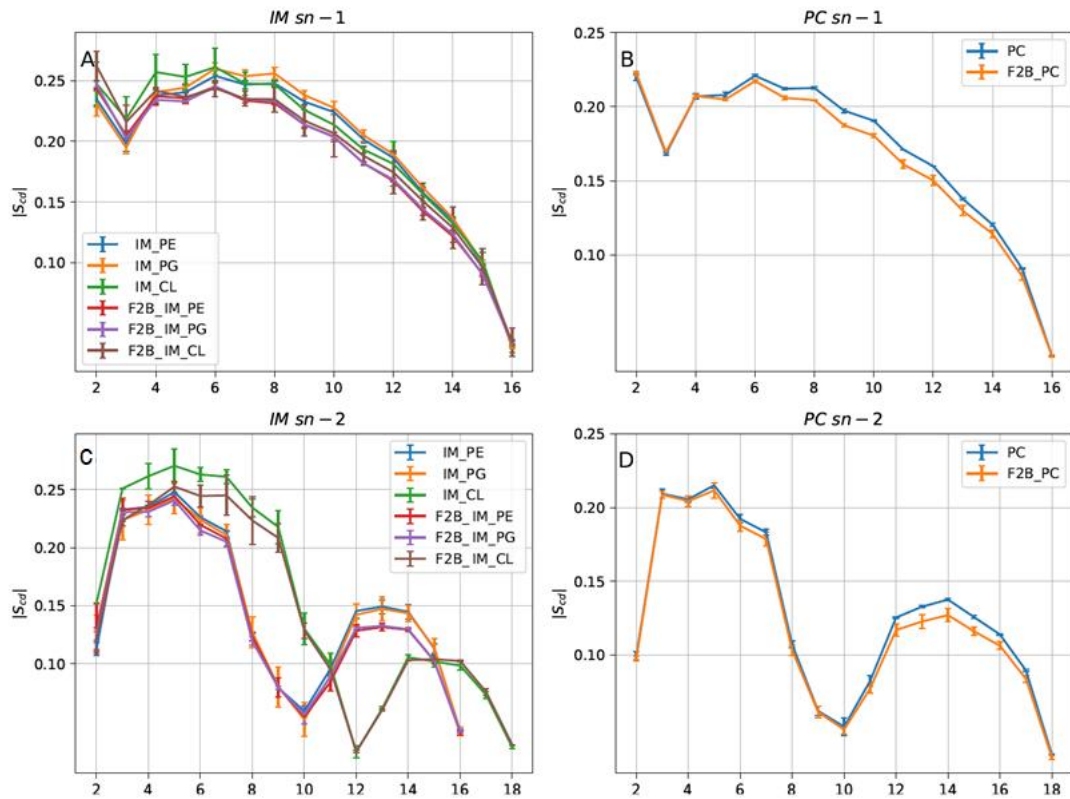
Profil ciśnienia lateralnego, napięcie powierzchniowe błony. Kolejną grupą właściwości błony są te bezpośrednio powiązane z ciśnieniem na błonie. Jednorodna, symetryczna błona lipidowa, jako obiekt złożony z amfifilowych elementów budujących, ma dość charakterystyczny **profil ciśnienia lateralnego**. Przechodząc ze środowiska wodnego obserwuje się wzrost (lub spadek zależności od przyjętej notacji) na poziomie główek hydrofilowych, a następnie spadek na interfejsie pomiędzy główkami hydrofilowymi a hydrofobowymi łańcuchami acylowymi. Następnie ponowny wzrost na całym odcinku acylowym aż do regionu, w którym następuje zazębienie między warstwami, gdzie następuje ponownie niewielki spadek. Przykładowe profile ciśnieniowe przedstawiono na rysunku 12.



Rys 12. Profile ciśnieniowe dla błon przed i po wbudowaniu fabimicyny (F2B). Na lewym panelu przedstawiono błonę POPC, na prawym panelu model wewnętrznej błony *E.Coli*. Dane z pracy [C1].

Otrzymane profile ciśnieniowe wykorzystywane są do wyznaczenia takich parametrów jak profile napięciowe, **napięcie powierzchniowe błony** czy nawet, wspomniana wcześniej, krzywizna Gaussowska. Utrzymanie ciśnienia jest jednym z kluczowych warunków istnienia błony, zbyt duże ciśnienie może doprowadzić do eksplozji całego układu. Jest to również krytyczny parametr przy tworzeniu systemów, w szczególności gdy między warstwami błony występują różnice w składzie. Wykazano, że zbyt duże napięcie między błonami może powodować zwiększone występowanie przypadków *flip-flopu* (przemieszczenia cząsteczki lipidu z jednej warstwy do drugiej) [42, 43]. Charakterystykę profili ciśnieniowych wykorzystałem w pracach [C1, A14].

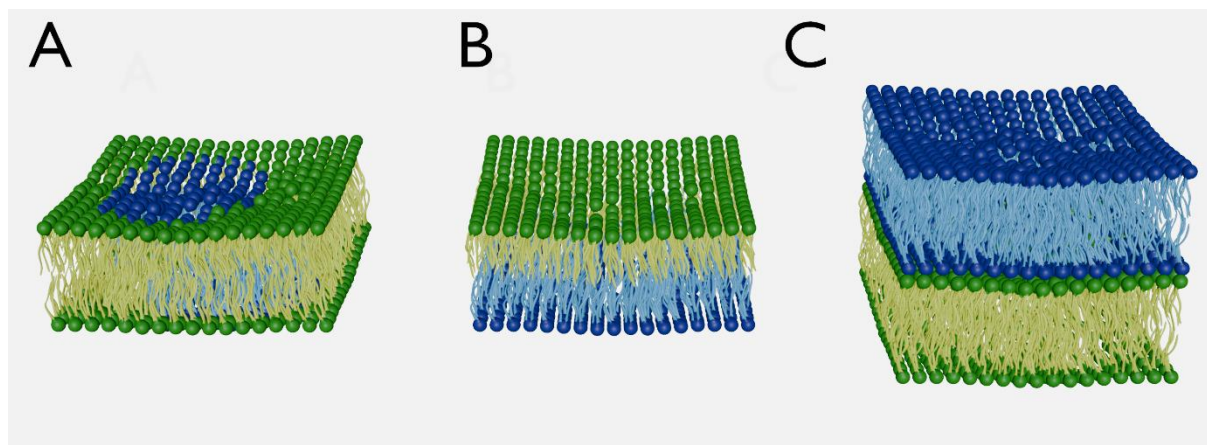
Parametr uporządkowania. Ostatnim z parametrów, który zawarłem w przedstawionej charakterystyce błony lipidowej jest **parametr uporządkowania** (z angielskiego: *order parameter*). Przez długi czas parametr ten był papierkiem lakmusowym tego, czy stworzony system symulacyjny jest zgodny z parametrami rzeczywistymi błony. Parametr ten, wywodzący się od S_{CD} wyznaczanego na za pomocą rezonansu magnetycznego, jest funkcją kąta między atomami węgla i atomami wodoru dla każdego z atomów łańcucha acylowego a normalną do błony. Warto jednak zwrócić uwagę, że czasem w pracach naukowych możemy spotkać błędną definicję tego parametru jako kąt między linią łączącą atomy węgla w ogonie acylowym a normalną do błony. Parametr ten jest zbiorczą informacją na temat uporządkowania łańcuchów acylowych w badanej dwuwarstwie lipidowej (często po prostu nazywanego uporządkowaniem błony). Ocena wpływu uporządkowania błony na jej parametry jest o tyle utrudniona, że zmiany w uporządkowaniu są przeważnie powiązane ze zmianą stanu błony z ciekłego w żelowy. Taka zmiana jest jednak nie tylko powiązana z samą zmianą parametru uporządkowania, ale także rozprostowaniem łańcuchów acylowych oraz zredukowaniem ilości wody w okolicy główki lipidu. Dlatego też opisane dalej zależności nie są wprost powiązane z parametrem uporządkowania. Niemniej pokazano, że błony w fazie ciekłej charakteryzują się znacznie mniejszą barierą energetyczną umożliwiającą łatwiejsze zginanie i fuzję, co ułatwia endocytozę [44]. Ponadto, podobnie jak w przypadku defektów, uporządkowanie błony może być parametrem mającym istotny wpływ na wbudowywanie białek do błon. Pokazano, że uporządkowanie ogonków lipidowych w błonach wpływa na kooperatywność wiązania białek wewnątrznie nieuporządkowanych poprzez wpływ na dostępność miejsc wiązania na powierzchni błony. Badania wykazały, że uporządkowanie ogonów lipidowych może modulować dynamikę konformacyjną białek po związaniu z błoną, wpływając na kooperatywność ich interakcji z błonami [45]. Parametr uporządkowania wyliczałem między innymi w pracach [C1, A14], a przykładowe rezultaty zaprezentowano na rysunku 13.



Rys 13. Przykładowe wyznaczenie parametru uporządkowania dla (A,C) modeli błon wewnętrznych *E.Coli* (IM) oraz (B,D) błon POPC dla nasyconego łańcucha sn-1 (górne panele) oraz nienasyconego sn-2 (dolne panele). Dane z pracy [C1].

3.4 Organizacja błony, a jej homeostaza

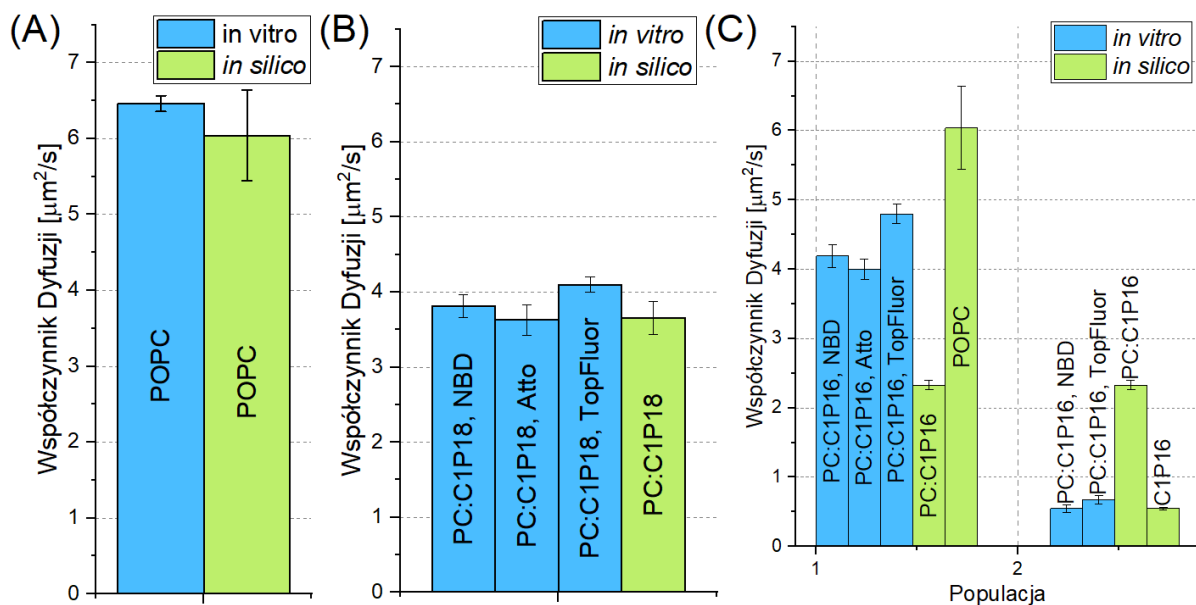
W najprostszym przypadku błona lipidowa jest lateralnie (podłużnie) i przestrzennie jednorodna. Oznacza to, że na całej swojej topologicznej przestrzeni jest ona, pomijając występujące defekty, identyczna w składzie i organizacji - nie występują żadne różnice w składzie między poszczególnymi warstewkami. Natomiast błona biologiczna nie jest ani jednorodna przestrzennie ani podłużnie. W aspekcie podłużnym mamy do czynienia z występowaniem nano- i mikro-domen. Są to obszary o zmienionym składzie lipidowym lub zmienionych lokalnie właściwościach błony. Klasycznym przykładem takich domen są rafty (mikrodomeny w błonach z cholesterolem odróżniające się nadreprezentacją sfingomieliny przy jednocześnie zmniejszonej liczności fosfatydylocholiny). Możemy wyróżnić dwa podstawowe mechanizmy odpowiadające za powstawanie domen: są to różnice w fazie błony oraz oddziaływania lipidów z innymi cząsteczkami (innymi lipidami, białkami, solami czy detergentami). Z kolei w aspekcie przestrzennym jest to przede wszystkim asymetria między warstewkami oraz efekt wpływu otoczenia. Asymetria jest kluczowym warunkiem do funkcjonowania komórki, gdyż zapewnia przestrzennie różnorodne warunki dla białek transbłonowych poprzez modyfikację parametrów biofizycznych po obu stronach błony. Utrata asymetrii przez błonę komórkową jest wczesną oznaką jej apoptozy. Pokazano, że układy asymetryczne mają zupełnie inną selektywność przepuszczalności cząsteczek w porównaniu do układów symetrycznych [46]. Z kolei przez otoczenie mam na myśli zmiany właściwości błony wynikające z takiej organizacji, że komórka posiada dwie blisko sąsiadujące ze sobą błony. Przykładami takiej organizacji są zewnętrzna warstwa skóry *stratum corneum* [47] czy błony bakterii *E.Coli* [48]. Schematycznie omawiane zmiany w organizacji są przedstawione na rysunku 14. W ramach tego podrozdziału opiszę wpływ zmian organizacji przestrzennej i podłużnej na badane właściwości błony.



Rys 14. Wizualizacja omówionych w podrozdziale organizacji błony wpływających na jej właściwości: (A) występowanie domen, (B) asymetria, (C) system dwubłonowy.

Obecność domen w jednej lub obu warstewkach potrafi znacząco wpłynąć na właściwości błony lipidowej. Z racji, że część modeli zakłada homogeniczny charakter błony, charakterystyka błon heterogenicznych bywa utrudniona lub wykracza poza założenia podstawowe modelu. Ponadto, powstawanie domen jest procesem, który zachodzi w domenie czasowej na przestrzeni od mikrosekund do dziesiątek, a nawet setek mikrosekund w zależności od charakteru domen i samego składu błony. Sprawia to, że symulacje, których celem jest

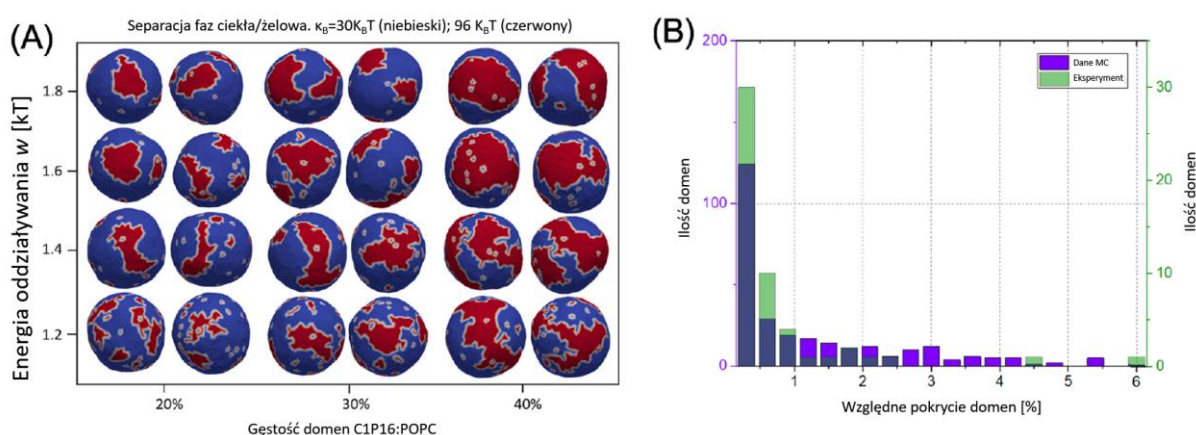
badanie i obserwacja domen, są numerycznie i czasowo wymagające. Istnieją badania symulacyjne skupiające się na obserwowaniu i charakteryzowaniu samych domen jak przedstawiono w pracy Bennetta i Tielemana [49], w badaniach są też wykorzystywane narzędzie uczenia maszynowego jak w pracach Cannera i współpracowników [50] czy w pracy [A2], której jestem współautorem. Te prace nie skupiają się jednak na samym aspekcie zmiany homeostazy właściwości błony. W swoich badaniach postanowiłem jednak podejść do tematu inaczej – zamiast generować czasochłonne symulacje, postanowiłem wygenerować błony o różnym składzie, a następnie wykorzystać jeden z parametrów jako wyznacznik składu domen co pozwala mi na wyznaczenie ich właściwości zgodnie z założeniami modeli. Podejście to zastosowałem w pracy [C3]. Wykorzystując metodę eksperymentalną, którą sam przystosowałem do pomiarów do mikro-liposomów, wyznaczyłem współczynniki dyfuzji obserwowane na błonach. Technika, którą zastosowałem, czyli fluorescencyjna spektroskopia korelacyjna ze zmiennością punktową (z angielskiego: *spot-variation fluorescence correlation spectroscopy*), pozwala na wyznaczenie współczynnika dyfuzji dla każdej z populacji w badanym obiekcie, czyli w moim przypadku dla każdego z typu domen. W omawianej pracy badałem błony złożone z lipidów POPC i ceramido-1-fosforanu (zarówno 16:0-18:1 jak i 18:1-18:1). Następnie przeprowadziłem symulacje dla czystych błon POPC, czystych błon C1P, oraz błon POPC:C1P w stosunku 8:2. W szczególności dla kompozycji POPC:C1P16:0-18:1 zaobserwowałem w eksperymencie dwie populacje o zauważalnie różnym współczynniku dyfuzji. Otrzymane rezultaty pokazano na rysunku 15.



Rys 15. Porównanie wartości efektywnego współczynnika lateralnej dyfuzji otrzymanego z fluorescencyjnej spektroskopii korelacyjnej ze zmiennością punktową i współczynnika dyfuzji otrzymanego z symulacji dynamiki molekularnej dla (A) błon POPC, (B) błon POPC:C1P18 8:2, (C) błon POPC:C1P16 8:2 z wyszczególnieniem dwóch populacji i dodatkowym zestawieniem dla czystych błon otrzymanych z symulacji. Grafika z pracy [C3].

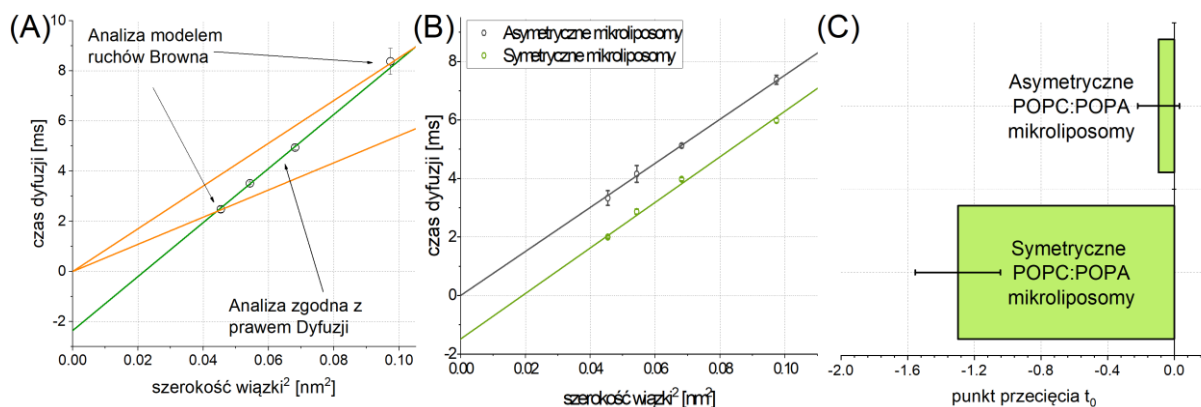
Porównanie współczynnika dyfuzji między wartościami wyznaczonymi eksperymentalnie, a tymi wyznaczonymi z symulacji pozwoliło mi na oszacowanie składu jednej z domen na 9:1 (przy założeniu liniowej proporcjonalności), a drugiej z domen na jednorodny C1P16:0-18:1. To z kolei pozwoliło na wyznaczenie współczynnika zginania właściwego dla danych domen.

W ramach rozwinięcia tematu odnowiłem współpracę z grupą profesora Aleša Igliča ze Słowenii (Uniwersytet w Lublanie), która specjalizuje się w symulacjach Monte Carlo. Wykorzystali oni wyznaczony współczynnik zginania do modelu 3D pęcherzyka celem wyznaczenia oddziaływania między domenami i ich dynamiki (Rys 16.A). W tej pracy też zastosowałem unikalną analizę numeryczną do oszacowania pokrycia domen mikroliposomu za pomocą badań konfokalnych (co pozwoliło na dodatkową weryfikację modelu zaprezentowanego w ramach Monte Carlo na rysunku 16.B) jak i wykonałem wizualizację nano- i mikro-domen z wykorzystaniem takich narzędzi jak mikroskopia STED/SIM². Warto tutaj zwrócić uwagę, że Monte Carlo jest często wykorzystywanym alternatywnym narzędziem do badania domen w błonach lipidowych. Chociaż nie pozwala on na tak szeroką charakteryzację właściwości jak dynamika molekularna, jest dużo wydajniejszym w kontekście czasowo-numerycznym do badania samej ewolucji domen w czasie.



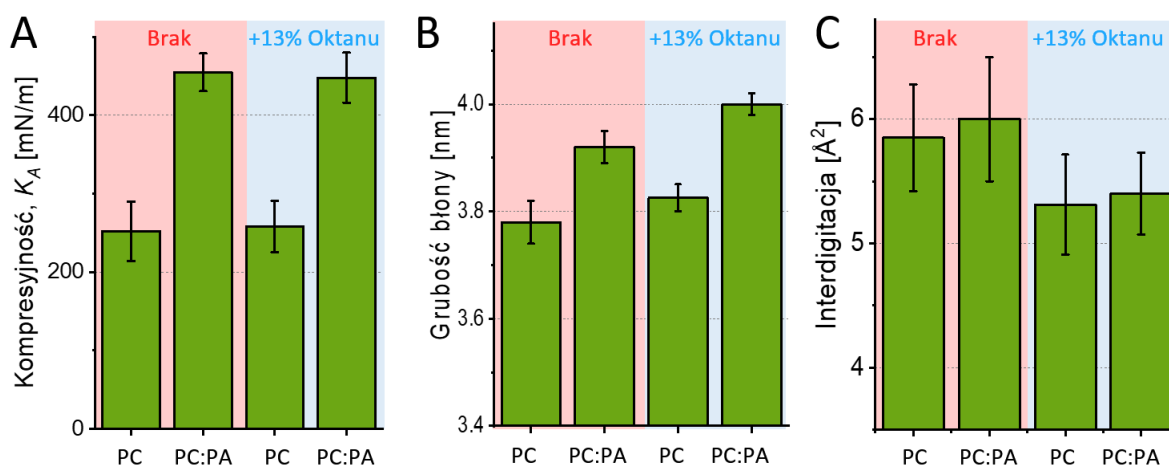
Rys 16. Zachowanie domen C1P16 badane przy użyciu modelu Monte Carlo. (A) Wizualizacja rozdziału faz żelowej i ciekłej w funkcji stężenia C1P16 dla układu modelu POPC:C1P16 uzyskanego przy użyciu symulacji Monte Carlo z 1447 wierzchołkami symulacyjnymi. (B) Porównanie względnego obszaru domen z badań eksperymentalnych i symulacyjnych dla POPC:C1P16 8:2. Fioletowe i zielone słupki oznaczają nadmiar danych Monte Carlo lub eksperymentalnych. Ciemnoniebieskie słupki oznaczają pokrycie obu źródeł (słupki). Grafika z pracy [C3].

Asymetria między warstewkami błony jest czynnikiem, który potrafi drastycznie zmieniać homeostazę parametrów błony, w szczególności w aspekcie mechanicznym. Współczynnik zginania zaobserwowany na błonach asymetrycznych POPC/DOPC (stosuję tutaj notację „/” oddzielającą skład jednej warstewki od drugiej) był ponad dwa razy większy niż dla odpowiadających składem błon symetrycznych POPC i DOPC [51]. Co ciekawe, współczynnik dyfuzji pozostaje niezmienny w zależności od symetryczności błony, jeśli zostanie wykorzystana odpowiednia technika pozwalająca wziąć pod uwagę różnice w organizacji błony, co zademonstrowałem na konferencji [K2, plakat konferencyjny dostępny online]. Precyzując, uwzględniając model prawa dyfuzyjnego zakładający, że wartość dyfuzji w zerowej szerokości wiązki jest różna o zera, znak wartości punktu przecięcia niesie informację o lateralnej organizacji badanego obiektu. Rozważenie klasycznego podejścia ruchów Browna skutkowałoby otrzymaniem parametru nieodzwierciedlającego stan faktyczny (Rys 17.A). Po uwzględnieniu tego typu zmian nachylenie jest zbieżne dla obu badanych obiektów (Rys 17.B), natomiast różnica widoczna jest w wartości punktu przecięcia (Rys 17.C).



Rys 17. (A) Wizualizacja różnicy w klasycznym podejściu ruchu Browna (konkretnie równania Einsteina-Stokesa) a prawa dyfuzyjnego, gdzie o współczynniku dyfuzji świadczy nachylenie krzywych. (B) Porównanie praw dyfuzyjnych dla symetrycznych i niesymetrycznych GUVów POPC:POPA 8:2 znakowanych sondą Atto-DOPE. (C) Porównanie wartości punktu przecięcia dla obu błon. Grafika z pracy [K2].

Otrzymane wyniki są zbieżne z dostępną literaturą - jak pokazano w pracy Kakuda i współpracownicy [52] utrata asymetrii błony może indukować formowanie domen. Na badaniu asymetrii, a konkretnie badania zmian właściwości błony skutkiem asymetrii, skupiłem się w pracach [C2,C1,A14]. W pracy [C2], będącej efektem mojego gościnnego post-doca w instytucie Maxa Plancka w Poczdamie, wykorzystałem eksperymentalne techniki mikropipety oraz mikroskopii konfokalnej do zbadania wpływu asymetrii na zmierzoną kompresyjność oraz zdolność do formowania domen. Wykonałem również symulacje układów symetrycznych celem walidacji wyników eksperymentalnych. Symulacje również pozwoliły na oszacowanie wpływu obecności pozostałości mieszanin olejów mineralnych w błonie na jej właściwości fizykochemiczne, między innymi na kompresyjność, grubość błony i ząbienie, jak pokazano na rysunku 18.

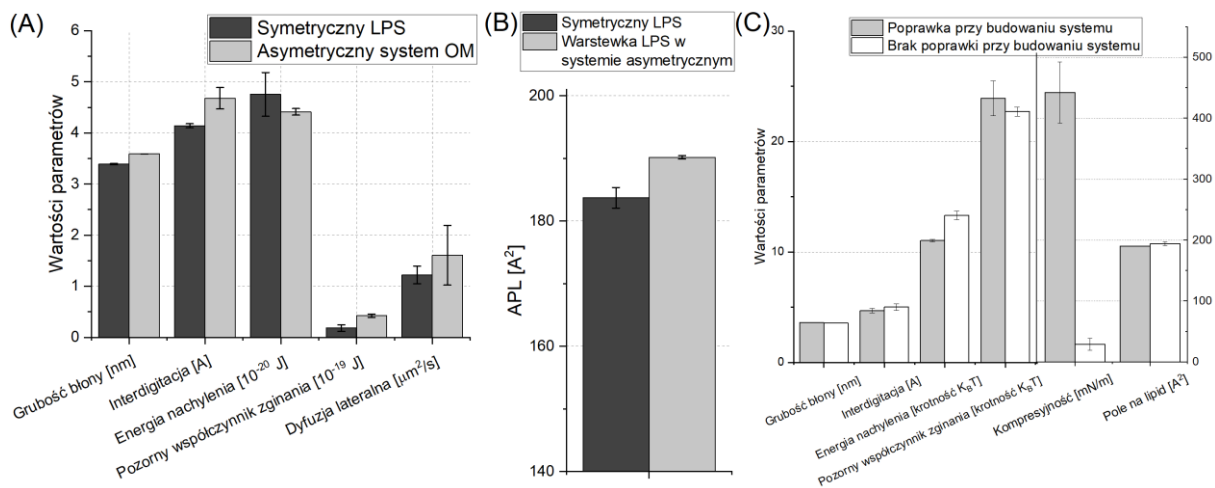


Rys 18. (A) Badanie parametrów błon z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej dla układów symetrycznych POPC i POPC:POPA 8:2, które posiadają nie posiadają zanieczyszczeń olej (różowe tło), albo zawierają 13 mol % oktanu (jasnoniebieskie tło), naśladując odpowiednie warunki elektroformowania i odwróconej emulsji przygotowania pęcherzyków GUV. (A) Kompresyjność K_A . Nie zaobserwowano istotnych różnic między systemami z oktanem i bez niego. (B) Grubość błony. Obecność oktanu powoduje zwiększenie grubości. (C) Obliczona interdigitacja sugeruje niewielkie sprzężenie między-warstewkowe w obecności oktanu. Grafika z pracy [C2].

W pracy tej również nakreśliłem problemy, jakie wynikają z próby odwzorowania układów asymetrycznych w symulacjach dynamiki molekularnej. W systemach asymetrycznych pojawia się problem różnicy ciśnienia na błonie między warstewkami. W klasycznym podejściu do budowania systemu błonowego w układach symetrycznych umieszcza się taką samą ilość cząsteczek po obu stronach błony. W błonach asymetrycznych takie podejście doprowadziłoby do niezgodności w polu obu warstewek (lipidy budujące jedną warstewkę i drugą miałyby inny APL), co przekładałoby się na nadmierne usztywnienie lub rozszczelnienie jednej z warstewek. To z kolei prowadziłoby do tego, że symulowany układ nie byłby fizycznie tożsamy z rzeczywistym, a otrzymanywane z analizy takiego systemu wartości mogłyby być błędne. Istnieje kilka ustabilizowanych podejść do tego problemu. Najmniej złożonym wydaje się podejście bazujące na zrównaniu APL dla obu warstewek [53]. W tym podejściu każda z warstewek jest symulowana jako układ symetryczny celem otrzymania wartości APL właściwych dla danych lipidów. Następnie wykorzystując te wartości wylicza się ile dodatkowych lipidów na jednej z warstewek należy dodać aby zrównać ich wypadkowe pole. Innym podejście bazuje na zrównaniu między sobą wartości mechanicznych, konkretnie kompresyjności. W tym podejściu ponownie symuluje się oba układy, tym razem wyznaczając ich K_A . Następnie modyfikuje się jeden z układów o dodatkowe lipidy (puszczając ponownie symulacje) do momentu, aż parametr K_A będzie równy systemowi referencyjnemu [54]. Trzecie i jednocześnie najbardziej złożone podejście bazuje na wyrównaniu ciśnień między warstewkami [55]. Stworzony asymetryczny system jest równoważony, a następnie wyznacza się dla niego profil ciśnieniowy. W profilu tym dokonuje się dość żmudnej i subiektywnej oceny środka błony, a następnie całkuje się wartości dla obu warstewek i porównuje. Jeśli wartość jest zbliżona do zera jest to poprawnie zbudowany system. W innym przypadku należy powtórzyć cały proces dodając kilka lipidów i iteracyjnie wykonywać symulacje aż do uzyskania zbliżonej do zera różnicy ciśnienia między warstewkami. Same symulacje błon asymetrycznych, wzbogacony o wiedzę i doświadczenie z poprzedniej pracy, przeprowadziłem w pracy [C1] – konkretnie chodzi o model zewnętrznej błony bakterii *E.Coli*. Na jednej z warstw znajduje się mieszanina PE z PG, natomiast na drugiej lipidA z przyczepionymi łańcuchami LPS. Układ ten porównuję do symetrycznego systemu lipidA+LPS. Wyniki pokazały różnicę w praktycznie każdym z badanych parametrów - grubości błony, interdigatacji, kompresyjności, współczynnika zginania oraz krzywej Gaussa. Co ciekawe, nie nastąpiła zmiana w zakresie lateralnej dyfuzji ani w zakresie energii nachylenia. Wyniki pokazano na rysunku 19.A-B. Warto wspomnieć, że w ramach swojej pracy badawczej dalej zgłębiam temat asymetrii. Po powrocie z gościnnego post-doca wystąpiłem, w ramach programu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza o środki na grant wewnętrzny zatytułowany „Indukowane starzeniem i oksydacją zmiany właściwości mechanicznych błon lipidowych”. Finansowanie zostało mi przyznane, a w ramach tego projektu poza badaniem wpływu zmian stosunków lipidów oraz ich oksydacji na właściwości mechaniczne, na bazie dostępnej wiedzy literaturowej, odtworzyłem metodę tworzenia układów mikrofluidycznych do tworzenia asymetrycznych mikro-liposomów. Tematyka asymetrii jest również przedmiotem złożonego przeze mnie grantu Sonata (edycja 55).

Kolejnym bardzo interesującym aspektem pozostaje ocena wpływu otrzymanywanych wartości parametrów w zależności od tego czy została zastosowana korekta na różnicę między

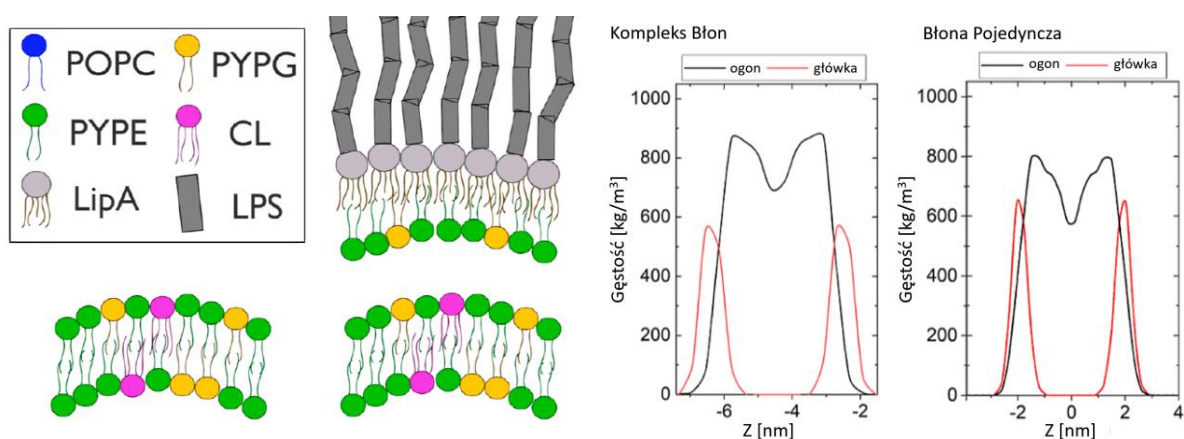
warstewkami przy budowaniu systemu asymetrycznego. W pracy [A14], gdzie badałem wpływ długości łańcuchów LPS na parametry asymetrycznej błony w podobnym składzie, nie zostały zastosowane poprawki. W danym czasie nie byłem świadomy złożoności budowania systemów asymetrycznych, jednak to niedopatrzenie daje unikalną możliwość porównania parametrów, gdyż w obu pracach badany jest model zewnętrznej błony bakterii *E.Coli*. Różnice te zaprezentowano na rysunku 19.C. Ciekawym jest to, że nie zaobserwowałem znaczących zmian w parametrach takich jak grubość błony, zazębienie czy wartości pola na lipid. Największe zmiany zaobserwowałem w przypadku parametrów mechanicznych – pozornego współczynnika zginania, energii nachylenia oraz przede wszystkim kompresyjności. Zmiana pozornego współczynnika zginania jest niewielka, natomiast może to być spowodowane tym, że symulowane systemy były za małe na faktyczne odzwierciedlenie tego parametru (stąd nazwa pozorny) i w przypadku większych systemów różnica byłaby dużo większa. Największą różnicę zaobserwowałem w przypadku kompresyjności, co sugeruje, że wybór podejścia równoważenia tego parametru pomiędzy warstewkami gwarantuje największą zbieżność w przypadku charakterystyki błon asymetrycznych.



Rys 19. (A) Porównanie wartości wybranych parametrów dla symetrycznej błony LPS i asymetrycznego modelu błony zewnętrznej bakterii *E.Coli* (OM). (B) Porównanie wartości pola na lipid (APL) dla tych systemów z uwzględnieniem w systemie asymetrycznym jedynie warstewki z LPS. Parametry z pracy [C1]. (C) Porównanie wartości wybranych parametrów dla systemów asymetrycznych z zastosowaniem opisanej wyżej poprawki przy budowie systemów asymetrycznych i bez. Dane z prac [C1] oraz [A14].

Bliskie sąsiedztwo dwóch błon jest z perspektywy biologicznej korzystnym układem dla niektórych kompleksów białek (na przykład łączącym OMP w błonie zewnętrznej z MFP w błonie wewnętrznej w bakterii *E.coli* czy w systemach wydalania). W bakterii *E.coli* dwie błony są od siebie oddzielone warstwą peptydoglikanu [56], natomiast w moich badaniach chciałem się skupić nad badaniem wpływu bliskości błon na siebie. Wstępną ideę symulacji wraz ze wstępną charakterystyką właściwości błony w tym zakresie zapoczątkowałem w [A14], natomiast finalna realizacja tej idei znajduje się w pracy [C1]. W ramach tej pracy przeprowadzono symulację układu błon, z których jedna była modelem zewnętrznej błony *E.coli* (lipidA+LPS/PE:PG 88:12), a druga wewnętrznej błony (PE:PG:CL 80:15:5). W badanym przypadku przy porównaniu układu podwójnego względem podstawowego (czyli pojedynczej błony) zaobserwowano zauważalne różnice. Schematyczne różnicę między porównywanymi systemami w przypadku błony wewnętrznej pokazano na rysunku 20, panelu

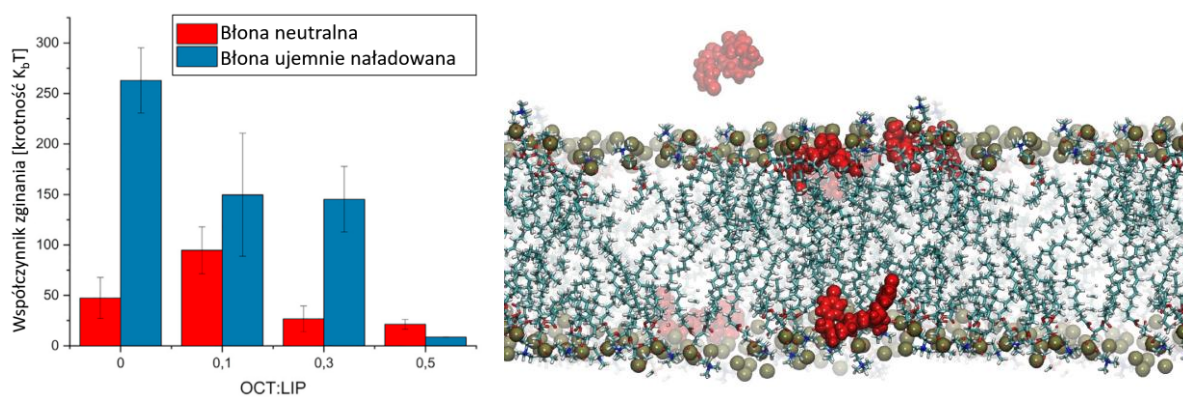
lewym. W szczególności gęstość w obszarze główek hydrofilowych podwójnego systemu była niższa w porównaniu z odpowiednim systemem pojedynczym (Rys 20, panel prawy). Dotyczyło to zarówno modelu zewnętrznej, jak i wewnętrznej błony. W zewnętrznej błonie podwójnego układu zaobserwowano również zwiększoną gęstość w regionie łańcucha acylowego. Dodatkowo ciśnienie między warstwami w obu błonach w podwójnym układach było niższe niż w odpowiadających im układach pojedynczych. Zaobserwowano także kilka różnic w samych właściwościach błony. Otrzymany współczynnik zginania znacznie różnił się w podwójnych systemach. W przypadku modelu błony wewnętrznej sztywność ta była znacznie wyższa, podczas gdy w przypadku modelu błony zewnętrznej nieznacznie spadała. Dyfuzja lateralna była również znacznie wyższa w podwójnych systemach. Ponadto zaobserwowano różnice w grubości błony, kompresyjności i energii pochylenia, choć tylko w modelu błony zewnętrznej.



Rys 20. Panel lewy: schematyczne przedstawienie systemu podwójnego (complex) oraz referencyjnego systemu pojedynczego (single). Lewy panel: Gęstość rozkładu cząsteczek główek hydrofilowych i łańcuchów acylowych w modelach wewnętrznej błony lipidowej *E.Coli* w systemie podwójnym (kompleksie) i pojedynczym.

3.5 Konsekwencje zaburzenia homeostazy właściwości błony

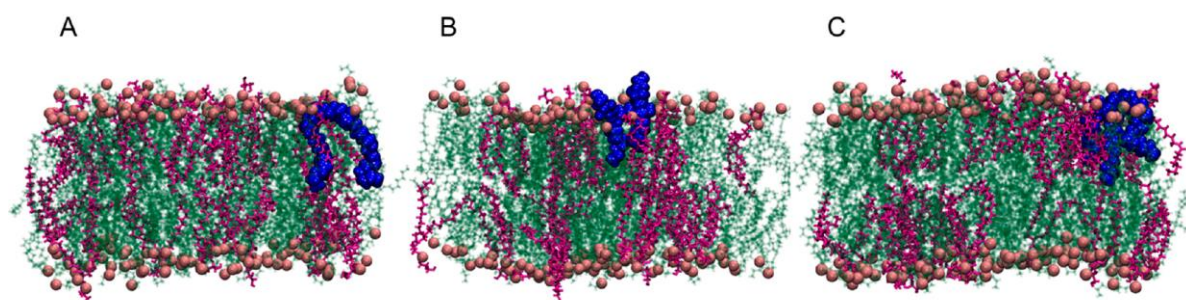
Zmiana wartości parametru błony prowadzi może do czasowego, lub w skrajnych przypadkach permanentnego, zablokowania u niej wykonywania określonej funkcji lub funkcjonowania. Taką zmianę określiłem wprowadzonym wcześniej pojęciem zaburzenia homeostazy parametrów błony. W moim przypadku idea tego, że zmiana właściwości błony może mieć krytyczne znaczenie dla jej funkcjonowania pojawiła się po raz pierwszy w pracy [C6]. W ramach tej pracy badałem wraz z innymi badaczami wpływ dwóch komercyjnie dostępnych środków antyseptycznych – chlorheksydyny oraz oktenidyny. Początkowo postawioną hipotezą badawczą, zapostulowaną na bazie dostępnej wówczas literatury, był mechanizm oktenidyny oparty na elektrostatyce. Nie zakładałem również dużego wpływu samej chlorheksydyny na błonę, gdyż doniesienia literaturowe wskazywały na selektywne oddziaływanie z białkami na błonie, a nie samą błonę. Przeprowadzone badania i symulacje wykluczyły, w przypadku oktenidyny, elektrostatykę jako czynnik odpowiadający za mechanizm jej działania. Wskazywały one natomiast, że selektywność oktenidyny odbywa się względem sztywności błony, konkretnie przy małych stężeniach oktenidyna wbudowuje się w błonę doprowadzając do jej reorganizacji – zwiększenie sztywności przy jednoczesnym zwiększeniu defektów – co ułatwia wbudowanie dodatkowych cząsteczek oktenidyny. Gdy zostanie osiągnięte odpowiednio wysokie stężenie następuje duży spadek w sztywności błony, który prowadzi do jej rozszczelnienia i wycieków zaburzających funkcjonowanie bakterii (rysunek 21, lewy panel). Z kolei w przypadku chlorheksydyny, drogą eliminacji zaproponowaliśmy mechanizm bazujący na zaburzeniu formowania mikro- domen skutkiem obecności chlorheksydyny lub utraty optymalnych właściwości do ekspresji białek. Substancja ta mocno wpływała na parametry błony, natomiast nie powodowała wycieku, niespecyficznie zmieniała wartości pola na lipid oraz współczynnika dyfuzji lateralnej. Na rysunku 21, prawym panelu, przedstawiłem klatkę symulacji wbudowywania się chlorheksydyny do ujemnie naładowanej błony.



Rys 21. Lewy panel: Zmiana współczynnika zginania w funkcji ilości cząsteczek oktenidyny przypadającej na cząsteczki lipidu. Wyniki przedstawiono dla dwóch błon – neutralnej POPC oraz ujemnie naładowanej błony POPC:DOPG 7:3. Prawy panel: Klatka z symulacji wbudowywania się chlorheksydyny do ujemnie naładowanej błony POPC:DOPG 7:3. Grafiki z pracy [C6].

Ideę badania zaburzenia homeostazy właściwości błony kontynuowałem przy okazji pracy [C5]. W ramach tej pracy wraz z innymi badaczami przeprowadziliśmy szerokie rozeznanie literaturowe w zakresie cząsteczek gemini, jest to klasa detergentów o właściwościach antybakteryjnych charakteryzująca amfifilową budową – posiada dwa hydrofobowe łańcuchy

zakończone polarnymi lub jonowymi grupami, które są połączone łącznikiem. W zależności od łącznika wyróżnić można różne kategorie i budowę tychże cząsteczek. W ramach pracy pogrupowaliśmy znalezione cząsteczki gemini, odtworzyliśmy ich strukturę i sparametryzowaliśmy do badań z wykorzystaniem dynamiki molekularnej. Dodatkowo, wybraliśmy przedstawicieli grup cząsteczek z którymi przeprowadziliśmy symulacje dynamiki molekularnej oddziaływań z błoną lipidową – konkretnie modelem błony wewnętrznej bakterii *E.Coli*. Przykłady wizualizacji systemów pokazano na rysunku 22. Trajektorie przeprowadzonych symulacji wykorzystałem do wyznaczenia zmian parametrów względem samej błony bez obecności cząsteczek gemini. Przeprowadzona charakteryzacja właściwości błony pozwoliła mi na wyodrębnienie czterech parametrów podatnych na obecność cząsteczek antybakteryjnych – kompresyjności, współczynnika zginania, współczynnika dyfuzji lateralnej oraz napięcia powierzchniowego. Bazując na tych zmianach wyodrębniłem dla każdego parametru najbardziej zaburzającą kategorię cząsteczek gemini co zbiorczo pozwoliło mi na wyodrębnienie, z całego zbioru danych, trzech najlepszych kandydatów do jednolitych badań mikrobiologicznych w zakresie efektu antybakteryjnego.



Rys 22. Wybrane wizualizacje wbudowywania się cząsteczek gemini do modelu błony wewnętrznej bakterii *E.Coli*. Badane cząsteczki są reprezentantami z zaprezentowanej w pracy [C5] kategorii: (A) Ole, (B) tQS, (C) hQS.

Ostatni przykład wpływu zaburzania homeostazy właściwości, którym chciałbym zamknąć ten opis cyklu, jest praca [C1]. W ramach pracy badałem wpływ cząsteczki o udokumentowanym działaniu antybakteryjnym – fabimicyny. W ramach pracy scharakteryzowałem modele błon biologicznych (zarówno neutralną błonę POPC, wewnętrzną jak i zewnętrzną błonę bakterii *E.Coli* oraz układ podwójny tych błon) dla błon czystych i z wbudowaną fabimicyną. Była to najbardziej szczegółowo przeprowadzona charakterystyka błony ze wszystkich moich prac. W ramach wyników zaobserwowałem dużą zmianę parametrów błony jako efekt wbudowania fabimicyny, a także szeroki zakres badanych modeli błon pozwolił mi na wnioski dotyczące selektywności tej cząsteczki. Otrzymane rezultaty badań pokazały zauważalne zmiany we właściwościach błony wewnętrznej, szczególnie w takich aspektach, jak kompresyjność, dyfuzja lateralna i ciśnienia na błonie. Podobnie model błony zewnętrznej wykazywał istotne zmiany w zmierzonych właściwościach - zaobserwowałem zmiany w wartości pola na lipid, energii nachylenia i dyfuzji lateralnej. Wyniki te potwierdziły postawioną hipotezę, że fabimicyna znacząco zaburza homeostazę właściwości błon zarówno w obu modelach błony bakteryjnej, co implikuje, że efekt antybakteryjny jest powiązany z ich zmianą do tego stopnia, że dochodzi do zaburzenia w jej prawidłowym funkcjonowaniu.

3.6 Podsumowanie

Inżynieria biomedyczna stosuje zasady inżynierii optycznej, elektrycznej, chemicznej, materiałowej, informatycznej i/lub mechanicznej, aby lepiej zrozumieć, modyfikować lub kontrolować systemy biologiczne [57]. Warto jednak podkreślić, że kluczowym czynnikiem w rozwoju tej dziedziny jest postęp w opracowywaniu nowych technik i podejść pomiarowych, które umożliwiają dokładne charakteryzowanie właściwości morfologicznych, biologicznych, fizycznych i chemicznych obiektów biologicznych. Dzięki temu możliwe jest zrozumienie mechanizmów ich funkcjonowania oraz zachodzących w nich zmian i procesów biologicznych, biofizycznych i biochemicznych. *Osiągnięcie tych celów wymaga opracowania zaawansowanych technik pomiarowych, które pozwalają na kompleksowy, wieloparametryczny opis cech obiektów biologicznych.*

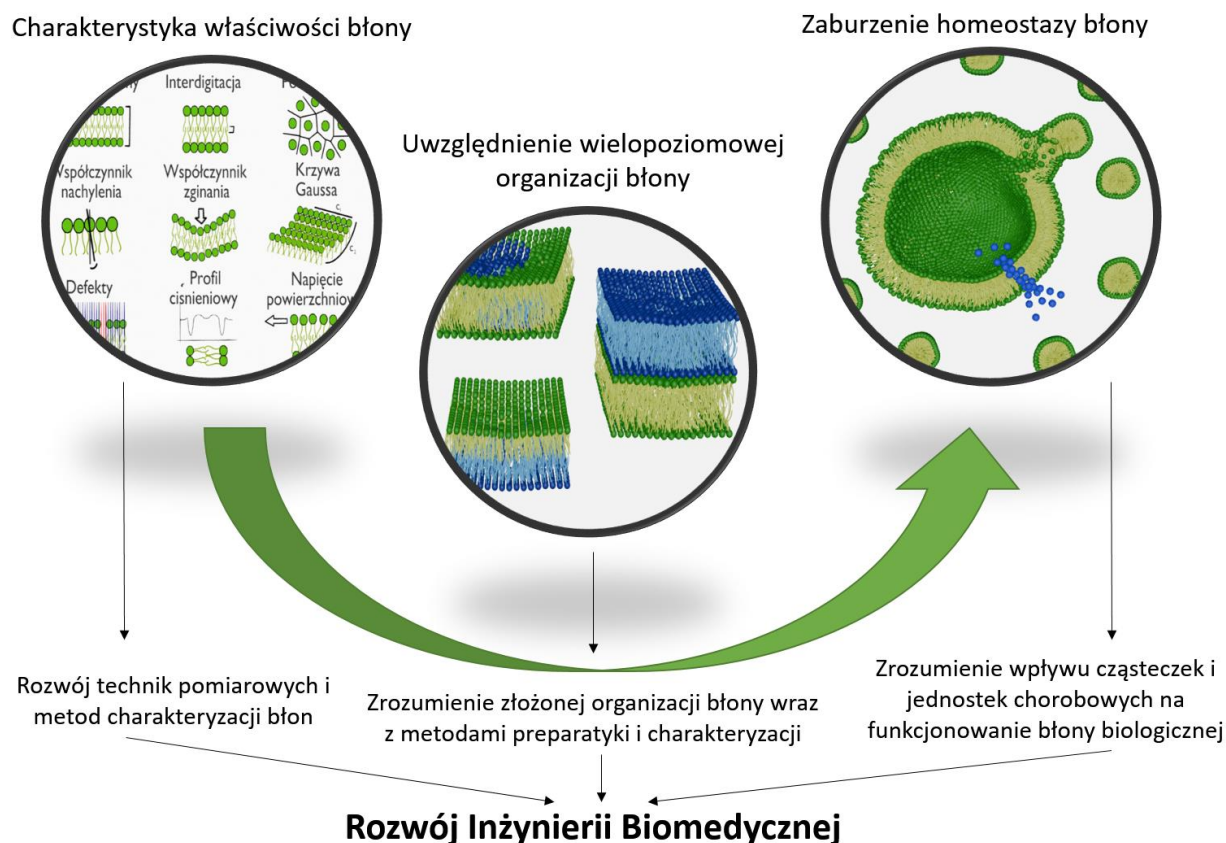
W niniejszym autoreferacie zaprezentowałem moje osiągnięcia naukowe dotyczące opisu i wyznaczenia charakterystyki właściwości błon biologicznych, ze szczególnym naciskiem położonym na tak zwane właściwości wyłaniające się. W głównej mierze skupiłem się na stworzonych przeze mnie procedurach i podejściach opartych na analizie trajektorii dynamiki molekularnej, ale również wspominałem o stworzonych przeze mnie procedurach do analizy mikro-liposomów z domenami oraz analizy numerycznej obrazów otrzymanych z wykorzystaniem techniki mikropipety. Jako swój największy wkład, zaprezentowany w tym autoreferacie, uważam:

- Podejście oparte na szczegółowej charakterystyce modelowej błony lipidowej, co osiągnąłem przez optymalizację i usprawnienie metod, np. optymalizację wyznaczania APL uwzględniającą różną wielkość cząstek, implementację i usprawnienie wyznaczania błędów w algorytmie wyznaczania kompresyjności opartej na grubości błony oraz optymalizację algorytmu do wyznaczania defektów na błonie. Charakterystyka przyczyniła się do lepszego zrozumienia zachowania tych parametrów zwłaszcza w kwestii poszerzenia wiedzy o asymetrii w błonach lipidowych.
- Podejście koncepcyjne oparte o badanie homeostazy parametrów błony oraz jej zaburzenia. Tego typu podejście pozwoliło mi na zupełnie nowe spojrzenie na wiele zjawisk i jednostek chorobowych - z perspektywy właściwości samej błony. Choć do tej pory zastosowałem to podejście przede wszystkim do badania zjawiska antybakteryjnego, oferuje ono unikalną możliwość spojrzenia na wiele problemów z zakresu biofizyki, biologii i medycyny.
- Lepsze zrozumienie organizacji i dynamiki błony na poziomie molekularnym dzięki adaptacji technik eksperymentalnych do badań na mikroliposomach, między innymi adaptacja techniki fluorescencyjnej spektroskopii korelacyjnej ze zmiennością punktową do pomiarów na mikroliposomach (poprzedzona unieruchomieniem mikroliposomów w hydrożelu z agarozą) oraz automatyzacja procesu analizy i wyznaczania parametrów końcowych, automatyzacja analizy pomiarów techniką monowarstw Langmuira, implementacja mikroskopii wysokorozdzielczej SIM²/STED do wizualizacji mikroliposomów i nano-domen.

Schemat wpływu przeprowadzonych przeze mnie badań na rozwój dyscypliny inżynierii biomedycznej zaprezentowałem na rysunku 22, natomiast szczegółowe zestawienie głównych osiągnięć przyczyniających się do rozwoju dyscypliny inżynierii biomedycznej z podziałem na

zagadnienia omawiane w autoreferacie i powiązaniem z pracami zaprezentowałem w tabeli 1. W ramach cyklu uwzględniłem następujące swoje publikacje:

- [C1] Rzycki M., **Drabik D.**, Multifaceted activity of fabimycin: insights from molecular dynamics studies on bacterial membrane models. *J. Chem. Inf. Model.* 64(10) 4204–4217 (2024) doi: 10.1021/acs.jcim.4c00228
- [C2] **Drabik D.***, Hinc P., Stephan M., Cavalcanti R.R.M., Czogalla A., Dimova R., Effect of leaflet asymmetry on the stretching elasticity of lipid bilayers with phosphatidic acid, *Biophys J*, 123(16):2406-2421, doi: 10.1016/j.bpj.2024.05.031
- [C3] **Drabik D.***, Drab M., Penič S., Iglič A., Czogalla A., Investigation of nano- and micro domains formed by ceramide-1-phosphate in freestanding lipid bilayers, *Sci. Rep*, 13, Article number: 18570 (2023), doi: 10.1038/s41598-023-45575-5
- [C4] **Drabik D.***, Czogalla A., Simple Does Not Mean Trivial: Behavior of Phosphatidic Acid in Lipid Mono- and Bilayers, *IJMS*, 22(21), 11523 (2021) doi: 10.3390/ijms222111523
- [C5] Rzycki M., Kaczorowska A., Kraszewski S., **Drabik D.**, A Systematic Approach: Molecular Dynamics Study and Parametrisation of Gemini Type Cationic Surfactants, *IJMS*, 22, 10939 (2021), doi: 10.3390/ijms222010939
- [C6] Rzycki M., **Drabik D.**, Szostak-Paluch K., Hanus-Lorenz B., Kraszewski S., Unraveling the mechanism of octenidine and chlorhexidine on membranes: Does electrostatics matter?, *Biophys J*, 120, 3392–3408 (2021), doi: 10.1016/j.bpj.2021.06.027



Rys 23. Schemat wpływu przeprowadzonych przeze mnie badań na rozwój dyscypliny inżynierii biomedycznej.

W ramach autoreferatu odwołałem się również do moich prac spoza cyklu, są to:

- [A1] Ramanthrikkovil Variyam A., Rzycki M., Yucknovsky A., Stuchebrukhov A.A., **Drabik D.**, Amdursky N., Proton diffusion on the surface of mixed lipid membranes highlights the role of membrane composition, *Biophys J*, 2:S0006-3495, doi: 10.1016/j.bpj.2024.07.002 (2024)
- [A2] Rzycki M., Wasyluk K., **Drabik D.**, Identification of Domain Phases in Selected Lipid Membrane Compositions, *Lect. Notes Comput. Sci.*, 14835, 138-146 (2024)
- [A14] Rzycki M., Kraszewski S., **Drabik D.**, Towards Mimetic Membrane Systems in Molecular Dynamics: Characteristics of E. Coli Membrane System, *Lect. Notes Comput. Sci.*, 12743, 551-563 (2021)
- [K2] **Drabik D.**, Cierluk K., Czogalla A., Spot-variation Fluorescence Correlation Spectroscopy as a tool to study nano-domains in POPA-enriched Giant Unilamellar Vesicles, Biomembranes Days 2022, Potsdam, 2022, Germany. Poster zdeponowano na RG doi: 10.13140/RG.2.2.12672.20484

Tabela 1. Szczegółowe zestawienie głównych osiągnięć przyczyniających się do rozwoju dyscypliny inżynierii biomedycznej z podziałem na zagadnienia omawiane w autoreferacie i powiązaniem, której pracy dotyczyło.

Osiągnięcia szczegółowe	Publikacje
Charakterystyka właściwości błony biologicznej	
<ul style="list-style-type: none"> Opracowanie procedury obliczeniowej uwzględniającej wpływ cząsteczek nie-lipidowych oraz złożonych lipidów typu kardiolipina i lipidA na wyznaczaną wartość pola na lipid (APL), co przedłożyło się na dokładne wyznaczenie tego parametru w pracy badawczej. Zaimplementowanie protokołu do liczenia kompresyjności błon wraz z alternatywnym sposobem liczenia niepewności pomiaru, co pozwoliło na szybsze wyznaczenie parametru kompresyjności przy analizie symulacji dynamiki molekularnej. Zaadaptowanie gotowego narzędzia do wyznaczania współczynnika dyfuzji lateralnej poprzez uwzględnienie wpływu pojedynczych typów lipidów w błonach heterogenicznych. W konsekwencji umożliwiło to uszczegółowienie opisu złożonego procesu dyfuzji w błonie biologicznej, który jest daleki od klasycznych ruchów Browna. Zaadaptowanie metody numerycznej do wyznaczania Gaussowskiej funkcji krzywizny błony. W konsekwencji odniesienie się do problemu istnienia punktu siodła (ang. saddle point) w kontekście wbudowywania się cząsteczek do błony. Zaimplementowanie i usprawnienie wyznaczania defektów z symulacji błon lipidowych. Analiza defektów na błonach pozwoliła na uwzględnienie tego aspektu przy badaniu wbudowywania się cząsteczek, w szczególności białek. W konsekwencji pozwoliła na wykazanie zależności między samymi parametrami błony, a zdolnością białek do wbudowywania się w nie. Zaadaptowanie protokołu do wyznaczania profili ciśnienia lateralnego błony. W konsekwencji podkreślono, jak samo ciśnienie na błonie może mieć znaczenie dla wbudowywania się białek, samego zachowania się błony, a także potencjalnego efektu antybakteryjnego. 	<p>[C5], [C4], [C1]</p> <p>[C5], [C4], [C2], [C1]</p> <p>[C5], [C4], [C3], [C1]</p> <p>[C1]</p> <p>[C4], [C1]</p> <p>[C1]</p>

Uwzględnienie wielopoziomowej organizacji błony	
<ul style="list-style-type: none"> • Stworzenie i zastosowanie metodyki do wyznaczenia pola domen w mikroliposomach znakowanych jednym typem barwnika. W klasycznym ujęciu konieczne było zastosowanie dwóch barwników, a to, ze względu na fazę lub organizację błony, a także konieczność niezależnego wzbudzenia, bywało wymagające. Redukcja tego podejścia do jednego barwnika usprawniła proces i pozwoliła na oszacowanie pokrycia domen o nie zdefiniowanych wcześniej fazach. 	[C3]
<ul style="list-style-type: none"> • Wykorzystanie mikroskopii STED i SIM² do detekcji nano-domen w mikroliposomach, co pozwoliło na wizualizację nano-domen i lepsze zrozumienie organizacji błony. 	[C3]
<ul style="list-style-type: none"> • Skorelowanie wyników eksperymentalnych z symulacjami Monte Carlo, a w konsekwencji obserwacji i zrozumienia dynamiki i ewolucji domen w układach niejednorodnych. 	[C3]
<ul style="list-style-type: none"> • Badania wpływu asymetrii na właściwości błony, w szczególności kompresyjność, z wykorzystaniem techniki mikropipety. Stworzenie algorytmów do analizy otrzymywanych obrazów celem automatyzacji procesu. W konsekwencji zrozumienie wpływu preparatyki asymetrycznych pęcherzyków na jej właściwości mechaniczne. 	[C2]
<ul style="list-style-type: none"> • Zaplanowanie symulacji błon podwójnych. Charakteryzacja i ocena zmian w homeostazie właściwości błony skutkiem obecności w układzie drugiej błony. W konsekwencji zwiększenie wiedzy o wpływie sąsiadującej błony na zachowanie i parametry obu błon oraz proces wbudowywania się cząsteczek 	[C1]
Zaburzenie homeostazy błony	
<ul style="list-style-type: none"> • Zaproponowanie alternatywnego mechanizmu działania oktenidyny i chlorheksydydny opartego na zmianie właściwości błony lipidowej. Przeprowadzone badania pozwoliły na wykluczenie tezy o działaniu tych cząsteczek opartych na elektrostatyce i wykazały potencjalny efekt na właściwości mechaniczne samych błon. 	[C6]
<ul style="list-style-type: none"> • Zaproponowanie przodujących grup cząsteczek gemini o największym potencjalnie antybakteryjnym na bazie wykonanej charakteryzacji właściwości błon z wybranymi substancjami typu gemini. Badania te pozwoliły na detekcję potencjalnych zmian na poziomie błony, wyszczególnienie właściwości błony, istotnych do uzyskania efektywnej substancji antybakteryjnej. 	[C5]
<ul style="list-style-type: none"> • Dokonanie oceny wpływu cząsteczki antybakteryjnej fabimicyny wraz z oceną selektywności na właściwości modeli wewnętrznej i zewnętrznej błony bakteryjnej <i>E.Coli</i>. Podejście to pozwoliło na poznanie mechanizmu molekularnego i wpływu na błonę bakteryjną tej relatywnie nowej substancji antybakteryjnej. 	[C1]

W niniejszym cyklu, o łącznym współczynniku wpływu $IF= 29.72$ oraz całkowitej liczbie punktów MNiSW (zgodnie z rokiem opublikowania) równej 760 pkt.:

- w 3 jestem pierwszym autorem, [C2], [C3], [C4];
- w 2 jestem ostatnim autorem, [C1], [C5];
- w 1 jestem drugim autorem, [C6];

Opisane prace badawcze zrealizowałem z innymi jednostkami naukowymi – Uniwersytetem Wrocławskim, Instytutem Maxa Plancka (Poczdam, Niemcy) oraz Uniwersytetem w Lublanie (Lubjana, Słowenia). Zaprezentowane osiągnięcie naukowe jest motywacją moich dalszych badań naukowych nad oceną wpływu zjawiska starzenia się na zaburzenie homeostazy właściwości błony. Tematyka ta była przedmiotem składanego wniosku NCN Sonata, który niestety nie został zakwalifikowany do finansowania w II etapie (2023/51/D/NZ7/00592). W ten edycji NCN Sonata projekt został zmodyfikowany, by położyć większy nacisk na kwestie asymetrii.

3.7 Bibliografia

1. Watson, H., *Essays Biochem* **2015**, *59*, 43-69. DOI 10.1042/bse0590043.
2. Deamer, D., *Life (Basel)* **2017**, *7* (1). DOI 10.3390/life7010005.
3. Hanczyc, M. M.; Monnard, P. A., *Curr Opin Chem Biol* **2017**, *40*, 78-86. DOI 10.1016/j.cbpa.2017.07.009.
4. MacDonald, I. A.; Kuehn, M. J., *Res Microbiol* **2012**, *163* (9-10), 607-18. DOI 10.1016/j.resmic.2012.10.020.
5. Paumard, P.; Vaillier, J.; Coulary, B.; Schaeffer, J.; Soubannier, V.; Mueller, D. M.; Brethes, D.; di Rago, J. P.; Velours, J., *EMBO J* **2002**, *21* (3), 221-30. DOI 10.1093/emboj/21.3.221.
6. Raven, J. A., *J Plant Physiol* **2021**, *257*, 153342. DOI 10.1016/j.jplph.2020.153342.
7. Liang, H.; Mu, H.; Jean-Francois, F.; Lakshman, B.; Sarkar-Banerjee, S.; Zhuang, Y.; Zeng, Y.; Gao, W.; Zasko, A. M.; Nissley, D. V.; Gorfe, A. A.; Zhao, W.; Zhou, Y., *Life Sci Alliance* **2019**, *2* (4). DOI 10.26508/lsa.201900343.
8. Schumann, J., *Membranes (Basel)* **2022**, *12* (8). DOI 10.3390/membranes12080748.
9. Mouchlis, V. D.; Bucher, D.; McCammon, J. A.; Dennis, E. A., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (6), E516-E525. DOI 10.1073/pnas.1424651112.
10. Cooper, G., *The Cell: A Molecular Approach*. **2000**. DOI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9898/>.
11. Renne, M. F.; Ernst, R., *Trends Biochem Sci* **2023**, *48* (11), 963-977. DOI 10.1016/j.tibs.2023.08.004.
12. Levental, K. R.; Malmberg, E.; Symons, J. L.; Fan, Y. Y.; Chapkin, R. S.; Ernst, R.; Levental, I., *Nat Commun* **2020**, *11* (1), 1339. DOI 10.1038/s41467-020-15203-1.
13. Lee, T.-H.; Charchar, P.; Separovic, F.; Reid, G. E.; Yarovsky, I.; Aguilar, M.-I., *Chemical Science* **2024**, *15* (10), 3408-3427. DOI 10.1039/D3SC04523D.
14. Epand, R. M.; Walker, C.; Epand, R. F.; Magarvey, N. A., *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1858* (5), 980-7. DOI 10.1016/j.bbamem.2015.10.018.
15. Marchesi, V. T., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (26), 9093-8. DOI 10.1073/pnas.0503181102.
16. Phillip, J. M.; Aifuwa, I.; Walston, J.; Wirtz, D., *Annu Rev Biomed Eng* **2015**, *17*, 113-141. DOI 10.1146/annurev-bioeng-071114-040829.
17. Pelissier, F. A.; Garbe, J. C.; Ananthanarayanan, B.; Miyano, M.; Lin, C.; Jokela, T.; Kumar, S.; Stampfer, M. R.; Lorens, J. B.; LaBarge, M. A., *Cell Rep* **2014**, *7* (6), 1926-39. DOI 10.1016/j.celrep.2014.05.021.
18. Martin, M. G.; Dotti, C. G., *Front Cell Dev Biol* **2022**, *10*, 1031007. DOI 10.3389/fcell.2022.1031007.
19. Alvarez, E.; Ruiz-Gutierrez, V.; Sobrino, F.; Santa-Maria, C., *Clin Exp Immunol* **2001**, *124* (1), 95-102. DOI 10.1046/j.1365-2249.2001.01490.x.
20. Karal, M. A.; Levadnyy, V.; Yamazaki, M., *Phys Chem Chem Phys* **2016**, *18* (19), 13487-95. DOI 10.1039/c6cp01184e.
21. Ashkar, R.; Nagao, M.; Butler, P. D.; Woodka, A. C.; Sen, M. K.; Koga, T., *Biophys J* **2015**, *109* (1), 106-12. DOI 10.1016/j.bpj.2015.05.033.
22. Frallicciardi, J.; Melcr, J.; Siginou, P.; Marrink, S. J.; Poolman, B., *Nat Commun* **2022**, *13* (1), 1605. DOI 10.1038/s41467-022-29272-x.
23. Cohen, B. E., *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*. DOI doi.org/10.3389/fcell.2018.00076
24. Li, L. B.; Vorobyov, I.; Allen, T. W., *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1818* (2), 135-45. DOI 10.1016/j.bbamem.2011.10.026.
25. Fowler, P. W.; Williamson, J. J.; Sansom, M. S.; Olmsted, P. D., *J Am Chem Soc* **2016**, *138* (36), 11633-42. DOI 10.1021/jacs.6b04880.
26. Sarkis, J.; Vie, V., *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, *8*, 270. DOI 10.3389/fbioe.2020.00270.

27. Kulig, W.; Korolainen, H.; Zatorska, M.; Kwolek, U.; Wydro, P.; Kepczynski, M.; Rog, T., *Langmuir* **2019**, *35* (17), 5944-5956. DOI 10.1021/acs.langmuir.9b00381.
28. Doktorova, M.; LeVine, M. V.; Khelashvili, G.; Weinstein, H., *Biophys J* **2019**, *116* (3), 487-502. DOI 10.1016/j.bpj.2018.12.016.
29. Hu, M.; Briguglio, J. J.; Deserno, M., *Biophys J* **2012**, *102* (6), 1403-10. DOI 10.1016/j.bpj.2012.02.013.
30. Rawicz, W.; Olbrich, K. C.; McIntosh, T.; Needham, D.; Evans, E., *Biophys J* **2000**, *79* (1), 328-39. DOI 10.1016/S0006-3495(00)76295-3.
31. Hossein, A.; Deserno, M., *Biophys J* **2020**, *118* (3), 624-642. DOI 10.1016/j.bpj.2019.11.3398.
32. Jan Akhunzada, M.; D'Autilia, F.; Chandramouli, B.; Bhattacharjee, N.; Catte, A.; Di Rienzo, R.; Cardarelli, F.; Brancato, G., *Scientific Reports* **2019**, *9* (1), 1508. DOI 10.1038/s41598-018-37814-x.
33. Béziat, C.; Jaillais, Y., *Journal of Experimental Botany* **2023**, *74* (8), 2479-2488. DOI 10.1093/jxb/erad032.
34. Wolf, M. G.; Grubmuller, H.; Groenhof, G., *Biophys J* **2014**, *107* (1), 76-87. DOI 10.1016/j.bpj.2014.04.062.
35. Giorgino, T., *J Open Source Softw* **2019**, *4* (41), 1698. DOI 10.21105/joss.01698.
36. Fleming, K. G., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2023**, *120* (44), e2315655120. DOI 10.1073/pnas.2315655120.
37. Cui, H.; Lyman, E.; Voth, G. A., *Biophys J* **2011**, *100* (5), 1271-9. DOI 10.1016/j.bpj.2011.01.036.
38. van der Pol, R. W. I.; Brinkmann, B. W.; Sevink, G. J. A., *J Chem Theory Comput* **2024**, *20* (7), 2888-2900. DOI 10.1021/acs.jctc.4c00082.
39. van Hilten, N.; Stroh, K. S.; Risselada, H. J., *J Chem Theory Comput* **2022**, *18* (7), 4503-4514. DOI 10.1021/acs.jctc.2c00222.
40. Kulakowski, G.; Bousquet, H.; Manneville, J. B.; Bassereau, P.; Goud, B.; Oesterlin, L. K., *Traffic* **2018**, *19* (7), 536-545. DOI 10.1111/tra.12568.
41. Boyd, K. J.; Alder, N. N.; May, E. R., *Biophys J* **2018**, *114* (9), 2116-2127. DOI 10.1016/j.bpj.2018.04.001.
42. Sreekumari, A.; Lipowsky, R., *Soft Matter* **2022**, *18* (32), 6066-6078. DOI 10.1039/d2sm00618a.
43. Lipowsky, R.; Ghosh, R.; Satarifard, V.; Sreekumari, A.; Zamaletdinov, M.; Rozycki, B.; Miettinen, M.; Grafmuller, A., *Biomolecules* **2023**, *13* (6). DOI 10.3390/biom13060926.
44. Pinot, M.; Vanni, S.; Pagnotta, S.; Lacas-Gervais, S.; Payet, L. A.; Ferreira, T.; Gautier, R.; Goud, B.; Antony, B.; Barelli, H., *Science* **2014**, *345* (6197), 693-7. DOI 10.1126/science.1255288.
45. Ahmed, R.; Huang, J.; Lifshitz, R.; Martinez Pomier, K.; Melacini, G., *J Biol Chem* **2022**, *298* (2), 101502. DOI 10.1016/j.jbc.2021.101502.
46. Bartos, L.; Vacha, R., *Biophys J* **2024**, *123* (6), 693-702. DOI 10.1016/j.bpj.2024.02.006.
47. Moore, T. C.; Iacovella, C. R.; Leonhard, A. C.; Bunge, A. L.; McCabe, C., *Biochem Biophys Res Commun* **2018**, *498* (2), 313-318. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.09.040.
48. Parkin, J.; Chavent, M.; Khalid, S., *Biophys J* **2015**, *109* (3), 461-8. DOI 10.1016/j.bpj.2015.06.050.
49. Bennett, W. F.; Tieleman, D. P., *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1828* (8), 1765-76. DOI 10.1016/j.bbamem.2013.03.004.
50. Canner, S. W.; Feller, S. E.; Wassall, S. R., *J Phys Chem B* **2021**, *125* (48), 13158-13167. DOI 10.1021/acs.jpcc.1c06511.
51. Elani, Y.; Purushothaman, S.; Booth, P. J.; Seddon, J. M.; Brooks, N. J.; Law, R. V.; Ces, O., *Chem Commun (Camb)* **2015**, *51* (32), 6976-9. DOI 10.1039/c5cc00712g.

52. Kakuda, S.; Suresh, P.; Li, G.; London, E., *J Lipid Res* **2022**, *63* (1), 100155. DOI 10.1016/j.jlr.2021.100155.
53. Park, S.; Im, W.; Pastor, R. W., *Biophys J* **2021**, *120* (22), 5041-5059. DOI 10.1016/j.bpj.2021.10.009.
54. Doktorova, M.; Weinstein, H., *Biophys J* **2018**, *115* (9), 1638-1643. DOI 10.1016/j.bpj.2018.09.008.
55. Miettinen, M. S.; Lipowsky, R., *Nano Lett* **2019**, *19* (8), 5011-5016. DOI 10.1021/acs.nanolett.9b01239.
56. Pedebos, C.; Smith, I. P. S.; Boags, A.; Khalid, S., *Structure* **2021**, *29* (5), 444-456 e2. DOI 10.1016/j.str.2021.01.009.
57. Bronzino, J. D., Chapter 1 - Biomedical Engineering: A Historical Perspective. In *Introduction to Biomedical Engineering (Third Edition)*, Enderle, J. D.; Bronzino, J. D., Eds. Academic Press: Boston, 2012; pp 1-33.

4. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Po obronie doktoratu na Politechnice Wrocławskiej zaaplikowałem i zostałem zatrudniony jako post-doc w projekcie Sonata Bis (2018/30/E/NZ1/00099) w Zakładzie Cytobiochemii na **Uniwersytecie Wrocławskim**. Zdecydowałem się na post-doca w polskim ośrodku ze względu na trwającą pandemię. W tym okresie podróże zagraniczne były utrudnione bądź, w niektórych przypadkach, niemożliwe, a sam czas trwania tych obostrzeń nieznany. W ramach tego projektu dokonywałem przede wszystkim biofizycznej charakteryzacji błon lipidowych z kwasem fosfatydowym lub ceramido-1-fosforanami (C1P), a sam ten okres zaowocował kilkoma publikacjami naukowymi i doniesieniami konferencyjnymi ([A8], [A12], [R2], [K2]). W ramach tego zatrudnienia poszerzyłem swój warsztat eksperymentalny o techniki monowarstw Langmuira, a także zapoznałem się i wykorzystałem nowe techniki wysokorozdzielczego obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej (SIM², STED). Ponadto wykorzystałem i zaadaptowałem do moich badań wariant fluorescencyjnej spektroskopii korelacyjnej – tak zwany *spot-variation FCS*. W tej technice zmienia się rozmiar objętości wzbudzającej, co pozwala na wykreślenie praw dyfuzyjnych (czas dyfuzji w funkcji kwadratu średnicy plamki wzbudzającej). Charakter otrzymanego prawa dyfuzyjnego informuje o charakterze dyfuzji na błonie – czy jest ona swobodna czy występują klastery, które dyfuzję swobodną ograniczają. Z racji tego, że na Uniwersytecie Wrocławskim w czasie mojego zatrudnienia był realizowany program IDUB (Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza), wykorzystałem możliwość aplikowania zarówno o grant wewnętrzny (BPIDUB.4610.616.2021, Umowa nr BPIDUB.6.2022, II edycja, tytuł „Indukowane starzeniem i oksydacją zmiany właściwości mechanicznych błon lipidowych”), jak i zrealizowałem 3 miesięczny staż naukowy (BPIDUB.4610.15.2022.TW, Umowa stażowa IDUB nr 14/2022) do wiodącego ośrodka naukowego za granicą. W ramach wyjazdu wybrałem **Instytut Maxa Plancka** w Poczdamie (Niemcy), gdzie znajduje się laboratorium biofizyczne dr hab. Rumiany Dimovy. Tam zapoznałem się i wykorzystałem technikę pomiarową aspiracji mikropipetą, w tym także z takimi procesami jak wyrabianie mikro-pipet za pomocą mikrokuźni oraz metodami preparatyki błon asymetrycznych. Jest to o tyle cenne, że błony asymetryczne są naturalne w biologii – wszystkie komórki mają błony asymetryczne (wewnętrzny i zewnętrzny listek różni się składem), natomiast dotychczasowe modele błon – błony lipidowe – są w większości symetryczne. Techniki te pozwalają na otrzymywanie modeli znacząco bardziej zbliżonych do obiektów rzeczywistych. Na wyjeździe zapoznałem się też z preparatyką i wykorzystaniem układów mikrofluidycznych – poznałem metody tworzenia form mikrofluidycznych (z angielskiego: *master molds*), sposoby przygotowania polimeru PDMS i wykorzystania ich do odlania układu mikrofluidycznego oraz przygotowania tego układu do preparatyki bądź pomiaru. Wiedzę tą wykorzystałem do zaadaptowania technologii i jej wykorzystania (między innymi w przygotowywanym i wysłanym projekcie NCN w ramach konkursu Sonata). Sam staż w Instytucie Maxa Plancka zakończył się wspólną publikacją [C2]. W ramach otrzymanego grantu wewnętrznego (realizowanego na Uniwersytecie Wrocławskim) skupiłem się na badaniu jak starzenie (a konkretnie powiązane ze starzeniem

zmiany składu lipidowego) wpływa na zachowanie i charakterystykę błon lipidowych. W ramach wspomnianego grantu wewnętrznego podjąłem **trzy problemy naukowe**. Pierwszym z nich było opracowanie modelu lipidowego błony komórki neuronu. Poprzez mieszankę różnych typów lipidów i dane lipidomiczne otrzymałem i scharakteryzowałem taki model. Drugim zagadnieniem było odtworzenie i uzyskanie funkcjonalnych układów mikrofluidycznych do tworzenia pęcherzyków asymetrycznych (dodatkowa metoda tworzenia ich jako uzupełnienie już poznanych). Trzecim zagadnieniem było ocena wpływu utlenienia lipidów na samo zachowanie modelu, gdyż utlenienie jest literaturowo przedstawiane jako zjawisko mające największy związek ze starzeniem komórkowym. Problem ten wymagał adaptacji istniejących protokołów do wyznaczenia poziomu utleniania na błonach lipidowych. Równocześnie do tych badań wykorzystywałem moją wiedzę do wspierania prac badawczych kolegów i koleżanek z zespołu. W ramach nawiązanej przeze mnie współpracy z dr Agnieszką Biernatowską (Uniwersytet Wrocławski) oraz prowadzonych badań powstała praca naukowa [A12], w temacie oddziaływania między białek MPP a białkami flotyliny. W ramach tej pracy wykorzystałem moją wiedzę do prowadzenia symulacji dynamiki molekularnej i zbadałem oddziaływanie między białkiem MPP i odpowiednio białkiem Flotyliny1 i Flotyliny2. Przeprowadzone przeze mnie symulacje numeryczne zostały potwierdzone i zwalidowane eksperymentalnie przez zespół dr Biernatowskiej i przyczyniły się do zwiększenia wartości samej pracy.

Po zakończeniu post-doca postanowiłem wrócić na moją *alma mater* – Politechnikę Wrocławską, gdzie mogłem skupić się na realizowaniu tematyki, która jest dla mnie najbardziej interesująca. Moje obecnie prowadzone multidyscyplinarne prace badawczo-rozwojowe na Politechnice Wrocławskiej, stanowiące badania podstawowe oparte na połączeniu symulacji numerycznych z badaniami eksperymentalnymi polegają na badaniu wpływu składu lipidowego na zmianach i zaburzeniach w homeostazie parametrów błony lipidowej. Dokonuje złożonej charakteryzacji *in silico* parametrów błony (takiej jak przedstawiona w tym autoreferacie). Ponadto wykorzystuję również znane mi techniki eksperymentalne do wspierania i weryfikacji zgodności wyznaczanych parametrów z układem rzeczywistym. W szczególności, że w moim rozwoju naukowym zawsze starałem się wychodzić poza sztywne ramy teoretyka/eksperymentatora - dlatego też staram się rozwijać w obu zakresach. Daje mi to unikalne możliwości, bo każdy problem mogę adresować symulacyjnie, a następnie weryfikować go eksperymentalnie – lub odwrotnie. Takie połączenie technik *in silico* i *in vitro* pozwala na dużo bardziej kompleksowe badania i radykalnie zwiększa istotność publikowanych prac naukowych. Zespół, w którym obecnie pracuję, posiada dodatkowo kompetencje z zakresu sztucznej inteligencji oraz sieci neuronowych. Dlatego też, korzystając z okazji, poznaję te podejścia, gdyż uważam, że nowe narzędzia, a także aktualizacja i usprawnienie wykonywanych przeze mnie analiz otrzymywanych wyników z wykorzystaniem tych podejść pozwoli na usprawnienie mojej pracy badawczej. Jednocześnie utrzymuję współpracę naukową z prof. Alesa Igličem z Uniwersytetu w Lublanie oraz prof. Nadavem Amdurskim z Izraelskiego Technionu (współprace te są opisane w II.10 w wykazie osiągnięć naukowych). Niemniej, efektywny naukowiec to nie tylko praca naukowa, ale również zdolność i chęć do pozyskiwania środków zewnętrznych. W ramach mojego czasu zatrudnienia na Politechnice Wrocławskiej aplikowałem o trzy zewnętrzne projekty.

Realizowany na Uniwersytecie Wrocławskim wcześniej wspomniany grant wewnętrzny został wykonany jedynie na modelu błony opartym o opublikowaną i dostępną lipidomikę. Zauważyłem, że takie podejście może nie dawać pełnego obrazu sytuacji, gdyż mnogość cząsteczek lipidu obecna w błonie biologicznej może znacząco wpływać na jej parametry. Dlatego też chcę rozszerzyć moje badania o dodatkowe modele oparte na wynikach otrzymywane z hodowanych komórek. Pozwoli to na indukowanie starzenia w komórkach, tworzenie precyzyjnych modeli i ocenę wpływu tego procesu na parametry błony. Gotowe modele błon będzie można wykorzystać do oceny działania substancji o potencjale do spowalniania procesu starzenia. Uważam, że jest to temat istotny zarówno w ujęciu naukowym jak i ekonomicznym. Wraz ze starzeniem się naszego społeczeństwa, substancje, które mogłyby spowolnić ten proces, mają znaczący wpływ na ekonomię społeczną, ponieważ mogą umożliwić ludziom dłuższe funkcjonowanie w dobrym zdrowiu. Uzyskanie szczegółowego wglądu w złożone zjawiska starzenia się błon biologicznych uzupełni jego opis, ponieważ liczba prac skupiających się na błonach biologicznych, zwłaszcza błonach plazmatycznych, jest niewielka. O finansowanie projektu w tej tematyce wystąpiłem we współpracy z Uniwersytetem Wrocławskim o finansowanie do NCN w ramach projektu Sonata (2023/51/D/NZ7/00592), ale niestety wniosek nie został zakwalifikowany do finansowania przez panel II (wniosek planuję wzbogacić o nowe aspekty i ponownie go złożyć jako projekt europejski).

Drugie zagadnienie jest przedmiotem zgłoszenia grantowego w konkursie Daina (2024/52/L/NZ9/00390), którego choć nie będę kierownikiem, to jestem tam wykonawcą i przyczyniłem się do powstania tej tematyki realizując pod koniec doktoratu 6-miesięczny staż naukowy w *centrum nauk fizycznych i technicznych (FTMC)* w Wilnie (Litwa). Tematyka dotyczyła opracowania nowej metodologii biofizycznej do badania przesiewowego możliwości sposobów działania cząsteczek przeciwbakteryjnych związanych z zaburzeniami mechaniki błon lipidowych, a w konsekwencji z hamowaniem transportu błon bakteryjnych. W klasycznych terapiach podejście oparte na kluczu i zamku stosuje się wobec białek/enzymów bakteryjnych. Natomiast chciałbym się skupić na błonie lipidowej, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w mechanice błony, która nie została jeszcze opracowana, z wyjątkiem kontekstu peptydów kationowych. Opracowanie innowacyjnej metodologii badań łączących badania teoretyczne z zakresu dynamiki molekularnej i zaawansowane analizy numeryczne wsparte algorytmami sztucznej inteligencji z badaniami eksperymentalnymi z zakresu mechaniki materiałów i biofizyki membran, umożliwiając w ten sposób efektywne nowatorska strategia antyseptyczna. Relatywnie prosta (w porównaniu do innych technik) metoda oparta na badaniu zaburzeń mechanicznych w błonie pozwoli znacząco zwiększyć świadomość tego zagadnienia i ułatwi detekcję metod ich przeciwdziałania. Sama współpraca z tym ośrodkiem doprowadziła do powstania pracy [A15]. Niestety wniosek nie został zakwalifikowany do finansowania przez panel II.

Trzecie zagadnienie jest przedmiotem naukowej współpracy zagranicznej. Było również zgłoszeniem grantowego do fundacji Allena w ramach międzynarodowego projektu o tytule „New approaches for investigating membrane biophysics by following proton transfer & diffusion on the surface of membranes” (projekt w ramach Membrane Biophysics – Approaches, Allen Frontiers Group, R-202402-14999), w którym występowałem jako współpracownik odpowiadający za część teoretyczno-symulacyjną. Projekt został złożony

w konsorcjum międzynarodowym, jego głównym liderem jest profesor Nadav Amdursky. Oprócz niego w projekcie miały brać udział profesor Claudia Steinem z University of Göttingen oraz dr Huong Kratochvil z University of North Carolina at Chapel Hill. Niestety projekt ten nie został zakwalifikowany do finansowania, natomiast współpraca ta jest w dalszym ciągu kontynuowana i prowadzone są badania mające na celu przygotowanie kolejnych wniosków do nowych programów, co pozwoli na sformalizowaną współpracę tych badań oraz zdobycie środków na ich finansowanie. Tematyka opiera się na śledzeniu transferu protonu i dyfuzji protonu na powierzchni błon biologicznych, aby uzyskać wgląd w inne parametry biofizyczne błony. Zmieniając parametry biofizyczne błon, a także ich organizację, będziemy w stanie precyzyjnie zlokalizować czynniki mające największy wpływ na transfer protonów.

Podsumowując, przez okres od obrony doktoratu (rok 2020) do roku 2024 realizowałem działalność naukową na polskich uczelniach Politechnice Wrocławskiej oraz Uniwersytecie Wrocławskim. Jednocześnie zrealizowałem 3 miesięczny wyjazd jako gościnny post-doc w Instytucie Maxa Plancka w Poczdamie. Utrzymywałem też zagraniczne współprace z dwiema jednostkami zagranicznymi (Uniwersytet w Lublanie oraz Technionu w Izraelu). Wykazywałem się też aktywnością w aplikowaniu o fundusze na realizację badań oraz realizowałem swoje obowiązki jako pracownik naukowo-dydaktyczny. W okresie przed obroną doktoratu dodatkowo zrealizowałem 6 miesięczny staż naukowy w Centrum Nauk Fizycznych w Wilnie oraz, jako student, 3 miesięczny staż naukowy w Interuniversity Microelectronics Centre w Leuven. Jestem przekonany, że przedstawiony opis pokazuje, że aktywnie i w dużej mierze samodzielnie realizuję zadania, których oczekuje się od pracownika naukowego.

5. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.

5.1 Aktywność w przygotowaniu nowych zajęć i materiałów dydaktycznych na kierunku Inżynieria Biomedyczna

- 1) Przygotowanie kursu Computer Graphics (Biomedical Informatics, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 30 godzin wykładu, 30 godzin zajęć laboratoryjnych) – uaktualniłem siedem list z grafiki komputerowej do nowej wersji oprogramowania i wzbogaciłem o dodatkowe zadania. Ponadto, przygotowałem trzy nowe listy z oprogramowania Blender z zakresu wykorzystywania addonów, symulacji opartych na fizyce oraz rzeźbienia 3D (39 stron materiałów dydaktycznych). Stworzyłem listy zadań z API Vulkan do grafiki 3D (na języku programowania Python, 34 strony materiałów dydaktycznych oraz 100 stron materiałów dodatkowych) oraz wykorzystania modelu Stable Diffusion do tworzenia generatywnej grafiki 2D (16 stron materiałów dydaktycznych). Przygotowałem od podstaw 30 godzinny wykład do kursu z zakresu wykorzystywania i praktycznych zastosowań w inżynierii biomedycznej oprogramowania Blender, Vulkan API oraz Stable Diffusion. Przygotowałem karty przedmiotu do wewnętrznego systemu Syllabus.
- 2) Uaktualnienie list z Informatyki Medycznej (Kierunek lekarski, Wydział Medyczny, 30 godzin zajęć laboratoryjnych) – zmodyfikowałem listy zadań z Narzędzi Informatycznych w Medycynie o opis poprawnego wykonywania przypisów. Zaadaptowałem arkusze Excel z materiałów dydaktycznych z Podstaw Analizy Danych do modułu Podstawowych narzędzi analizy danych (20 zakładek arkusza o różnej tematyce od formatowania i korzystania z formuł po regresję liniową i podstawową statystykę). Przygotowałem materiały dydaktycznych do tematyki Modelowanie matematycznego w medycynie – kod źródłowy i listy zadań z zakresu wykorzystania formuły Widmarka oraz prostego modelu farmakokinetycznego do wyznaczania poziomu glukozy we krwi i płynie tkankowym.
- 3) Uaktualnienie list z Fizjologii (Inżynieria Biomedyczna, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 9 godzin laboratorium) – przeformatowałem z wykorzystaniem środowiska Latex i ujednoliciłem językowo wcześniej dostępne listy zadań badawczych do kursu. Rozbudowałem ćwiczenie 3, czyli wyznaczania punktu izoelektrycznego amfolitów w koloidalnych roztworach białek tak aby wymagał podobnego zaangażowania czasowego jak pozostałe ćwiczenia. Stworzyłem wspólnie z dr Marleną Gąsior-Głogowską od podstaw listy do ćwiczenia wstępnego.

- 4) Uaktualnienie listy z Wstępu do Programowania (Inżynieria Biomedyczna, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 45 godzin laboratorium) - przygotowałem zadania do listy o tematyce Bibliotek Wysokopoziomowych opartej na farmakokinetyce, gdzie studenci mieli za zadanie, wykorzystując biblioteki pandas, numpy i matplotlib mieli napisać prosty model glukozy. Taki model następnie mieli dopasować do danych rzeczywistych poprzez zmianę parametrów modelu, przy jednoczesnym opisanu u zrozumieniu ich znaczenia.
- 5) Przygotowanie materiałów dydaktycznych do Podstaw Analizy Danych (Inżynieria Biomedyczna, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 30 godzin laboratorium) – stworzyłem od podstaw 4 arkusze tematyczne z zakresu obsługi oprogramowania Excel, korzystania i modyfikowania funkcji, formatowania warunkowego, tabeli (w tym tabeli przestawnych) oraz obsługi makr i pisania własnych funkcji z wykorzystaniem języka Visual Basic. Uaktualniłem listy zadań z Origina (przygotowanych w trakcie doktoratu).
- 6) Przygotowanie i aktualizacja do systemu Sylabus kart do kursów: Modeling of Biological Systems (wykład+laboratorium+seminarium), Modelowanie procesów fizjologicznych (laboratorium) oraz Modelowanie w projektowaniu leków (laboratorium+seminarium).

-- przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora --

- 7) Przygotowanie materiałów dydaktycznych do Technologii Informacyjnych (Inżynieria Biomedyczna, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 30 godzin laboratorium) – stworzyłem od podstaw listy (10 rozbudowanych zagadnień) z wykorzystania i obsługi oprogramowania Origin. Zadania uwzględniały tworzenie wykresów (w tych wykresów 3D), prace na zbiorach danych i macierzach, dokonywanie statystyki, liniowego i nieliniowego dopasowywanie funkcji do danych (w tym implementacji własnych danych) oraz numerycznego całkowania (27 stron materiałów dydaktycznych).
- 8) Uaktualnienie i przygotowanie Grafiki komputerowej (Inżynieria Biomedyczna, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, 15 godzin laboratorium) – stworzyłem od podstaw 8 list zadań do grafiki komputerowej w zakresie wykorzystania i obsługi oprogramowania Blender. W ramach list studenci zapoznali się z podstawami modelowania w 3D, modyfikacji i transformacji brył, nakładania tekstur, edycji oświetlenia w scenie, eksportowania modeli do wydruku 3D oraz robienia prostych animacji.

5.2 Praca na rzecz zaplecza laboratoryjnego i technicznego

Brałem udział w przygotowaniu specyfikacji technicznej i/lub realizacji zakupu niezbędnych odczynników do stanowisk na poniższe zajęcia laboratoryjne z Fizjologii. Przygotowałem stanowiska pomiarowe do realizacji zajęć laboratoryjnych z Fizjologii.

5.3 Prowadzone zajęcia dydaktyczne

Lp.	Nazwa kursu	Liczba godzin
Rok akademicki 2024/2025 (tylko semestr zimowy)		
1	Informatyka Medyczna / W11LEK-SJ0201C	60
2	Computer Graphics (Laboratorium) / W11IBP-SI1036L	30
3	Computer Graphics (Wykład) / W11IBP-SI1036W	30
Suma (pensum 210 godzin/rok)		120
Rok akademicki 2023/2024		
1	Fizjologia / MDP002016L	36
2	Praca dyplomowa / FTP002080D	16
3	Wprowadzenie do Programowania / ETP001013W	90
4	Biofizyka / BIM031015L	30
5	Informatyka Medyczna / W11LEK-SJ0201C	30
6	Podstawy Analizy Danych / CHP001008C	30
7	Introduction to Programming / W11MIP-SI0001L	45
Suma (pensum 225 godzin/rok)		277
Dydaktyka przed uzyskaniem stopnia doktora		
Rok akademicki 2017/2018		
1	Grafika komputerowa / INP002006L	120
Suma (pensum 90 godzin/rok)		120
Rok akademicki 2016/2017		
1	Grafika komputerowa / INP002006L	120
Suma (pensum 90 godzin/rok)		120
Rok akademicki 2015/2016		
1	Fizyka 2.7 / FZP002001L	45
2	Technologie Informacyjne / INP001112L	30
3	Fizyka 1.3A / FZP001064C	30
Suma (pensum 90 godzin/rok)		105
Rok akademicki 2014/2015		
1	Fizyka 2.7 / FZP002001L	45
2	Technologie Informacyjne / INP001112L	30
Suma (pensum 30 godzin/rok)		75

Brak zajęć dydaktycznych w latach 2019-2022 z powodu kończenia doktoratu oraz zatrudnienia w projekcie w innej jednostce.

5.4 Opieka naukowa nad doktorantami / doktorantkami

Mgr Beata Borysiuk – Formalny promotor pomocniczy doktorantki pierwszego roku na Politechnice Wrocławskiej; planowany temat badawczy „Badanie mechanizmu molekularnego acetaminofenu”.

Mgr Piotr Hinc – W ramach post-doca realizowanego na Uniwersytecie Wrocławskim dostałem nieformalne zadanie opieki naukowej nad doktorantem Piotrem Hincem. Sam doktorant był bardzo niezależny i opieka przeistoczyła się bardziej we współpracę naukową, która to zaowocowała jedną opublikowaną wspólną publikacją [A3] i jedną na etapie pisania.

Mgr Karolina Cierluk – W ramach tego samego post-doca dostałem również polecenie wdrożenia do stosowanych metod drugą osobę oraz nieformalnej opiekę nad nią. W ramach tej opieki wdrożyłem doktorantkę w techniki mikroskopii, dokładnie mikroskopii konfokalnej i korelacyjnej. Niestety z powodu konfliktu z promotorem doktorantka zrezygnowała, natomiast moja opieka zaowocowała wspólnym wystąpieniem konferencyjnym [K2].

Mgr Mateusz Rzycki – Nieformalna opieka merytoryczna na uczelni macierzystej (równoległe do realizowanego post-doca) na ostatnim roku doktoratu Mateusza Rzyckiego (rok 2022), głównie w zakresie mentoringu w kwestii pisania publikacji i planowania badań. Sama opieka zaowocowała wspólną publikacją [A11], a po jego obronie z wyróżnieniem (11.01.2023) przerodziła się we współpracę naukową, która zaowocowała licznymi publikacjami: [A14, A10, A4, A2]. Formalny opiekun merytoryczny projektu NCN Preludium, którego kierownikiem jest Mateusz Rzycki.

5.5 Opieka naukowa nad studentami studiów

W latach 2020-2023 byłem zatrudniony projekcie naukowym na Uniwersytecie Wrocławskim na stanowisku badawczym. Mimo to zaangażowałem się jako promotor trzech prac licencjackich na studiach I stopnia na kierunku Biotechnologii (w tym dwóch w języku angielskim). Od momentu powrotu na Politechnikę Wrocławską w roku 2023 byłem promotorem jednej obronionej pracy inżynierskiej na kierunku Inżynierii Biomedycznej.

LP	Tytuł pracy oraz data obrony i instytucja	Typ pracy oraz promotorstwa	Dyplomant
1	Microdomains in Bacteria Membranes 2022, <i>Uniwersytet Wrocławski</i>	Praca licencjacka, promotor główny	Devon Kenneth Sterling Fuller
2	Sztuczne komórki – podstawy, stan wiedzy, zastosowanie. 2021, <i>Uniwersytet Wrocławski</i>	Praca licencjacka, promotor główny	Nikola Bińczyk
3	Application of artificial intelligence in drug design. 2023, <i>Uniwersytet Wrocławski</i>	Praca licencjacka, promotor główny	Luka Mamrikishvili
4	Sieć neuronowa do oceny aktywacji kaspas linii komórkowej raka prostaty PC3, 2024, <i>Politechnika Wrocławska</i>	Praca inżynierska, Promotor główny	Olgięrd Jadwisieńczyk
5	Optymalizacja elektroformacji liposomów do pomiarów z użyciem szczypiec laserowych, 2019, <i>Politechnika Wrocławska</i>	Praca inżynierska, promotor pomocniczy	Katarzyna Jurkowska

5.6 Popularyzacja nauki

Wykład popularyzujący naukę dla studentów z Erasmus+ Blended Intensive Programme „Modern Trends in Nanotechnology for Medical Science – Research and Applications - międzynarodowa szkoła organizowana przez University of Aveiro, Portugal; Comenius University in Bratislava, Slovakia; Politecnico University of Coimbra, Portugal; University of Coimbra, Portugal; University of Valladolid, Spain; Marmara University, Turkey; Kent University, Turkey; University College London, United Kingdom; University of Zagreb, Croatia; Hassan II University Ain Chock, Casablanca, Marocco oraz Wrocław University of Science and Technology w okresie od 15.07.2024 do 11.09.2024.

-- przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora --

Popularyzacja nauki – Wasabi II. Wrocławskie Akademiczne Spotkania Ambitnych BioInżynierów, które powstały z inicjatywy pracowników Katedry Inżynierii Biomedycznej Politechniki Wrocławskiej. Konferencja ta ma na celu integrację środowisk studentów I i II stopnia Inżynierii Biomedycznej. Dla studentów II stopnia konferencja ta daje szansę doskonalenia swoich umiejętności prezentacyjnych oraz wymiany pomysłów. Dla studentów I stopnia jest to świetna okazja do zapoznania się z możliwymi kierunkami rozwoju na kolejnym etapie studiów. W ramach spotkania zaprezentowałem 17 kwietnia 2018 we Wrocławskim Parku Technologicznym wykład pt. „Makroskopowe pomiary mechaniczne materii miękkiej na przykładzie błon lipidowych”.

6. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

6.1 Międzynarodowe i krajowe nagrody oraz stypendia za działalność naukową

LP	Nazwa wyróżnienia/stypendium	Jednostka nadająca	Rok przyznania
1	Stypendium ministra dla wybitnego młodego naukowca	Ministerstwo Nauki i Edukacji	2022
2	Otrzymanie dodatku motywacyjnego za osiągnięcia naukowe w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”	Uniwersytet Wrocławski (lokalnie)	2022, 2021
3	Laureat stypendium dla doktorantów miasta Wrocław SPS z kapituły im Jana Mozrzymsa badań interdyscyplinarnych	Wrocławski Studencki Program Stypendialny (SPS)	2019
4	Stypendium z dotacji Młodych Naukowców	Politechnika Wrocławska (lokalnie)	2017
5	Wyróżnienie SPS z kapituły im Jana Mozrzymsa	Wrocławski Studencki Program Stypendialny (SPS)	2017, 2016
6	Nagroda Dziekana Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej	Politechnika Wrocławska (lokalnie)	2016, 2015
7	Stypendium dla najlepszych doktorantów Politechniki Wrocławskiej	Politechnika Wrocławska (lokalnie)	2016, 2015, 2014

6.2 Ukończone szkolenia i zdobyte certyfikaty

LP	Nazwa certyfikatu	Jednostka przyznająca	Data przyznania
1	Korupcja w biznesie	Centralne Biuro Antykorupcyjne	czerwiec 2024
2	Przeciwdziałanie korupcji	Centralne Biuro Antykorupcyjne	czerwiec 2024
3	Korupcja w administracji publicznej	Centralne Biuro Antykorupcyjne	czerwiec 2024
4	Certyfikowany operator autoklawów i pieców parowych (PN-EN ISO 9001:2009)	Stowarzyszenie Inżynierów i Techników Mechaników Polskich (SIMP)	styczeń 2021
5	Introduction to Big Data	Coursera	kwiecień 2020
6	Neural Network and Deep Learning	Coursera	kwiecień 2020
7	Certified Peer Reviewer Course	Elsevier	październik 2019
8	Author Workshop	Elsevier	listopad 2016
9	Certified LabVIEW Associate Developer	National Instruments	styczeń 2014
10	Introduction To Computer Science Building A Search Engine	Udacity	kwiecień 2012
11	Introduction to Artificial Intelligence	Stanford Online	grudzień 2011

Szkolenia 1-3 były obowiązkowymi szkoleniami koniecznymi do przystąpienia do roli eksperta NCBiR. Szkolenie 4 pozwoliło mi na zdobycie kompetencji w zakresie obsługi autoklawów, dzięki czemu mogłem znacząco zwiększyć sterylność wykonywanych przeze mnie eksperymentów. Szkolenia 5-6 oraz 11 były szkoleniami w zakresie wykorzystania sztucznej inteligencji i sieci neuronowych do rozwiązywania problemów naukowych. Wiedzę tam zdobytą wykorzystuję zarówno do dydaktyki jak i w moich pracach badawczych. Szkolenia 7-8 były szkoleniami odpowiednio przygotowującymi mnie do recenzowania oraz pisania artykułów naukowych.

.....
(podpis wnioskodawcy)