

Autoreferat

1. Imiona i nazwisko:

Ewelina Wioletta Lipiec

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

2004-2009, tytuł magistra fizyki, Uniwersytet Jagielloński, Instytut Fizyki im. Mariana Smoluchowskiego, Fizyka, Fizyka Medyczna

Praca magisterska: „Badanie reakcji komórek nowotworowych na naświetlanie mikrowiązką protonów i promieniowania X” obroniona z wyróżnieniem;

Promotorzy: dr hab. Janusz Lekki, prof. dr hab. Roman Pędrys

2007-2011, tytuł inżyniera inżynierii biomedycznej, Akademia Górniczo-Hutnicza, Międzywydziałowa Szkoła Inżynierii Biomedycznej, Inżynieria Biomedyczna,

Praca inżynierska: „Analiza efektu piezoelektrycznego w kościach na poziomie molekularnym”

Promotor dr hab. Marek Iwaniec

2009-2013, tytuł doktora nauk fizycznych, Instytut Fizyki Jądrowej im. Niewodniczańskiego, Polska Akademia Nauk, Międzynarodowe Studia Doktoranckie,

Praca doktorska: „Research into radiation damage in single cells using molecular spectroscopic techniques” obroniona z wyróżnieniem;

Promotorzy: prof. dr hab. Wojciech M. Kwiatek, prof. Bayden Wood (Uniwersytet Monash)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2013-2018, adiunkt Instytut Fizyki Jądrowej im. Niewodniczańskiego, Polska Akademia Nauk

2014, staż podoktorski Institute of Physics, Laboratory of Physics of Living Matter, École polytechnique fédérale de Lausanne

2015, staż podoktorski the Centre for Biospectroscopy and School of Chemistry, Monash University

2015-2017, staż podoktorski the Department of Chemistry and Applied Biosciences, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich

2018-obecnie, adiunkt, Zakład Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii, Instytut Fizyki, Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1789) zawierającego serię siedmiu monotematycznych publikacji w międzynarodowych czasopismach.

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

„Nano-spektroskopia w badaniach struktury chemicznej cząsteczek życia: białek, kwasów nukleinowych i lipidów”.

4.2 Wykaz prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

- H 1. **E. Lipiec**, D. Perez-Guaita, J. Kaderli, B. R. Wood, R. Zenobi, Direct Nano-Spectroscopic Verification of the Amyloid Aggregation Pathway, *Angewandte Chemie International Edition*, 57, (2018) 8519–8524, impact factor 12.1, liczba cytowań 5, mój udział procentowy szacuję na 70%.
- H 2. F. S. Ruggeri, G. Longo, S. Faggiano, **E. Lipiec**, A. Pastore, G. Dietler, Infrared nanospectroscopy characterization of oligomeric and fibrillar aggregates during amyloid formation, *Nature Communications*, 8 (2015), impact factor 12.35, liczba cytowań 69, mój udział procentowy szacuję na 20%.
- H 3. S. Kradolfer*, **E. Lipiec***, C. Baldacchini*, A. R. Bizzarri, S. Cannistraro, R. Zenobi, Vibrational Changes Induced by Electron Transfer in Surface Bound Azurin Metalloprotein Studied by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy and Scanning Tunneling Microscopy, *ACS Nano*, 11, (2017) 12824–12831, impact factor 13.71, liczba cytowań 7, mój udział procentowy szacuję na 25%
- H 4. **E. Lipiec**, A. Japaridze, J. Szczerbiński, G. Dietler, R. Zenobi, Preparation of Well Defined DNA Samples for Reproducible Nanospectroscopic Measurements, *Small*, 12 (2016) 4821–4829, impact factor 9.6, liczba cytowań 7, mój udział procentowy szacuję na 75%.
- H 5. A. Japaridze, D. Vobornik, **E. Lipiec**, A. Cerreta, J. Szczerbinski, R. Zenobi, G. Dietler Toward an effective control of DNA's submolecular conformation on a surface, *Macromolecules*, 49 (2016) 643–652, impact factor 5.92, liczba cytowań 19, mój udział procentowy szacuję na 20%.
- H 6. **E. Lipiec**, B. R. Wood, A. Kulik, W. M. Kwiatek, G. Dietler, Nanoscale investigation into the cellular response of glioblastoma cells exposed to protons, *Analytical Chemistry*, 90 (2018) 7644–7650, impact factor 6.32, liczba cytowań 2, mój udział procentowy szacuję na 80%.
- H 7. **E. Lipiec***, A. Wnętrzak*, A. Chachaj-Brekiesz*, W. Kwiatek, P. Dynarowicz-Łątka, High-Resolution Label-Free Studies of Molecular Distribution and Orientation in Ultrathin, Multicomponent Model Membranes with Infrared Nano-Spectroscopy AFM-IR, *Journal of Colloid and Interface Science* 542 (2019) 347–354 impact factor 5,09, liczba cytowań 0, mój udział procentowy szacuję na 30%.

Rozdziały w książkach, prace przeglądowe:

H#8 E. W. Lipiec, B. R. Wood, Tip-Enhanced Raman Scattering: Principles, Instrumentation, and the Application to Biological Systems Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd (2006-2017) 1-26

**jednakowy udział*

4.3. omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

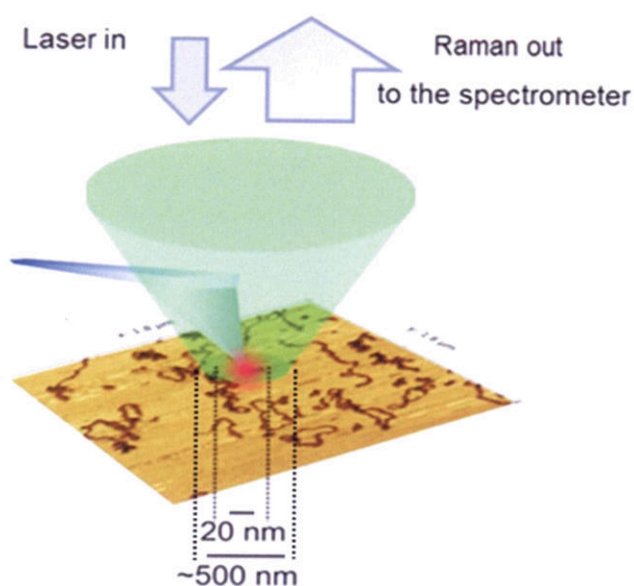
Wprowadzenie

Życie rozpoczęło się od cząsteczek. Podstawę życia stanowią cząsteczki kwasów nukleinowych, białek oraz lipidów. Każdą z tych cząsteczek cechuje niejednorodność w skali nanometrycznej, która determinuje ich funkcjonalność oraz wpływa na zdolność reagowania z innymi cząsteczkami. W związku z tą heterogenicznością struktura biocząsteczek powinna być badana w skali nanometrycznej. Prezentowane badania koncentrują się na zastosowaniu metod nano-spektroskopowych, wykorzystujących plazmonikę w badaniach struktury chemicznej cząsteczek życia. Te badania pozwoliły na monitorowanie istotnych procesów biologicznych, takich jak: agregacja neurodegeneracyjnych białek [H1, H2], przepływ elektronów poprzez metaloproteiny [H3], zmiana konformacji DNA [H4, H5], tworzenie domen w błonach lipidowych pod wpływem leków immunosupresyjnych [H6], synteza lipidów w komórkach glejaka w wyniku ekspozycji na promieniowanie jonizujące [H7]. Wyniki badań przedstawionych jako osiągnięcie naukowe w niniejszym autoreferacie są bardzo ważne dla rozwoju wielu dziedzin nauki, takich jak: biologia molekularna, nano-spektroskopia, biochemia i biofizyka. Rezultaty przedstawione tutaj zostały opublikowane w czasopismach interdyscyplinarnych, fizycznych, biofizycznych, chemicznych i biochemicznych. Prace przedstawione jako moje osiągnięcie naukowe zostały częściowo podsumowane w rozdziale encyklopedii chemii analitycznej [H#8] poświęconym zastosowaniu nano-spektroskopii Ramana w badaniach próbek biologicznych.

Metodologia

Połączenie mikroskopii sił atomowych (ang. Atomic Force Microscopy AFM) i spektroskopii cząsteczkowej łączy nanometryczną przestrzenną zdolność rozdzielczą mikroskopii skaningowej oraz selektywność chemiczną spektroskopii Ramana lub spektroskopii w zakresie podczerwieni, dostarczając informacji o strukturze chemicznej badanych próbek w nanoskali. Nano-spektroskopia molekularna obejmuje trzy niezależne techniki: spektroskopię Ramana wzmocnioną na ostrzu sondy skanującej (ang. tip-enhanced Raman spectroscopy TERS), zintegrowaną mikroskopię sił atomowych ze spektroskopią w zakresie podczerwieni (AFM-IR), nano-spektroskopię w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. nano-Fourier Transform Infrared nano-FTIR). Wszystkie trzy metody są nieinwazyjne i nie wymagają wybarwiania badanych próbek. Poniżej opisano nowe zastosowania TERS i AFM-IR w badaniach próbek biologicznych. Uzyskane dane analizowano za pomocą wielowymiarowej analizy statystycznej, która nie jest jeszcze powszechnie stosowana do danych nano-spektroskopowych, co stanowi o kolejnym innowacyjnym aspekcie przedstawionego osiągnięcia naukowego.

TERS



Rysunek 1. Schemat TERS (konfiguracja prosta): zielone światło lasera skupione na ostrzu próbnika AFM, pokrytego metalem, powoduje kolektywny ruch elektronów – rezonans plazmonów, który indukuje dodatkowe pole elektromagnetyczne w bardzo małym obszarze, zwiększając przekrój czynny na rozpraszanie Ramana i poprawiając zdolność rozdzielczą.

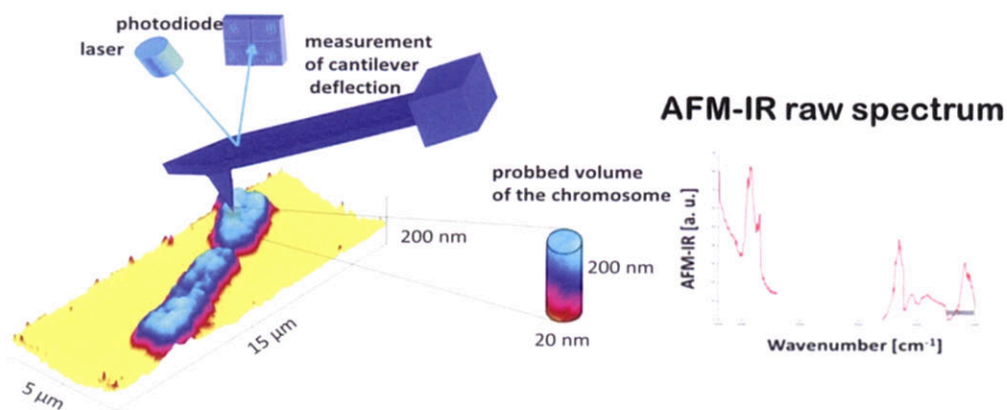
[Fig. 1, 1, H1, H3-H5]. Innymi słowy, próbnik TERS działa jak nano-antena, zamieniając pole elektryczne padającego światła lasera na zlokalizowaną energię [2] (poprawiając rozdzielczość przestrzenną do kilku nanometrów w próżni i niskiej temperaturze [3, 4]) i przekształcając bliskie pole od próbki do pola dalekiego, które z kolei może być ogniskowane za pomocą klasycznego obiektywu mikroskopowego (zwiększając czułość metody i umożliwiając rejestrację promieniowania rozproszonego przez pojedyncze cząsteczki [4]). W ciągu ostatnich kilkunastu lat TERS stosowano głównie do badań próbek o wysokim naturalnym przekroju czynnym na rozpraszania Ramana, takich jak nanorurki węglowe [3, 5] i barwniki chemiczne [4]. Głównym ograniczeniem metody TERS jest związany z ekstremalnie wysoką czułością metody, wyjątkowo duży przekrój czynny na rozpraszania Ramana w zanieczyszczeniach węglowych [6]. Nawet śladowe ilości węgla są obserwowane jako gwałtownie zmieniające się wąskie piki, które uśredniają się do dwóch szerokich pasm nazywanych D (1360 cm^{-1}) oraz G (1580 cm^{-1}), charakterystycznych dla substancji zawierających węgiel amorficzny [6]. Silne pole elektromagnetyczne w pobliżu ostrza SPM może okazać się destrukcyjne dla delikatnych próbek i prowadzić do ich fotochemicznego / termicznego rozkładu, a w konsekwencji pojawienia się pasm od zanieczyszczeń węglowych w widmach TER. Ponadto, przekrój czynny na rozpraszanie Ramana / TER dla próbek biologicznych jest stosunkowo niewielki, a zatem sygnał od tych próbek może być łatwo zakłócony przez rozpraszanie w zanieczyszczeniach węglowych. Rozkład termiczny i modyfikacje struktury chemicznej próbek pod wpływem

TERS zaimplementowano poprzez połączenie nanometrycznej zdolności rozdzielczej AFM lub skaningowej mikroskopii tunelowej (ang. Scanning Tunneling Microscopy STM) i selektywności chemicznej spektroskopii Ramana [1]. W badaniach wykorzystuje się metaliczne nano-struktury osadzone na ostrzu próbnika AFM (AFM-TERS) lub metaliczne ostrza próbników STM (STM-TERS), na których kolektywne ruchy elektronów modyfikują pole elektromagnetyczne padającego światła laserowego, wzmacniając przekrój czynny na rozproszenie Ramana. TERS wykorzystuje wzmocnienie bliskiego pola poprzez indukcję plazmonów powierzchniowych generowanych podczas naświetlania laserem metalizowanego lub metalicznego ostrza sondy mikroskopii skanującej (ang. Scannig Probe Microscopy SPM)

silnego pola elektromagnetycznego są łatwo rozpoznawalne jako zmiana kształtu widma TER. Dlatego, w oparciu o sygnał spektralny TER można odpowiednio dobrać moc lasera, tak aby nie uszkodzić badanej próbki. Z powodu wyżej wymienionych ograniczeń metody TERS dotychczasowe pomiary próbek biologicznych, w tym lipidów [7], kwasów nukleinowych [H4, H5, 8] i białek [H1, H3, 9-21] są nieliczne. Znaczący wkład do tych badań wnoszą prace, których jestem głównym autorem lub współautorem. Wyniki otrzymane za pomocą metody TERS opisano w artykułach: H1, H3-H5.

Nano-spektroskopia w zakresie podczerwieni

Detekcja absorpcji światła podczerwonego w skali nanometrycznej może zostać osiągnięta poprzez zastosowanie dwóch różnych technik wykorzystujących odpowiednio: i) rozproszenie światła na ostrzu sondy skanującej [22-24] (nano-spektroskopia w zakresie podczerwieni z transformatą Fouriera, nano-FTIR) lub ii) czułość dźwigni próbnika AFM na rozszerzalność cieplną próbki spowodowaną absorpcją światła podczerwonego [H2, H6-H7, 25-28] (metoda AFM-IR). W pierwszym podejściu sonda AFM jest zwykle metalizowana podobnie jak próbki używane w technice TERS. Próbki nano-FTIR również działają jak nano-anteny, przekształcając swobodnie propagujące pole elektromagnetyczne lasera w energię zlokalizowaną w pobliżu ostrza próbnika i odwrotnie, aby miejscowo próbować drgania cząsteczek [H2 H6-H7, 25-28]. W badaniach prezentowanych tutaj jako osiągnięcie naukowe stosowano drugie podejście, które polegało na detekcji rozszerzalności cieplnej indukowanej w próbkach pod wpływem absorpcji światła podczerwonego. Zasada metody jest schematycznie przedstawiona na rysunku 2. Każdy przyrząd AFM-IR jest wyposażony w przestrajalny laser promieniowania podczerwonego, który dostarcza impulsy światła o określonej energii (długości fali). Zaabsorbowane światło podczerwone o określonej długości fali powoduje szybką ekspansję termiczną próbki, pod wpływem którego dźwignia próbnika AFM wygina się. Ugięcie jest rejestrowane przez fotodiodę jako odchylenie wiązki lasera AFM odbijającego się od górnej powierzchni dźwigni (rysunek 2). Amplituda częstotliwości rezonansowych dźwigni próbnika AFM, będącego w kontakcie z próbką, jest skorelowana z absorpcją światła podczerwonego. Przekształcenie Fouriera pozwala na wyznaczenie intensywności zaabsorbowanego światła. Widma AFM-IR generowane są jako intensywność amplitudy oscylacji dźwigni próbnika AFM w funkcji długości fali po normalizacji uwzględniającej zmiany mocy lasera.



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie techniki AFM-IR.

Zdolność rozdzielcza AFM-IR jest ściśle związana z termomechanicznymi właściwościami badanej próbki oraz powierzchnią obszaru kontaktu pomiędzy ostrzem AFM i próbką. Dodatkowo, zdolność rozdzielcza map AFM-IR jest związana z szybkością skanowania i gęstością próbkowania [H2, H6-H7, 25-28]. Rozdzielczość w kierunku prostopadłym do powierzchni, na której naniesiona jest próbka zależy od głębokości penetracji badanej próbki przez promieniowanie podczerwone. Dla próbek biologicznych ta głębokość jest rzędu długości fali i wynosi 3-10 μm dla zakresu spektralnego średniej podczerwieni [H2, H6-H7, 25-28]. W przypadku cieńszych obiektów promieniowanie przenika przez całkowitą grubość próbki, co schematycznie przedstawione jest na rysunku 2. AFM-IR zastosowano jako główną technikę eksperymentalną w pracach: H2, H6-H7.

Wielowymiarowa analiza statystyczna

Uzyskane widma i mapy były opracowywane za pomocą wielowymiarowej analizy statystycznej, obejmującej głównie nienadzorowaną hierarchiczną analizę skupień (ang. Unsupervised Hierarchical Cluster Analysis UHCA) i analizę składowych głównych (ang. Principal Component Analysis PCA). PCA i UHCA stosowano w celu zredukowania ilości zmiennych, ekstrakcji nano-spektroskopowych pasm charakterystycznych dla badanych próbek i określenia zakresów spektralnych, w których zmienność widm jest największa.

PCA opiera się na liniowej transformacji danych do nowej przestrzeni opisanej przez nowe ortogonalne zmienne, tak zwane składowe główne (ang. Principal Components PCs). Najważniejsze wyniki PCA to wykresy rozrzutu, które reprezentują dane w wielowymiarowej przestrzeni składowych głównych oraz wykresy wartości czynnikowych, które przedstawiają pasma odpowiadające za separację widm na wykresach rozrzutu.

UHCA to nienadzorowany algorytm klastrowania, który ma na celu klasyfikację widm na podstawie zmienności spektralnej. UHCA zastosowana do map zabranych za pomocą technik nano-spektroskopowych pozwala na analizę i obrazowanie zmienności składu chemicznego w skali nanometrycznej. [29].

Nano-spektroskopia w badaniach struktury chemicznej peptydów i białek

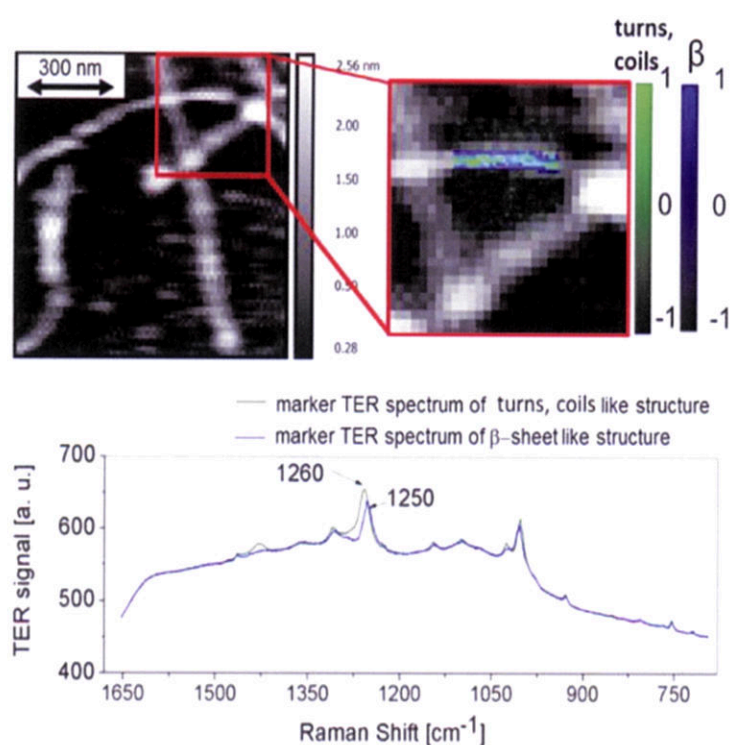
Nano-spektroskopia cząsteczkowa dostarcza informacji o topografii i strukturze chemicznej badanych próbek w skali nanometrycznej, dlatego jest bardzo skutecznym narzędziem w analizie struktury drugorzędowej pojedynczych cząsteczek białek i peptydów.

Nano-spektroskopowa weryfikacja szlaków agregacji neurotoksycznych białek

Obecnie średnia długość życia wydłuża się, co wiąże się ze wzrostem liczby zachorowań na wyniszczające i śmiertelne choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Parkinsona, Huntingtona i Alzheimerera [30-35]. Pomimo intensywnych badań wciąż są to choroby nieuleczalne. Procesy neurodegeneracyjne, które leżą u podstaw tych chorób są wywołane przez cytotoksyczne białka zwane amyloidami [30-33]. Szlaki agregacji amyloidów nie są dobrze poznane, co stanowi barierę dla opracowania skutecznych metod leczenia chorób neurodegeneracyjnych, polegających na zatrzymaniu patologicznej agregacji [36, 37]. Dokładna znajomość mechanizmów transformacji białek ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia, w jaki sposób natywne, rozpuszczalne w wodzie peptydy są zdolne do tworzenia

bardzo stabilnych, cytotoksycznych włókienek amyloidowych (fibryli), które mogą tworzyć płytki amyloidowe w mózgach osób cierpiących na choroby neurodegeneracyjne [36, 37].

Podczas patologicznej agregacji peptydów dochodzi do transformacji w strukturze drugorzędowej. Struktura drugorzędowa monomerów to głównie α -helisa, β -zakręt oraz fragmenty nieustrukturyzowane. Podczas agregacji te struktury porządkują się i przyjmują postać β -harmonijki. Agregacja jest procesem długotrwałym, który nie zachodzi jednocześnie we wszystkich cząsteczkach. W związku z tym próbki agregujących białek są bardzo niejednorodne i zawierają różne formy białkowe na wielu etapach agregacji: kuliste oligomery, protofibryle, gładkie dojrzałe fibryle, a także małe agregaty, takie jak dimery, tetramery itp.. Konwencjonalne techniki analityczne wymagają znacznych ilości próbek aby uzyskać zadowalający stosunek sygnału do szumu, dlatego zawsze dostarczają informacji o uśrednionej strukturze agregatów. Zastosowanie konwencjonalnych technik analitycznych nie pozwala na analizę struktury drugorzędowej na każdym etapie agregacji i korelowanie przemian strukturalnych ze szlakiem agregacji białka.



Rysunek 3. Mapowanie AFM-TERS A β (1-42) utrwalonego na złocie po 36 h. agregacji: topografia AFM z nałożoną mapą TER, demonstrującą rozkład β -kartki (niebieski) oraz zakrętu/struktury nieuporządkowanej (zielony) z odpowiadającymi im uśrednionymi widmami TERS z obu obszarów [H1].

powiększonego obszaru widoczna jest mapa TERS naniesiona na topografię AFM. W obszarze fibryli zarejestrowano dwa rodzaje widm, które są przedstawione poniżej. Dystrybucję obu rodzajów widm na mierzonym fragmencie próbki zaznaczono odpowiednio niebieskim i zielonym kolorem. Widma te zostały wyekstrahowane za pomocą UHCA i PCA jako

Jednym z moich najważniejszych osiągnięć naukowych było zaprojektowanie pierwszych na świecie eksperymentów, które umożliwiły bezpośrednią obserwację szlaku agregacji amyloidu- β , neurodegeneracyjnego peptydu związanego z chorobą Alzheimera, bez konieczności frakcjonowania próbek. W tych badaniach znaleziono związek pomiędzy rozkładem przestrzennym drugorzędowej struktury β -kartki w pojedynczych agregatach amyloidu- β (takich jak oligomery, protofibryle, fibryle) a schematem agregacji. Na rys. 3 przedstawiona jest topografia AFM przykładowej próbki amyloidu β naniesionego na powierzchnię złota po 36 h agregacji. W centralnej części

markerowe widma charakterystyczne dla amyloidu- β o określonej strukturze drugorzędowej: β -harmonijki (kolor niebieski) i β -zakrętu/struktury nieuporządkowanej (kolor zielony). Główna różnica pomiędzy dwoma typami widm zebranymi w obszarze fibryli jest związana z położeniem spektralnym pasma pochodzącego od amidu III, które jest przesunięte od 1260 cm^{-1} (zielone widmo) do 1250 cm^{-1} (niebieskie widmo) [H1, 13, 38, 39]. Dodatkowo, w niebieskim spektrum zarejestrowano nieco większe natężenie pasma pochodzącego od zginania $\text{C}\alpha\text{-H} / \text{N-H}$ przy 1364 cm^{-1} , typowe dla struktury β -kartki [38, 39]. Chemiczne mapowanie w nanoskali pojedynczych form amyloidu- β na różnych etapach agregacji pozwoliło na bezpośrednią weryfikację wcześniej proponowanego schematu tworzenia się fibryli. Nasze badania potwierdziły, że agregacja amyloidu- β rozpoczyna się od agregacji monomerów do metastabilnych oligomerów, które następnie porządkują strukturę drugorzędową, przyjmując postać β -kartki już na etapie oligomerów lub protofibryli [H1]. Ze względu na duże znaczenie otrzymanych rezultatów dla badań poświęconych chorobie Alzheimera, a także dla rozwoju nano-spektroskopii molekularnej, przygotowany artykuł został zaakceptowany do publikacji w *Angewandte Chemie* [H1] a następnie wyróżniony i opisany jako "Swiss Science Concentrates" w *Chimia*.

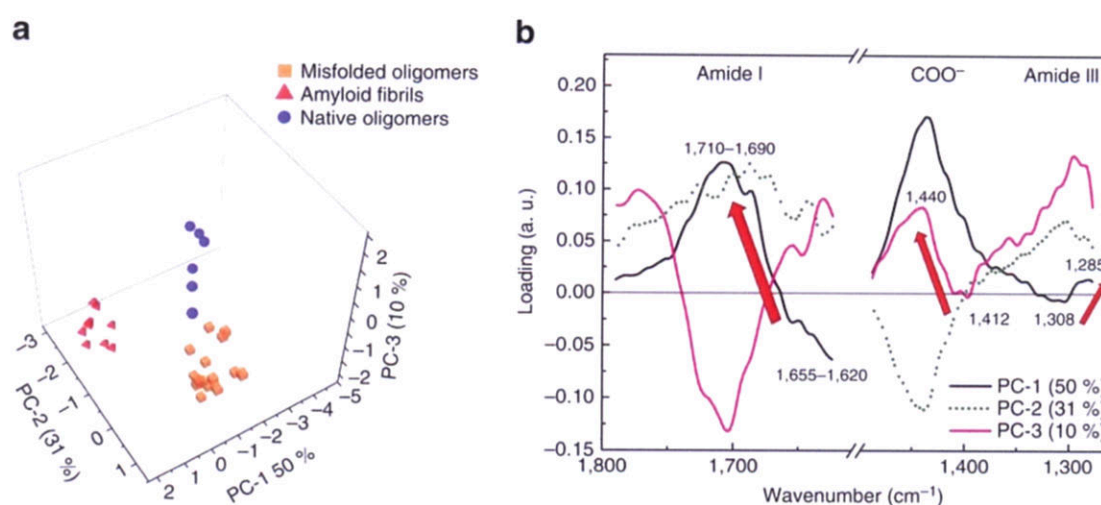
Nano-spektroskopia w zakresie podczerwieni jest również bardzo skutecznym narzędziem w badaniach agregacji neurotoksycznych białek. Wykorzystując tę technikę przeprowadzono charakterystykę oligomerów oraz fibryli powstałych na drodze agregacji domeny białkowej „Josephin” - fragmentu ataksyny 3. Uzyskane widma analizowano za pomocą wielowymiarowej analizy danych - PCA. Wyniki spektroskopowe skorelowano z wynikami niezależnych pomiarów sztywności pojedynczych agregatów peptydowych.

Badania te stanowią pierwszą analizę struktury chemicznej domeny białkowej „Josephin” w nanoskali. Zastosowanie nano-spektroskopii pozwoliło na monitorowanie konformacji natywnych, sferoidalnych oligomerów, tzw. nieprawidłowo zwiniętych oligomerów (których struktura drugorzędowa uległa zmianie podczas agregacji) oraz fibryli. Przeprowadzono wnikliwą analizę struktury drugorzędowej kilku rodzajów agregatów domeny „Josephin”.

Monitorowano transformację struktury α -helisy do β -harmonijki w pojedynczych agregatach peptydowych. Otrzymane wyniki potwierdziły, że przed inkubacją struktura drugorzędowa domeny „Josephin” jest natywna. Analiza statystyczna pozwoliła na rozróżnienie trzech odrębnych grup widm AFM-IR, odpowiadających trzem grupom agregatów: natywne oligomery, niewłaściwie zwinięte oligomery oraz fibryle (rysunek 4a). Różnice spektralne odpowiedzialne za grupowanie widoczne na wykresie rozrzutu (rysunek 4b) obejmują: i) pasmo amidu I w zakresie spektralnym od 1710 do 1680 cm^{-1} , ii) drgania grupy funkcyjnej COO przy 1430 cm^{-1} oraz iii) pasmo amidu III przy 1285 cm^{-1} . Zastosowanie PCA potwierdziło, iż w procesie fibrylacji zmniejsza się ilość struktury α -helikalnej (1665 cm^{-1}), zwiększa się ilość antyrównolegle ułożonych arkuszy β (1695 cm^{-1}) (rysunek 4b). Analiza AFM pozwoliła na dokładny opis morfologii agregatów białkowych. Pomiary modułu Younga wykazały, że sztywność peptydu wzrasta w procesie fibrylacji. Na podstawie zebranych widm AFM-IR i pomiarów sztywności stwierdzono, iż niektóre oligomery mają właściwości strukturalne podobne do natywnych monomerów, a pozostałe są bardziej podobne do fibryli.

Fibryle cechuje zwiększona sztywność i relatywnie duża, w porównaniu do oligomerów, zawartość antyrównoległe ułożonych arkuszy β w strukturze drugorzędowej. Według dotychczasowych doniesień naukowych agregacja domeny „Josephin” rozpoczyna się od nieprawidłowego zwijania monomerów (zmiany struktury cząsteczek), które łączą się ze sobą na kolejnym etapie agregacji [40]. Nasze badania struktury drugorzędowej i sztywności pojedynczych agregatów zasugerowały, że nieprawidłowe zwijanie białka może następować dopiero po utworzeniu oligomerów.

Podsumowując, na podstawie pierwszych nano-spektroskopowych badań domeny białkowej „Josephin” - fragmentu ataksyny 3 zasugerowano alternatywny mechanizm agregacji, który rozpoczyna się od łączenia się monomerów w oligomery o natywnej strukturze, które następnie przekształcają się w nieprawidłowo sfalutowane oligomery, a te z kolei tworzą fibryle. Wyniki przedstawione powyżej zostały opublikowane w *Nature Communications* [H2].



Rysunek 4. Wyniki analizy PCA w zakresie spektralnym $1800-1270\text{ cm}^{-1}$ (z wyłączeniem $1620-1480\text{ cm}^{-1}$) (a) wykres składowych głównych (b) wykres wartości czynnikowych; Strzałkami zaznaczono zmiany spektralne wskazujące na różnice w strukturze drugorzędowej peptydów, z których zebrane były widma AFM-IR; [H2].

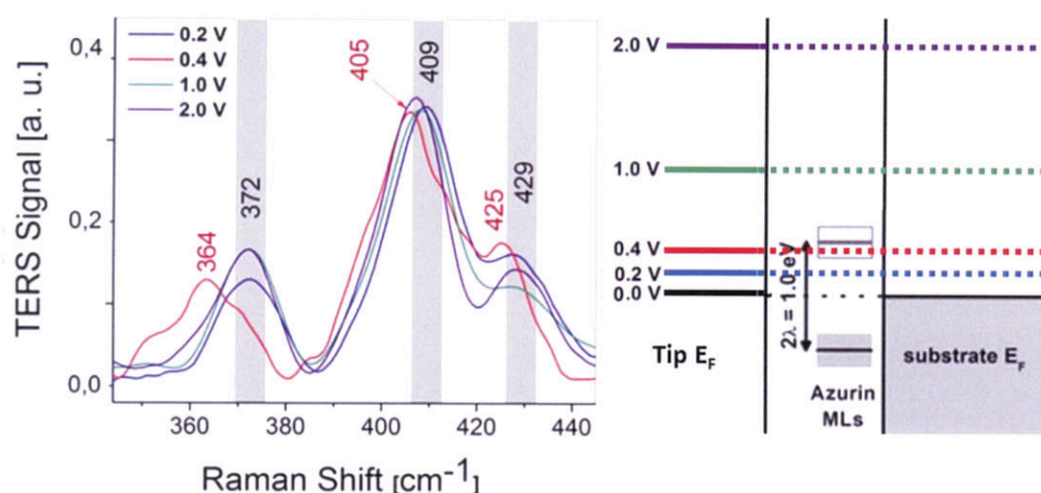
Przepływ elektronów przez metaloproteiny

Metaloproteiny, których przykładem jest azuryna mają szczególne własności optyczne i wibroniczne związane z przepływem elektronów (ET ang. Electron Transfer) przez centralną część cząsteczki, w której znajduje się atom miedzi poddawany utlenianiu i redukcji podczas transportu elektronów. Metaloproteiny są bio-kompatybilne i mogą być stosowane w urządzeniach bioelektronicznych i bio-optoelektronicznych.

Aby zrozumieć w jaki sposób przepływ elektronów lokalnie wpływa na strukturę chemiczną oraz determinuje własności optyczne i wibroniczne monowarstw azuryny znajdującej się na powierzchni przewodzącej, zastosowaliśmy STM-TERS. Otrzymane widma TER, charakteryzują się trzema głównymi pasmami pochodzącymi od rozciągania wiązania pomiędzy atomem miedzi a siarką w cysteinie, a także od drgań wibracyjnych łańcucha cysteiny ($\sim 369\text{ cm}^{-1}$, $\sim 408\text{ cm}^{-1}$, $\sim 424\text{ cm}^{-1}$). Stwierdzono, że na odpowiedź wibracyjną białka

wpływa napięcie przyłożone do przewodzącej podkładki. Widma zebrane przy różnych wartościach napięcia przyłożonego do podkładki (V_{bias}) przedstawione są na rysunku 5. Zaobserwowano, że wyżej wymienione pasma w widmach STM-TERS zebranych dla $V_{\text{bias}} = 0,2 \text{ V}$, $1,0 \text{ V}$ i $2,0 \text{ V}$ znajdują się na bardzo podobnych pozycjach spektralnych, co świadczy o takiej samej naturze przepływu elektronów wywołanym przyłożeniem tych napięć. Nieznaczne przesunięcia pasm świadczą o akumulacji ładunku na powierzchni cząsteczek azuryny. Znaczne przesunięcia pasm związanych z centrum aktywnym zaobserwowano w widmach zebranych przy napięciu $0,4 \text{ V}$. Ta różnica potencjałów nadaje elektronom płynącym z podłoża do ostrza energię odpowiadającą jednemu z poziomów wzbudzonych cząsteczki azuryny potwierdzając bezpośredni udział centrum aktywnego w przepływie elektronów oraz aktywację nowych szlaków przepływu elektronów.

W oparciu o widma STM-TERS wykazano bezpośredni udział centrum aktywnego zawierającego atom Cu w procesie transportu elektronów.



Rysunek 5. Uśrednione i znormalizowane widma TER zebrane z monowarstwy azuryny naniesionej na złotą powierzchnię, prąd tunelowy $I = 0,1 \text{ nA}$, napięcie przyłożone do podkładki: $0,2 \text{ V}$ (niebieski), $0,4 \text{ V}$ (czerwony), $1,0 \text{ V}$ (zielony) i $2,0 \text{ V}$ (fioletowy) wraz ze schematem poziomów energii układu próbnik azuryna-podkładka z przyłożonym napięciem ($V_{\text{bias}} = 0,2 \text{ V}$, $0,4 \text{ V}$, $1,0 \text{ V}$ i $2,0 \text{ V}$). E_F - energia Fermiego, niezajęte i zajęte poziomy energetyczne (ML, LUMO i HOMO) oznaczono odpowiednio białym i szarym kolorem; [H3].

Nano-spektroskopia w badaniach struktury chemicznej kwasów nukleinowych

Kwas deoksyrybonukleinowy DNA jest intensywnie badany przez wiele grup naukowych. W dotychczasowych badaniach użyto różnych technik eksperymentalnych i podejść teoretycznych. Ze względu na precyzyjnie określone rozmiary, kształt i strukturę chemiczną DNA może być używany jako standardowa próbka biologiczna w nano-spektroskopii. Wcześniej jednak należy dokładnie zbadać wpływ utrwalania na strukturę chemiczną i konformację DNA w nanoskali.

DNA jako standardowa próbka dla nano-spektroskopii

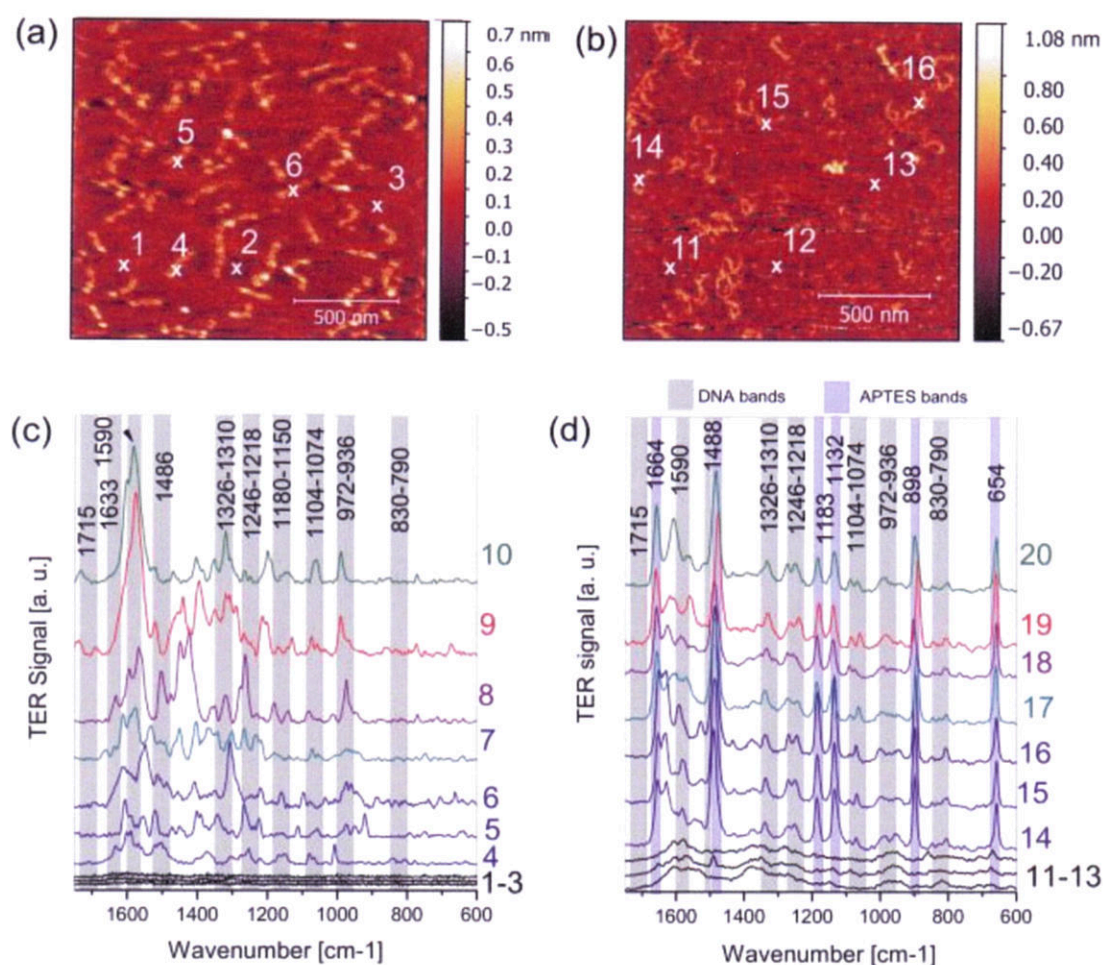
Do tej pory nanorurki węglowe były stosowane jako standardowa próbka w technikach nano-spektroskopowych [5, 41], jednak struktura chemiczna nanorurek węglowych i ich widma Ramana są relatywnie nieskomplikowane i dalekie od rzeczywistych analitów, a szczególnie próbek biologicznych. W prezentowanych badaniach poszukiwano standardu podobnego do nanorurek węglowych, ale chemicznie bogatszego. Jednowymiarowe cząsteczki DNA o precyzyjnie zdefiniowanych rozmiarach, kształcie i składzie chemicznym wydawały się spełniać wszystkie kryteria jakie powinna posiadać substancja używana jako standardowa próbka do pomiarów nano-spektroskopowych. Dotychczasowe zastosowania TERS w badaniach DNA pozwoliły na zmierzenie przestrzennej rozdzielczości TERS, zdefiniowanie pasm markerowych charakterystycznych dla DNA oraz innych ważnych aspektów, takich jak reguły wyboru we wzmocnionym polu elektromagnetycznym pomiędzy próbnikiem, a próbką/podkładką. Nasze badania obejmujące zastosowanie metody TERS do lokalnej analizy DNA dostarczyły nowych informacji o zmianach struktury chemicznej i zmianach konformacji w obrębie pojedynczych cząsteczek DNA (krótkich fragmentów) po utrwaleniu na podłożu i wysuszeniu.

Wysoka czułość metody TERS została wykorzystana do wykrycia lokalnych zmian struktury chemicznej cząsteczek DNA zawierających 500 par zasad (500 bp ang. base pairs) utrwalanych na kryształach miki poprzez zastosowanie: i) jonów magnezu jako dodatnio naładowanych łączników pomiędzy ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi szkieletu DNA, a ujemnie naładowaną świeżo rozłupywaną powierzchnią miki oraz ii) silanizowanie powierzchni miki APTES-em ((3-aminopropyl)-trioksy-silanem). Te dwie metody utrwalania DNA na micy są powszechnie stosowane nie tylko w nano-spektroskopii ale głównie w mikroskopii sił atomowych, dlatego wpływ tych metod utrwalania na cząsteczki DNA powinien być dobrze poznany.

Na rysunku 6 przedstawione jest bezpośrednie porównanie widm TER zebranych z DNA utrwalonego na micy za pomocą jonów Mg^{2+} i APTES-u. Analiza składowych głównych pozwoliła na wyodrębnienie subtelnych różnic w widmach TER i rozdzielenie zabranych widm na 2 grupy w zależności od sposobu utrwalania oraz wyznaczenie pasm, które determinowały podział widm.

W widmach DNA utrwalonego za pomocą jonów Mg^{2+} obserwowano pasma ramanowskie charakterystyczne tylko dla kwasów nukleinowych: (i) drgania deoksyrybozy i rozciąganie grupy -O-P-O- w zakresie spektralnym $830-790\text{ cm}^{-1}$ [8, 42, 43], (ii) wrażliwe na zmiany konformacji DNA symetryczne i asymetryczne drgania rozciągające grup fosforanowych w zakresach spektralnych odpowiednio $1104-1074\text{ cm}^{-1}$ i $1256-1218\text{ cm}^{-1}$ [8, 42, 43], (iii) rozciąganie wiązań (C-N) w pierścieniach pirymidynowych ($\sim 1590\text{ cm}^{-1}$), (iv) drgania deformacyjne grup (CH_2) ($\sim 1486\text{ cm}^{-1}$) [42], (v) rozciąganie (C - N) obserwowane w zakresie spektralnym $1326-1310\text{ cm}^{-1}$ [42, 43] i (vi) drgania par zasad w stosie (1715 cm^{-1}) [42, 43]. Pasma związane z APTES-em, takie jak rozciąganie (-Si-CH₂-) występujące na pozycji spektralnej 1430 cm^{-1} [44, 45] oraz zginanie wiązania (C-OH) przy 1330 cm^{-1} [44]

zaobserwowano w widmach DNA utrwalonego na powierzchni silanizowanej miki. Pasma przypisano w oparciu o pozycje spektralne pasm występujących w konfokalnych widmach ramanowskich zebranych z: (i) plazmidu DNA puC-18, (ii) APTES-u, (iii) mieszanin DNA z kilkoma różnymi stężeniami APTES-u rozpuszczonego w wodzie. W widmach TER zebranych z DNA utrwalonego na powierzchni za pomocą APTES-u pasma pochodzące od symetrycznego i asymetrycznego rozciągania pomiędzy tlenami, a fosforem w grupach fosforanowych mają większą szerokość połówkową lub są podwójne. Ta obserwacja sugeruje, że różne grupy fosforanowe ze szkieletu DNA znajdują się w nieco innych środowiskach chemicznych, co potwierdza że APTES lokalnie wpływa na uporządkowaną strukturę DNA, a dokładnie jego konformację.



Rysunek 6. Bezpośrednie porównanie widm TER zebranych z DNA utrwalonego na powierzchni miki za pomocą jonów Mg^{2+} i APTES-u. Topografie AFM próbek DNA utrwalonych za pomocą a) jonów Mg^{2+} i b) APTES-u z zaznaczonymi miejscami, w których zebrano widma. c) 1-3 widma zebrane z podkładki, 4-6 widma zebrane z DNA utrwalonego za pomocą Mg^{2+} , d) 11-13 widma zebrane z podkładki traktowanej APTES-em, 14-16 widma zebrane z DNA utrwalonego za pomocą APTES-u, dodatkowe widma DNA uzyskane z różnych próbek za pomocą różnych próbników w celu zilustrowania zmienności widm (7-10 Mg^{2+} i 17-20 APTES); [H4].

Podwójna helisa DNA, stabilizowana przez wiązania wodorowe pomiędzy parami zasad, może występować w różnych konformacjach. Dwie główne, biologicznie aktywne konformacje cząsteczki DNA nazwano B-DNA i A-DNA [46]. DNA w obu tych konformacjach jest podwójną helisą prawoskrętną, charakteryzującą się określonym rozmiarem dużych i małych rowków (głębokich i płytkich bruzd). Forma A-DNA charakteryzuje się mniejszą ilością par zasad przypadających na jeden obrót helisy (mniejszy kąt skrętu) w porównaniu z B-DNA. Mniejsza odległość pomiędzy zasadami powoduje, że forma A-DNA jest o 20-25% krótsza niż B-DNA. Cząsteczka DNA w konformacji A jest szersza i bardziej skompresowana wzdłuż osi niż w konformacji B, rozmiary mniejszych i większych rowków są różne w tych dwóch formach DNA [46]. Różnice w rozmiarach rowków (bruzd) mają kluczowe znaczenie, ponieważ determinują zdolność DNA, będącego w określonej konformacji, do reagowania z innymi makrocząsteczkami.

Nasze badania udowodniły, iż w wyniku oddziaływania z APTES-em struktura chemiczna DNA i jego konformacja ulegają lokalnym modyfikacjom. Jony Mg^{2+} są obojętne wobec natywnej struktury DNA. Otrzymane wyniki mają duże znaczenie dla grup naukowych zajmujących się badaniem DNA za pomocą mikroskopii skaningowej. Nasze badania dowiodły, iż wybór substratu i metodologii przygotowania próbek wpływają na strukturę chemiczną DNA i jego właściwości.

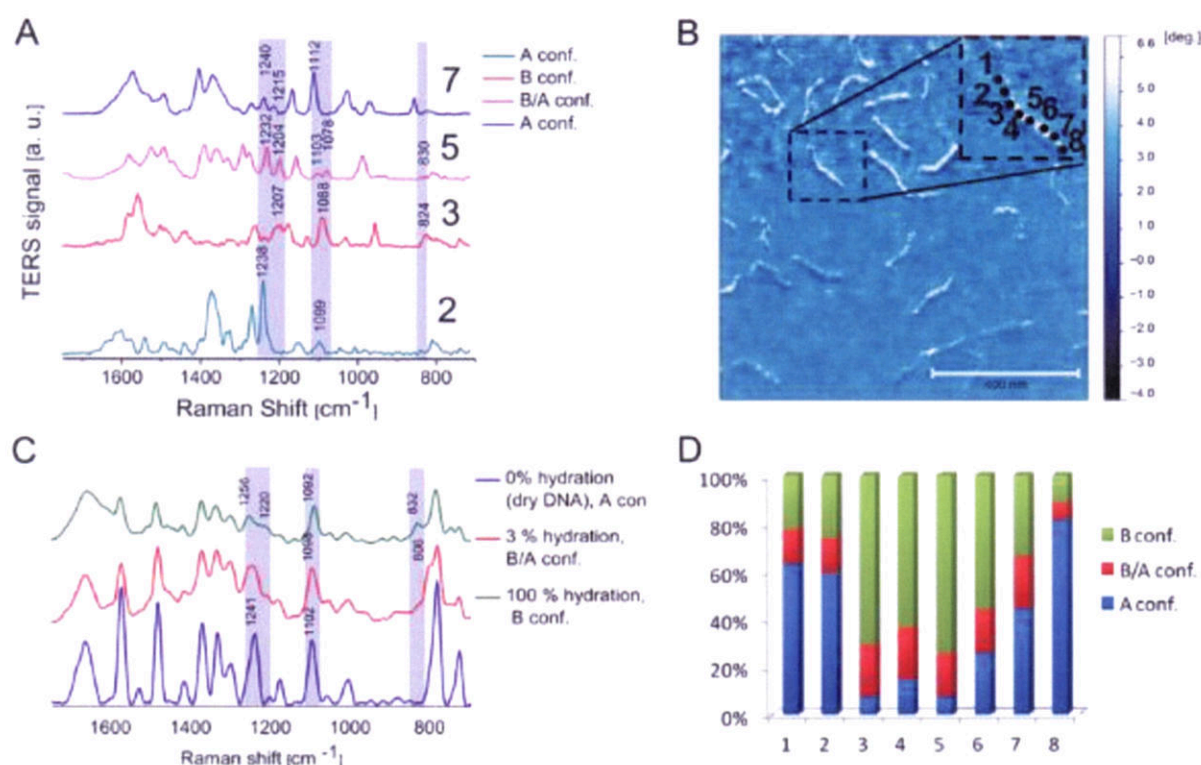
Nano-spektroskopowe monitorowanie sub-molekularnej zmiany konformacji DNA

Konformacja DNA zmienia się pod wpływem uwodnienia. Zastosowanie AFM-TERS do pomiarów cząsteczek DNA utrwalonych na mice pozwoliło na monitorowanie częściowej zmiany konformacji z formy B-DNA do A-DNA wywołanej wysuszeniem [H5].

TERS zastosowano do identyfikacji konformacji na sub-molekularnych odcinkach wzdłuż nici DNA zawierających 500 par zasad, utrwalonych za pomocą 2 mM roztworu jonów Mg^{2+} na kryształach miki. Próbniki TERS do tych eksperymentów przygotowano naparowując 20 nm warstwę srebra na komercyjnie dostępne krzemowe sondy używane w AFM. Obrazy topografii i fazy AFM zbierano w modzie przerywanego kontaktu z częstotliwością skanowania 0,2-0,3 Hz. Skanowano obszary o rozmiarach 1000-3000 nm. Na podstawie uzyskanych obrazów AFM, manualnie wybierano punkty pomiarowe - 8 równoodległych miejsc wzdłuż każdej badanej nici DNA. Długość cząsteczek DNA zawierających 500 par zasad osadzonych na mice za pomocą jonów Mg^{2+} wynosi 146 nm. Odległość pomiędzy kolejnymi pozycjami próbniaka podczas akwizycji widm wynosiła ≈ 21 nm. Na rysunku 7A przedstawione są widma TERS, zebrane wzdłuż jednej nici DNA, które wskazują na dwie konformacje: A-DNA, B-DNA oraz ich mieszaninę. Punkty pomiarowe zaznaczono na obrazie AFM przedstawionym na rysunku 7B (pozycje próbniaka: 2, 3, 5 i 7). Widma AFM-TER porównano z widmami Ramana zebranymi z kropli roztworu DNA podczas suszenia w celu monitorowania przejścia konformacyjnego DNA z B-DNA (uwodniony DNA) do A-DNA (wysuszony DNA). Względny poziom uwodnienia obliczono na podstawie intensywności pasma pochodzącego rozciągania O-H w cząsteczkach wody (3400 cm^{-1}). Jak wspomniano wcześniej, markerami konformacji DNA w widmach Ramana / TER są pozycje spektralne pasm pochodzących od symetrycznego i asymetrycznego rozciągania grup fosforanowych (O-P-O). Przesunięcia tych pasm w kierunku wyższych liczb falowych / niższej energii od 1080 cm^{-1} do 1112 cm^{-1}

i od 1207 cm^{-1} do 1240 cm^{-1} odpowiednio dla symetrycznego i asymetrycznego rozciągania O-P-O wskazują na przejście konformacyjne z formy B-DNA do A-DNA. Na podstawie położenia pasm pochodzących od drgań rozciągających grup fosforanowych określano konformację DNA w każdym punkcie pomiarowym. Dodatkowo brano pod uwagę obecność pasma przy $\sim 830\text{ cm}^{-1}$, jako indykatora konformacji B lub B/A. Obecność podwójnych pasm związanych z grupami fosforanowymi świadczyła o występowaniu obu konformacji A oraz B (A/B) w badanym obszarze cząsteczki. Zmierzono 27 różnych cząsteczek DNA (każdą mierzono przynajmniej trzykrotnie) i określono procentowo ilość danej konformacji (A-DNA, B-DNA, A/B-DNA) dla każdego punktu pomiarowego. Wyniki przedstawione są na rysunku 4D.

Zastosowanie techniki TERS pozwoliło potwierdzić sub-cząsteczkową heterogeniczność konformacji DNA w obrębie pojedynczych cząsteczek, a także wykryć obszary, w których występowanie danej formy DNA jest bardziej prawdopodobne. Nasze badania potwierdziły spektroskopowo, że DNA osadzone za pomocą jonów Mg na micy przechodzi częściową transformację z formy B-DNA do A-DNA pod wpływem suszenia. Transformacja ta zachodzi na końcach cząsteczek, w centralnej części konformacja B-DNA zostaje zachowana po wysuszeniu próbki.



Rysunek 7. Sub-cząsteczkowe zmiany konformacji DNA zawierającego 500 par zasad, przytwierdzonego do powierzchni miki za pomocą jonów Mg^{2+} : (A) widma zebrane wzdłuż cząsteczki DNA, cyfry 2, 3, 5 i 7 zaznaczone na obrazie fazy AFM (B) oznaczają pozycje sondy TERS podczas zbierania widm; (C) widma Ramana DNA w konformacji B-DNA (100% uwodnienia), konformacji A/B (3% uwodnienia), konformacji A-DNA (0% uwodnienia - suche DNA), (D) procentowa ilość konformacji A-DNA, B-DNA i A/B-DNA zarejestrowana na każdym z punktów pomiarowych: 1-8. Dane zebrano wzdłuż 27 cząsteczek DNA; [H5].

Nano-spektroskopia w badaniach struktury chemicznej lipidów

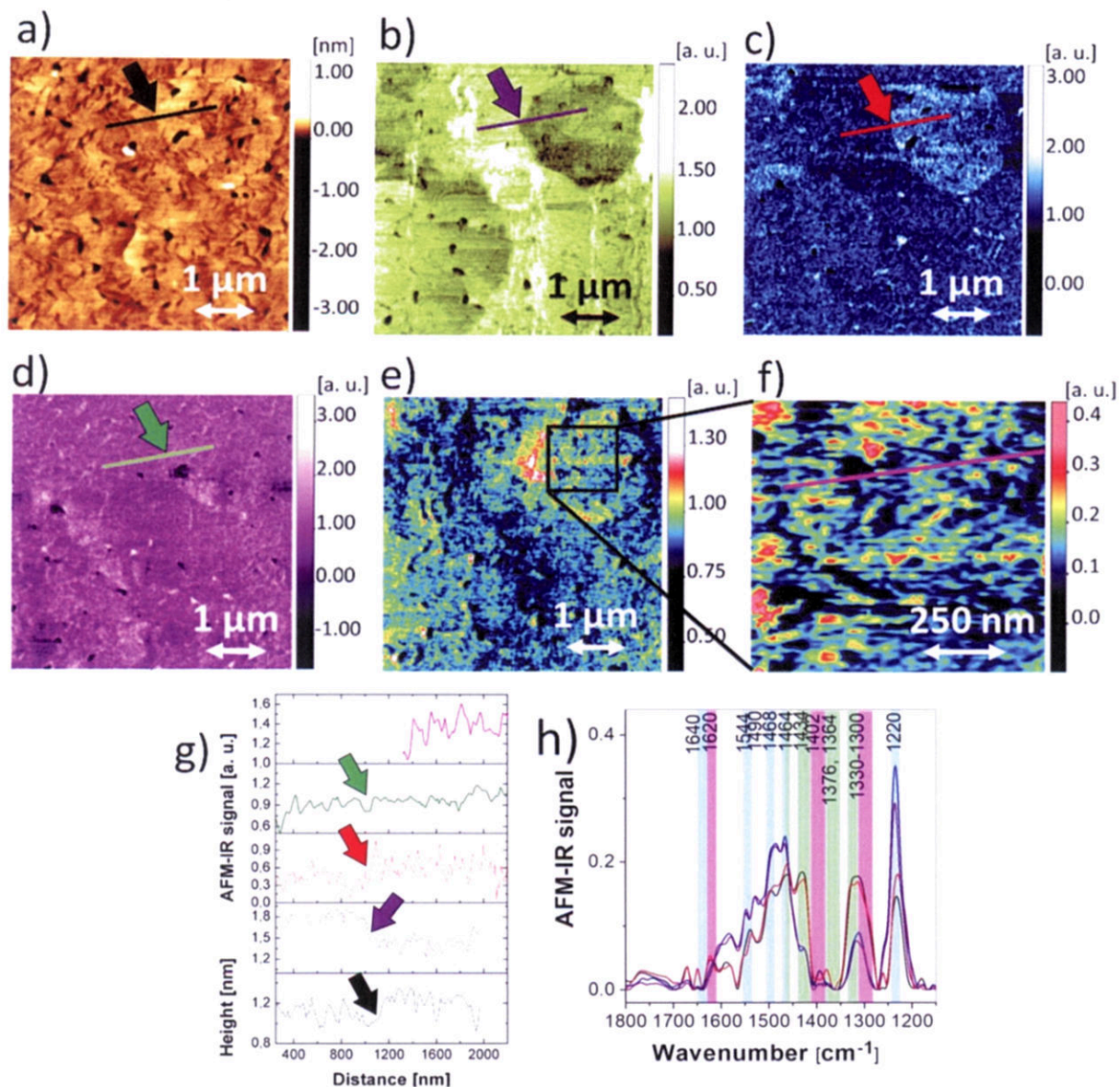
Zastosowanie nano-spektroskopii w zakresie podczerwieni pozwoliło na lokalną, chemiczną charakterystykę lipidów w modelowych warstwach lipidowych oraz kroplach lipidowych syntetyzowanych w komórkach nowotworowych w wyniku ekspozycji na promieniowanie jonizujące.

Charakterystyka syntetycznej monowarstwy lipidowej za pomocą nano-spektroskopii w zakresie podczerwieni

Błony lipidowe są wysoce uporządkowanymi strukturami, jednak w nanoskali wykazują heterogeniczność. Cząsteczki lipidów mogą tworzyć charakterystyczne domeny w błonie, zwane tratwami lipidowymi. Tratwy wpływają na dynamikę i stabilność biosystemów [47]. Leki immunosupresyjne i przeciwzapalne, takie jak cyklosporyna A (CsA) ze względu na lipofilowość, mogą wchodzić w interakcje z błonami lipidowymi i indukować tworzenie domen lipidowych o rozmiarach nanometrycznych. Ze względu na niejednorodność błon lipidowych w nanoskali, dokładne badania ich struktury i składu chemicznego wymagają zastosowania technik analitycznych, które próbują badać materiały w skali nanometrycznej takich jak nano-spektroskopia molekularna.

Przedmiotem naszych badań był trzyskładnikowy model: monowarstwa składająca się z mieszaniny sfingomieliny (SM), cholesterolu (Chol) i cyklosporyny A (CsA), otrzymana techniką Langmuir-Blodgett. Grubość próbek wynosiła 2-3 nm. Analiza tak cienkich próbek wymagała zastosowania bardzo czułej techniki. W celu zwiększenia czułości metody AFM-IR jako źródło światła zastosowano laser kwantowo-kaskadowy (QCL) pracujący w zakresie średniej podczerwieni. Częstotliwość dostarczania impulsów lasera była dostrajana do częstotliwości rezonansowej dźwigni próbnika AFM, wzmacniając czułość metody o około dwa rzędy wielkości [48-50]. Wzmocnienie związane z zastosowaniem lasera QCL nie było jednak wystarczające, aby uzyskać widma z monowarstwy lipidowej. Czułość AFM-IR dodatkowo wzmocniono poprzez zastosowanie próbników AFM powlekanych złotem i złotych podłoży w celu uzyskania wzmocnienia pola elektromagnetycznego w wyniku tzw. efektu piorunochronu w nano-szczelinie między ostrzem próbnika a podłożem [48]. Według obliczeń teoretycznych wzmocnienie pola elektromagnetycznego w szczelinie o rozmiarze 2 nm wynosi 2×10^5 [48, 51]. To dodatkowe wzmocnienie umożliwiło zebranie widm z lipidowych monowarstw. Rysunek 8 przedstawia wyniki mapowania AFM-IR reprezentatywnego regionu monowarstwy SM / Chol / CsA. Mapowano rozkład absorpcji światła podczerwonego o określonych energiach (liczbach falowych) odpowiadających pasmom charakterystycznym dla: Chol. (absorpcja przy 1420 cm^{-1}), SM (absorpcja przy 1225 cm^{-1}) i CsA (absorpcja przy 1630 cm^{-1}). Otrzymane wyniki wykazały, że zawartość cholesterolu jest wyższa poza okrągłymi domenami niż wewnątrz domen. Dystrybucja SM i CsA była odwrotna. Profile wyekstrahowane wzdłuż linii zaznaczonych na rysunku 8 wizualizują kontrast pomiędzy rozkładem każdej substancji wewnątrz i na zewnątrz okrągłej domeny. Rozkład absorpcji promieniowania o liczbie falowej 1920 cm^{-1} przedstawiono aby zademonstrować brak kontrastu związany z brakiem absorpcji tej energii promieniowania podczerwonego przez badaną próbkę. Widma zarejestrowane wewnątrz i na zewnątrz domen (czerwone i czarne widmo rys. 8) potwierdziły, że pasma przypisane do Chol (tj. 1434 cm^{-1} i 1300 cm^{-1}) są ponad dwa razy

bardziej intensywne w widmach uzyskanych na zewnątrz domeny, podczas gdy pasma od SM i CsA są bardziej intensywne wewnątrz domen. Spektroskopia i mapowanie AFM-IR potwierdziły, że cząsteczki CsA powodują separację faz i tworzenie charakterystycznych domen o określonym składzie lipidowym.



Rysunek 8. Mapowanie AFM-IR reprezentatywnego regionu monowarstwy mieszaniny SM / Chol. / CsA naniesionej na złotą powierzchnię: (a) topografia AFM, (b) dystrybucja Chol. (absorpcja przy 1420 cm^{-1}), (c) dystrybucja SM (absorpcja przy 1225 cm^{-1}), (d) rozkład absorpcji przy 1920 cm^{-1} , (e) rozkład CsA (absorpcja przy 1630 cm^{-1}), (f) powiększony obszar, gdzie obserwowalne są pojedyncze cząsteczki leku, (g) profile wyekstrahowane wzdłuż linii zaznaczonych na topografii i mapach AFM-IR, granicę pomiędzy fazami zaznaczono strzałkami, (h) Widma AFM-IR zebrane z monowarstwy (Chol. / SM / CsA, 0,47: 0,23: 0,30).; Pasma pochodzące od Chol. są zaznaczone kolorem zielonym, SM niebieskim, CsA różowym; [H6].

Dodatkowo, zastosowanie techniki AFM-IR pozwoliło na badanie orientacji cząsteczek w monowarstwie. Wzbudzanie cząsteczek światłem spolaryzowanym w określonym kierunku indukowało szczególne reguły wyboru względem powierzchni, wzmacniając sygnał spektralny od drgań zorientowanych wzdłuż danego kierunku polaryzacji. Efekt ten można wykorzystać do określenia orientacji cząsteczek naniesionych na płaskie podłoże [51], a także do identyfikacji markerów nieuporządkowania lipidów w monowarstwie [1, 48, 51, 52]. Widma uzyskane za pomocą lasera o polaryzacji *s* i *p* były różne. Intensywność drgań pochodzących od grup CH₂ w SM i Chol była istotnie wyższa w widmach uzyskanych za pomocą światła o polaryzacji *p*. Wynik ten potwierdził, że w badanej pojedynczej warstwie cząsteczek łańcuchy węglowodorowe skierowane są prostopadle do płaszczyzny podłoża, w przeciwieństwie do wiązań C=O i N-H z reszty amidowej w SM oraz C=C w Chol., od których pasma były bardziej intensywne w widmach absorpcji światła o polaryzacji *s*, co świadczy o równoległej do powierzchni próbki orientacji tych wiązań.

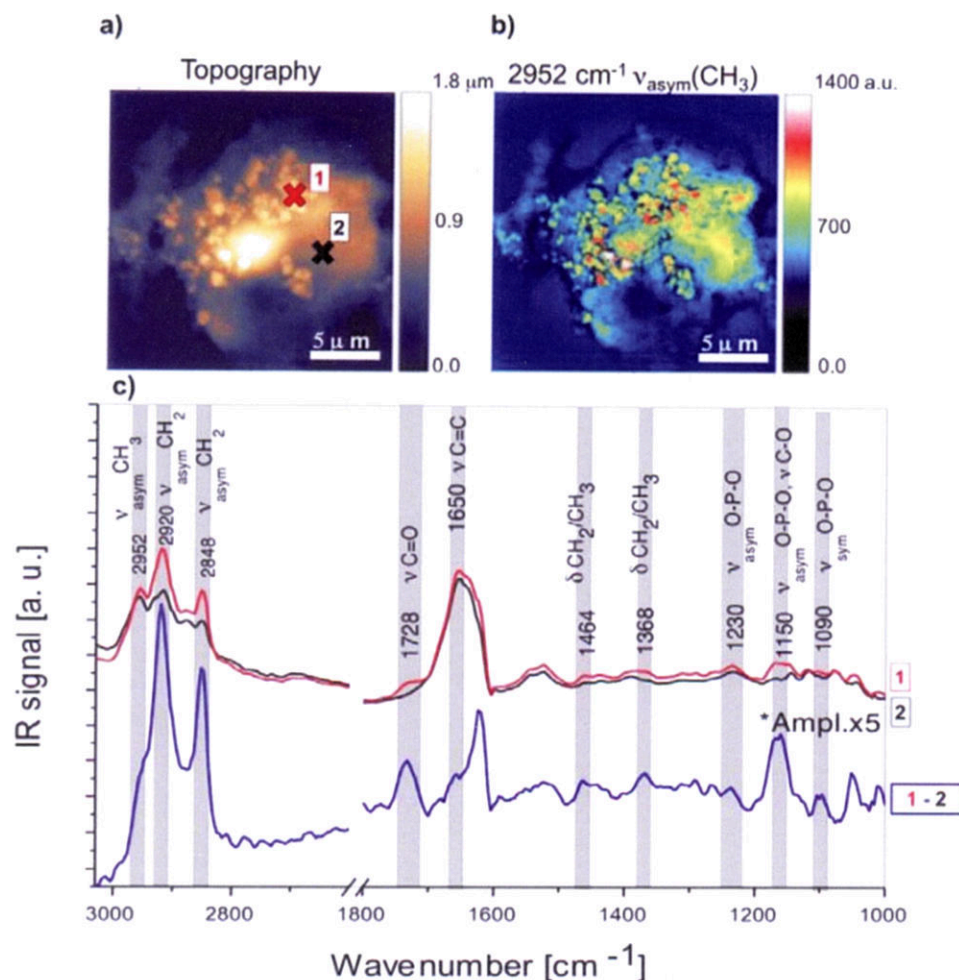
Podsumowując, nasze badania udowodniły znaczący wpływ leku immunosupresyjnego na uporządkowanie molekularne w modelowych, błonach lipidowych. Po raz pierwszy w skali nanometrycznej zarejestrowano rozkład absorpcji światła podczerwonego charakterystyczny dla cyklosporyny A, sfingomieliny i cholesterolu oraz lokalne widma monowarstw otrzymanych metodą Langmuir-Blodgett. Kolejnym innowacyjnym aspektem tej pracy było zastosowanie dwóch prostopadłych polaryzacji lasera, które pozwoliły na określenie względnej orientacji cząsteczek w monowarstwie i stopnia ich uporządkowania. [H6]

Charakterystyka chemiczna kropli lipidowych syntetyzowanych w komórkach glejaka w wyniku ekspozycji na promieniowanie jonizujące

Promieniowanie jonizujące podobnie jak inne czynniki, które uszkodzają komórki indukują mechanizmy obronne. W komórkach nowotworowych mechanizmy obronne mogą prowadzić do aktywacji komórek i szybkiej proliferacji związanej z przerzutowaniem. Rola metabolizmu lipidów w tworzeniu przerzutów jest bardzo ważna. Zastosowaliśmy nano- i mikro-spektroskopię w zakresie podczerwieni w połączeniu z wielowymiarową analizą statystyczną otrzymanych danych w celu scharakteryzowania wpływu promieniowania jonizującego na jądra komórek glejaka izolowane z komórek traktowanych dwoma rodzajami promieniowania jonizującego: promieniowaniem X (dawka 10 Gy) lub promieniowaniem protonowym (dawki 1 Gy i 10 Gy). Zastosowanie nano- i mikro-spektroskopii w połączeniu z odpowiednią analizą uzyskanych widm pozwoliło na jednoczesne śledzenie zmian chemicznych powstałych w wyniku napromieniania w lipidach, białkach i kwasach nukleinowych, w mikro i nanoskali. Widma oraz mapy w zakresie podczerwieni zebrane z jąder komórkowych izolowanych z komórek naświetlanych promieniowaniem rentgenowskim wykazały fragmentację kwasów nukleinowych, białek i lipidów wskazujących na kondensację chromatyny i powstanie ciałek apoptotycznych, typową dla komórek, które weszły na ścieżkę zaprogramowanej śmierci - apoptozy. Unikatowe zastosowanie nano-spektroskopii w zakresie podczerwieni do badań odpowiedzi na uszkodzenia radiacyjne pozwoliło na wykrycie i charakterystykę chemiczną kropli lipidowych skryzalizowanych na powierzchni jąder izolowanych z komórek traktowanych dawką 10 Gy promieniowania protonowego (Rys. 9).

Aby zidentyfikować skład chemiczny skryształizowanych struktur powstałych w komórkach traktowanych protonami, rejestrowano widma AFM-IR z regionów zawierających te struktury oraz z miejsc, w których one nie występowały. Następnie obliczano różnicę pomiędzy widmami. Wyniki przedstawione są na rysunku 9. Po odjęciu otrzymano widma charakterystyczne dla lipidów, które interpretowano w celu dokładnej identyfikacji chemicznej. Silna absorpcja promieniowania podczerwonego przy 2920 cm^{-1} oraz 1464 cm^{-1} pochodząca od drgań rozciągających i zginających grup metylowych jest związana z obecnością cholesterolu [53-56]. Ponadto, w widmach zebranych z kryształów lipidowych, zaobserwowano pasma od rozciągania wiązania estrowego $\text{C} = \text{O}$ przy 1728 cm^{-1} , drgania nożycowego grupy CH_2 przy 1464 cm^{-1} i rozciągającego CH przy 2848 cm^{-1} . Wymienione pasma są charakterystyczne dla estrów cholesterolu [54-56]. Zaobserwowano także pasmo pochodzące od rozciągania wiązania $\text{C} = \text{C}$ przy 1650 cm^{-1} , które jest uważane za marker spektralny nienasyconych kwasów tłuszczowych [25, 26]. Obecność wyżej wymienionych pasm jest charakterystyczna dla steroli, głównie cholesterolu i estrów cholesterolu. Te lipidy są odpowiedzialne za modulowanie płynności błony lipidowej w komórkach przygotowujących się do podziału [56]. Obecność steroli i estrów steroli jest związana z szybką proliferacją poprzedzającą tworzenie przerzutów. Zgodnie z literaturą wiele inhibitorów syntezy kwasów tłuszczowych odgrywa ważną rolę w profilaktyce przerzutów [56].

Charakterystyka chemiczna badanych kropli lipidowych o rozmiarach sub-mikronowych nie byłaby możliwa przy użyciu konwencjonalnych lub synchrotronowych źródeł promieniowania podczerwonego ze względu na niską czułość i rozdzielczość przestrzenną. Zebrane z komórek glejaka traktowanych promieniowaniem widma SR-FTIR potwierdziły jedynie wzrost zawartości lipidów w jądrach izolowanych z komórek traktowanych 10 Gy protonów. Nasze rezultaty są zgodne z dotychczasowymi wynikami badań sugerującymi, że akumulacja cholesterolu i estrów cholesterolu jest charakterystyczna dla agresywnych komórek nowotworowych, produkujących błony lipidowe przed podziałem komórkowym związanym z przerzutami [57]. Synteza tych lipidów jest cechą charakterystyczną dla agresywnych komórek rakowych, produkujących błony przed szybką proliferacją [57]. Nasze badania pozwoliły lepiej zrozumieć interakcję pomiędzy pojedynczymi komórkami i promieniowaniem jonizującym. Otrzymane wyniki powinny być brane pod uwagę przy planowaniu strategii leczenia glejaków. [H7]



Rysunek 9. Charakterystyka lipidów syntetyzowanych w komórkach traktowanych promieniowaniem: a) topografia AFM, b) mapa absorpcji AFM-IR przy 2956 cm^{-1} (rozkład lipidów) w jądrze komórkowych izolowanym z komórki inkubowanej przez 48 godzin po traktowaniu dawką 10 Gy protonów o energii 60 MeV, c) widma AFM-IR zebrane z miejsca, w którym znajdowała się kropla lipidowa (1) oraz z obszaru sąsiadującego (2), różnica widm (1-2); [H7].

Podsumowanie

Zastosowanie fizycznych technik nano-spektroskopowych do badań białek [H1-H3], kwasów nukleinowych [H4, H5] i lipidów [H6, H7] przyniosło unikatowe, ważne dla nauk o życiu informacje o tych systemach. Uzyskane wyniki nie mogły być otrzymane za pomocą konwencjonalnych metod analitycznych ze względu na ich ograniczenia metodologiczne. Nasze badania uzupełniły istniejącą wiedzę o obecnie intensywnie badanych próbkach: peptydów neurodegeneracyjnych, ii) matalo-protein, iii) nici DNA, iv) monowarstw cholesterolu / sfingomieliny i leków immunosupresyjnych v) lipidów syntetyzowanych po ekspozycji na promieniowanie. Wszystkie te próbki wymagały szczególnego podejścia eksperymentalnego obejmującego optymalizację / modyfikację istniejących technik nano-spektroskopowych w celu uzyskania odpowiedniego stosunku sygnału do szumu. Następnie otrzymane widma poddano wielowymiarowej analizie statystycznej aby wyekstrahować najważniejsze informacje o strukturze chemicznej badanych systemów.

Osiągnięcia metodologiczne zaimplementowane po raz pierwszy i opisane w artykułach, które składają się na prezentowane w niniejszym autoreferacie osiągnięcie naukowe w tym: i) hiper-spektralne mapowanie AFM-TERS agregatów białkowych o grubości 2-4 nm, ii) zebranie widm STM-TERS z monowarstwy metaloprotein, pierwsze mapowanie i pomiary spektroskopowe w zakresie podczerwieni monowarstwy SM / CHOL mają duże znaczenie dla rozwoju nano-spetroskopii, biologii molekularnej i nano-medycyny.

5. STRESZCZENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Opis moich pozostałych osiągnięć naukowych przedstawiony jest poniżej. Artykuły zostały uporządkowane tematycznie.

5.1 Zastosowanie mikro- i nano-spektroskopii molekularnej w badaniach wpływu promieniowania na biocząsteczki

Prace własne:

- A1 **E. Lipiec**, R. Sekine, J. Bielecki, W. M. Kwiatek, B. R., Wood, Molecular characterisation of DNA double strand breaks with Tip Enhanced Raman Scattering (TERS), *Angewandte Chemie International Edition* 53(1) (2014) 169–172
- A2 **E. Lipiec**, K. R. Bambery, J. Lekki, M. J. Tobin, C. Vogel, D. R. Whelan, B. R. Wood, W. M. Kwiatek, SR-FTIR coupled with Principal Component Analysis shows evidence for the cellular bystander effect, *Radiation Research* 184 (1) (2015) 73–82
- A3 **E. Lipiec**, K. R. Bambery, P. Heraud, W. M. Kwiatek, D. McNaughton, M. J. Tobin, C. Vogel and B. R. Wood, Monitoring UVR induced damage in single cells and isolated nuclei using SR-FTIR microspectroscopy and 3D confocal Raman imaging, *the Analyst* 139 (2014) 4200–4209
- A4 **E. Lipiec**, G. Birarda, J. Kowalska, J. Lekki, L. Vaccari, A. Wiecheć, B. R. Wood, W. M. Kwiatek, A new approach to studying the effects of ionising radiation on single cells using FTIR synchrotron microspectroscopy, *Radiation Physics and Chemistry* 93 (2013) 135–142
- A5 S. Bożek, J. Bielecki, A. Wiecheć, J. Lekki, Z. Stachura, K. Pogoda, **E. Lipiec**, K. Tkocz, W. M. Kwiatek X-ray microbeam stand-alone facility for cultured cells irradiation, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 394 (2017) 50–60
- A6 **E. Lipiec**, J. Kowalska, J. Lekki, A. Wiecheć, W. M. Kwiatek, FTIR microspectroscopy in studies of DNA damage induced by proton microbeam in single PC-3 cell, *Acta Physica Polonica A*, 121 (2012) 506–509
- A7 **E. Lipiec**, K. R. Bambery, P. Heraud, C. Hirschmugl, J. Lekki, W. M. Kwiatek, M. J. Tobin, C. Vogel, D. Whelan, B. R. Wood, Synchrotron FTIR shows evidence of DNA damage and lipid accumulation in prostate adenocarcinoma PC-3 cells following proton irradiation, *Journal of Molecular Structure* 1073 (2014) 134–141
- A8 M. Borkowska, M. Nowakowski, J. Miszczyk, **E. W. Lipiec**, J. Wiltowska- Zuber, K. Rawojć oraz W. M. Kwiatek, Comparison of methods in studies of cell death mechanisms, *Acta Physica Polonica A* 133 (2) 2018 263–266

- A9 **E. W. Lipiec**, J. Dulińska-Litewka, M. Kubica, J. Lekki, Z. Stachura, A. M. Wiecheć, J. Wiltowska-Zuber, W. M. Kwiatek, Changes in cellular response to the damage induced in PC-3 prostate cancer cells by proton microbeam irradiation, *General Physiology and Biophysics* 31 (2012) 11–18
- A10 J. Kobierski, **E. Lipiec**, DNA structure change induced by guanosine radicals—A theoretical and spectroscopic study of proton radiation damage, *Journal of Molecular Structure* 1178 (2019) 162–168
- A11 J. Bielecki, **E. Lipiec**, Basis set dependence using DFT/B3LYP calculations to model the Raman spectrum of thymine, *Journal of bioinformatics and computational biology* 14, (2016) 1650002
- A12 J. Czapla-Masztafiak, J. Szlachetko, C. J. Milne, **E. Lipiec**, J. Sá, Thomas J Penfold, T. Huthwelker, C. Borca, R. Abela, W. M. Kwiatek, Investigating DNA radiation damage using X-ray absorption spectroscopy, *Biophysical Journal* 110 (2016) 1304–1311

Omówienie

Jednym z najważniejszych osiągnięć naukowych mojej pracy doktorskiej było zaprojektowanie i wykonanie pierwszych eksperymentów, które pozwoliły na szczegółowy opis struktury chemicznej najniebezpieczniejszych uszkodzeń DNA - podwójnych przerwań nici DNA (ang. Double Strand Breaks DSBs), spowodowanych ekspozycją na promieniowanie UV. Duże znaczenie podjętego tematu badań zostało podkreślone przez Komitet Noblowski, który przyznał Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii, w 2015 r., za odkrycie podstawowych mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA spowodowanych promieniowaniem UV. W celu zbadania struktury chemicznej podwójnych przerwań nici DNA zaproponowałam zastosowanie spektroskopii ramanowskiej wzmocnionej na ostrzu sondy skanującej (TERS). Na podstawie widm TER, w których zarejestrowano pasma pochodzące od drgań rozciągających grup POH i drgań deformacyjnych grup metylowych i metylenowych udowodniono, iż przerwania powstają najczęściej w wyniku pęknięcia wiązań 3' i 5' pomiędzy grupą fosforanową a deoksyrybozą. W miejscu pęknięcia do uszkodzonych fragmentów nici przyłączają się atomy wodoru lub grupy wodorotlenowe, wskazując na reakcję z wolnymi rodnikami powstałymi podczas hydrolizy wody (DNA naświetlano w roztworze wodnym). Badania te wykonałam podczas studiów doktoranckich we współpracy z prof. Baydenem Wood z Uniwersytetu Monash. Wyniki zostały opublikowane w prestiżowym czasopiśmie *Angewandte Chemie* [A1] i zaprezentowane przeze mnie podczas konferencji "SPEC 2012, Shedding New Light on Diseases". Referat został nagrodzony jako najlepsza prezentacja studencka konferencji.

Niezwykle istotnym aspektem mojej pracy naukowej są rozpoczęte podczas studiów doktoranckich i kontynuowane po uzyskaniu stopnia doktora badania w dziedzinie radiobiologii i radiologii. Zaproponowałam i wykonałam pionierskie eksperymenty obejmujące badanie efektu sąsiedztwa w populacji komórek raka prostaty znajdujących się w bliskim otoczeniu komórek traktowanych promieniowaniem protonowym wytwarzanym przez układ mikro-wiązki. W celu monitorowania reakcji komórek zastosowana została mikroskopia w zakresie podczerwieni (SR-FTIR) z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego [A2]. Uzyskane widma pojedynczych komórek były opracowywane za pomocą analizy składowych głównych. Zastosowanie SR-FTIR pozwoliło na monitorowanie przejścia

konformacyjnego od formy B-DNA do formy A-DNA oraz wzrost ekspresji białek związanych z naprawą uszkodzeń DNA w żywych komórkach czerniaka, traktowanych uprzednio kombinacją promieni UVA i UVB, imitującą promieniowanie słoneczne docierające do powierzchni Ziemi [A3]. Artykuł przygotowany na podstawie wyników tych badań został wyróżniony przez redakcję czasopisma *Analyst* jako najczęściej czytany. Dodatkowo, monitorowałam uszkodzenia DNA w pojedynczych komórkach indukowane przez promieniowanie jonizujące wytwarzane w układach mikro-wiązek protonowej i promieniowania X oraz konwencjonalnych źródeł promieniowania [A4-A9]. Opisane powyżej badania zostały uzupełnione wynikami obliczeń teoretycznych dla uszkodzonego DNA [A10] lub jego komponentów, takich jak adenina [A11]. Na podstawie porównania widm wyznaczonych teoretycznie z widmami eksperymentalnymi wyjaśniliśmy zmiany molekularne zachodzące w obrębie par zasad DNA i szkieletu DNA, które mogą powstawać w wyniku tworzenia się uszkodzeń wywołanych promieniowaniem. Ustalono możliwe szlaki powstawania uszkodzeń DNA wywołanych przez bezpośrednią interakcję z protonami lub wolnymi rodnikami, które w naświetlanych próbkach powstawały w wyniku radiolizy wody.

Byłam również zaangażowana w badanie uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem UVA i protonowym za pomocą rentgenowskiej spektroskopii absorpcyjnej dla krawędzi K fosforu [A12]. W badaniach tych ustalono jakie rodzaje uszkodzeń radiacyjnych powstają w szkielecie DNA wokół atomów fosforu oraz obliczono ich ilość w zależności od dawki i rodzaju promieniowania.

5.2 Mechanizmy działania leków chemoterapeutycznych

Prace własne

- B1 **E. Lipiec**, J. Czapla, J. Szlachetko, Y. Kayser, W. Kwiatek, B. Wood, G. B. Deacon and J. Sá, Novel in situ methodology to observe the interactions of chemotherapeutical Pt drugs with DNA under physiological conditions, *Dalton Transactions*, 43(37) (2014) 13839–13844
- B2 J. Czapla-Masztafiak, J. J. Nogueira, **E. Lipiec**, W. M. Kwiatek, B. R. Wood, G. B. Deacon, Y. Kayser, D. L.A. Fernandes, M. V. Pavliuk, J. Szlachetko, L. González, J. Sá, Direct Determination of Metal Complexes' Interaction with DNA by Atomic Telemetry and Multiscale Molecular Dynamics, *The Journal of Physical Chemistry Letters* 8 (2017) 805–811
- B3 J. Sa, J. Czapla-Masztafiak, **E. Lipiec**, Y. Kayser, D. L.A. Fernandes, J. Szlachetko, F. Dufrasne, G. Berger, Resonant X-ray emission spectroscopy of platinum (II) anticancer complexes, *Analyst* 141 (2016) 1226–1232
- B4 J. Sá, J. Czapla-Masztafiak, **E. Lipiec**, Y. Kayser, W. Kwiatek, B. Wood, G. B. Deacon, G. Berger, F. Dufrasne, D. L. A. Fernandes, J. Szlachetko, "The use of Resonant X-ray Emission Spectroscopy (RXES) for the electronic analysis of metal complexes and their interactions with biomolecules, *Drug Discovery Today: Technologies* 16 (2015) 1–6
- B5 G. Berger, L. Fusaro, M. Luhmer, J. Czapla-Masztafiak, **E. Lipiec**, J. Szlachetko, Y. Kayser, D. L. A. Fernandes, J. Sá, F. Dufrasne, S. Bombard, "Insights into the structure–

- activity relationships of chiral 1,2-diaminophenylalkane platinum(II) anticancer derivatives, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 20 (2015) 841–853
- B6 J. Czapla-Masztafiak, A. Kubas, Y. Kayser, D. L. A. Fernandes, W. M. Kwiatek, **E. Lipiec**, G. B Deacon, K. Al-Jorani, B. R Wood, J. Szlachetko, Jacinto Sá, Mechanism of hydrolysis of a platinum (IV) complex discovered by atomic telemetry, *Journal of inorganic biochemistry*, 187 (2018) 56–61

Omówienie

Obecnie od wynalezienia leku chemoterapeutycznego do pełnego zrozumienia jego mechanizmu działania mija dużo czasu. Oddziaływanie leku na DNA bada się wieloma metodami chemicznymi i fizycznymi. Nasze badania wykazały, że zastosowanie rezonansowej rentgenowskiej spektroskopii emisyjnej (RXES ang. Resonant X-ray Emission Spectroscopy) w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi skraca czas między odkryciem chemoterapeutyku zawierającego metal, a wyjaśnieniem mechanizmu jego działania. Integralną częścią moich badań jest analiza przyłączania się leków przeciwnowotworowych, takich jak cisplatyna [B 1] i inne kompleksy platyny [B2 - B6] do DNA za pomocą metody RXES in situ. RXES pozwala na śledzenie zmian struktury cząsteczek leku w kontakcie z płynami fizjologicznymi i po przyłączeniu do DNA. Ze względu na przenikliwe własności twardych promieni rentgenowskich możliwe jest określenie interakcji pomiędzy lekami, a DNA w warunkach fizjologicznych.

Udowodniliśmy, że uwodnione formy leków przeciwnowotworowych zawierających platynę na II stopniu utlenienia, takich jak cisplatyna i $[\text{Pt}\{((\text{p-}\text{HC}_6\text{F}_4)\text{NCH}_2)_2\}(\text{py})_2]$ nazwany Pt-103, wiążą się z atomami azotu w różnych zasadach DNA. Utworzenie wiązań kowalencyjnych jest możliwe poprzez zastąpienie jednego lub dwóch opuszczających lek ligandów przez atomy azotu znajdujące się w zasadach DNA [B1-B5]. Nasze wyniki potwierdziły, że cisplatyna wiąże się głównie z guaniną [B1] w przeciwieństwie do leku Pt-103, który przyłącza się przede wszystkim do adeniny. Leki zawierające Pt(II) tworzą kowalencyjne wiązania krzyżowe z DNA powodując zniekształcenia struktury podwójnej helisy. Dodatkowo, opisaliśmy mechanizm hydrolizy kompleksu przeciwnowotworowego zawierającego platynę na czwartym stopniu utlenienia $[\text{Pt}\{\text{N}(\text{p-}\text{HC}_6\text{F}_4)\text{CH}_2\}_2(\text{NC}_5\text{H}_5)_2(\text{OH})_2]$ nazwanego Pt-103(OH) [B6]. Uzyskane widma i mapy RXES uzupełniono wynikami pomiarów spektroskopii rezonansu magnetycznego (^{19}F NMR ang. Nuclear Magnetic Resonance) i obliczeniami teoretycznymi. Wyniki badań wykazały, że ten kompleks Pt (IV) nie zmienia stopnia utlenienia w roztworze fizjologicznym (HEPES) przy pH 7,4 jak wcześniej podejrzewano. Badania RXES są ważne dla projektowania nowych kompleksów opartych na platynie, jak również dla zrozumienia ich modyfikacji chemicznych pod wpływem warunków fizjologicznych.

5.3 Zastosowanie średniej i dalekiej podczerwieni oraz rozpraszania Ramana w badaniach układów złożonych

Prace własne

- C1 C. Vogel, J. Stemann, K. Holldack, R. Sekine, **E. Lipiec**, C. Adam, Thermal Treatment of Chromium(III) Oxide with Carbonates Analyzed by Far-Infrared Spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 69 (2015) 1210–1214
- C2 C. Vogel, C. Adam, R. Sekine, T. Schiller, **E. Lipiec**, D. McNaughton, Determination of P-fertiliser-soil reactions by Raman and synchrotron Infrared microspectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 67 (2013) 1165–117
- C3 C. Vogel, C. Adam, P. Kappenc, T. Schiller, **E. Lipiec**, D. McNaughton, Chemical state of chromium in sewage sludge ash based phosphorus-fertilisers, *Chemosphere*, 103 (2014) 250–255
- C4 A. Wiecheć, J. Opiela, **E. Lipiec**, W. M. Kwiatek, Utility of FT-IR imaging spectroscopy in estimating differences between the quality of bovine blastocysts, *Journal of Molecular Structure*, 1049 (2013) 227–232
- C5 **E. Lipiec**, J. Kowalska, A. Wiecheć, P. M. Zieliński, W. M. Kwiatek, M. Iwaniec, Infrared spectroscopy in molecular study of the piezoelectric effect in pig shine bone, *Acta Physica Polonica A*, 121 (2012) 539–542

Omówienie

Rozpraszanie Ramana oraz absorpcja średniej i dalekiej podczerwieni są wykorzystywane w badaniach różnych układów złożonych. Uczestniczyłam w projektach naukowych obejmujących zastosowanie spektroskopii cząsteczkowej Ramana i w zakresie podczerwieni z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego w badaniach reakcji gleby na nawozy fosforowe [C1-C3]. Badania te umożliwiły wykrycie toksycznego Cr(IV) w nawozie fosforanowym wytworzonym na bazie popiołu ze spalania osadów ściekowych, który został poddany obróbce termicznej z wykorzystaniem węgla wapnia i węgla sodu. Mikro-spektroskopia w zakresie podczerwieni i mikro-spektroskopia Ramana zostały zastosowane również do badania mechanizmów reakcji jakie zachodzą w wyniku interakcji nawozów mineralnych zawierających fosfor z glebą. Pirofosforan wapnia okazał się niereaktywny w glebie, w przeciwieństwie do pirofosforanu magnezu, który w kontakcie z glebą szybko tworzy fosforan magnezu, mogący wnikać do roślin.

Metody spektroskopii cząsteczkowej wykorzystywałam również do charakterystyki chemicznej próbek biologicznych, takich jak blastocysty bydłowe [C4] i tkanka kostna [C5]. Badania tkanki kostnej za pomocą spektroskopii w zakresie podczerwieni pozwoliły na wykrycie zmian molekularnych w wyniku efektu piezoelektrycznego. Wykazano, że pole elektryczne i naprężenia ściskające oddziałują głównie na grupy fosforanowe. Nasze badania poświęcone blastocystom potwierdziły, że FT-IR jest skutecznym narzędziem dla biologii i genetyki, pozwalającym na oszacowanie jakości oocytów i zarodków.

5.4 Charakterystyka monowarstw lipidowych wytworzonych metodą of Langmuir-Blodgett

Prace własne

- D1 A. Wnetrzak, **E. Lipiec**, K. Łatka, W. Kwiatek, P. Dynarowicz-Łatka, "Affinity of Alkylphosphocholines to Biological Membrane of Prostate Cancer: Studies in Natural and Model Systems, *The Journal of Membrane Biology*, 247(7) (2014) 581–589
- D2 A. Wnetrzak, K. Małyła-Juzak, A. Chachaj-Brekiesz, **E. Lipiec**, N. Vila Romeu, P. Dynarowicz-Łatka, Cyclosporin A distribution in cholesterol-sphingomyelin artificial membranes modeled as Langmuir monolayers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 166 (2018) 286–294

Omówienie

Kolejnym ważnym aspektem mojej pracy naukowej jest charakteryzowanie struktury chemicznej monowarstw lipidowych otrzymanych techniką Langmuir-Blodgett i ich oddziaływania z lekami immunosupresyjnymi, przeciwzapalnymi i alkilofosfocholinami.

Właściwości przeciwnowotworowe heksadecylofosfocholiny (miltefosyny) i erucylofosfocholiny badano na poziomie cząsteczkowym i komórkowym. Pomiary na modelu wykonane metodą Langmuira dowiodły, iż badane leki cechuje powinowactwo do monowarstwy lipidowej, mimikującej błonę komórki nowotworu prostaty. Wykazaliśmy, że erucylofosfocholina oddziałuje na modelową membranę silniej niż heksadecylofosfocholina. Obie badane substancje zwiększają płynność błon lipidowych, co może indukować zaprogramowaną śmierć komórek - apoptozę. Mikroskopia fluorescencyjna potwierdziła, że badane alkilofosfocholiny powodują apoptotyczną śmierć komórek raka prostaty. [D1]

We wstępnych badaniach wpływu cyklosporyny A na monowarstwy lipidowe wykonywałam głównie charakterystykę AFM badanych układów naniesionych na płaskie podłoża. Zastosowanie AFM pozwoliło udowodnić, że cyklosporyna A może indukować rozdzielanie faz prowadzące do powstania owalnych domen lipidowych w błonach złożonych z cholesterolu (Chol.) i sfingomieliny (SM). Indukcja rozdziału faz zależy od relatywnej ilości Chol. w stosunku do SM w modelowej błonie [D2]. Dokładną charakterystykę chemiczną i strukturalną tego układu wykonano w ostatnim czasie za pomocą techniki AFM-IR [H7]. Artykuł, który powstał w oparciu o wyniki tych eksperymentów jest włączony do mojego głównego osiągnięcia naukowego opisanego powyżej.

Podsumowanie bibliometryczne dorobku:

Całkowita liczba artykułów w czasopismach z listy JCR: 32 (w tym 28 po doktoracie).

Sumaryczny impact factor publikacji: 134,893 (w tym na cykl [H1-H7] przypada 62,751).

Liczba cytowań wg bazy WoS / Google Scholar: 274 (244 bez auto-cytowań) / 338.

Indeks Hirsha wg WoS / Google Scholar: 9 / 10.

Bieżące dane bibliometryczne są dostępne na stronach:

(WoS):

https://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do?product=WOS&search_mode=CitationReport&SID=D2kHvZC17m2dcBEllpP&page=1&cr_pqid=7&viewType=summary&from_ML=true&colName=WOS

(Google Scholar): <https://scholar.google.com/citations?hl=en&user=&user=LbxITkgAAAAJ>

References:

- [1] R. M. Stöckle, Y. D. Suh, V Deckert, R. Zenobi, Chem. Phys. Lett., **318**, 131– 136 (2000).
- [2] L. Novotny, N. van Hulst, Nat. Photonics, **5**, 83 (2011).
- [3] M. Liao, S. Jiang, C. Hu, R. Zhang, Y. Kuang, Y. Zhu, Y. Zhang, and Z. Dong, Nano Lett. **16**, 4040 (2016).
- [4] R. Zhang, et al., Nature **82**, 498 (2013).
- [5] C. Chen, N. Hayazawa, S. Kawata, Nat. Commun. **5**, 3312, (2014).
- [6] K. F. Domke, D. Zhang, B. Pettinger, J. Phys. Chem. C **111** (2007) 8611.
- [7] L. Opilik et al., Phys. Chem. Chem. Phys. **13**, 9978 (2011).
- [8] S. Najjar, D. Talaga, L. Schu, Y. Coffinier, S. Szunerits, R. Boukherroub, L. Servant, V. Rodriguez, S. Bonhommeau, J. Phys. Chem. C, **118**, 1174–1181 (2014).
- [9] S. Bonhommeau, D. Talaga, J. Hunel, C. Cullin, S. Lecomte, Angew. Chem. Int Edit., **56**, 1771–1774. (2017).
- [10] M. Paulite, C. Blum, T. Schmid, L. Opilik, K. Eyer, G. C. Walker, R. Zenobi, ACS Nano, **7**, 911 – 920, (2013).
- [11] C. C. van den Akker, T. Deckert-Gaudig, M. Schleegeer, K. P. Velikov, V. Deckert, M. Bonn, G. H. Koenderink, Small, **11**, 4131 –4139 (2015).
- [12] D. Kourouski, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, I. K. Lednev, J. Am. Chem. Soc. **134**, 13323 –13329 (2012).
- [13] C.C. van den Akker, M. Scleegeer, A. L. Bruinen, T. Deckert-Gaudig, K.P.R Velikov, M. A., Heeren V. Deckert, M. Bonn, G. H. J. Koenderink,. Phys. Chem. B, **120**, 8809–8817 (2016).
- [14] T. Deckert-Gaudig, D. Kourouski, M. A. B. Hedegaard, P. Singh, I. K. Lednev, V. Deckert, J. Phys. Chem. B, **120**, 8809–8817 (2016)
- [15] C. Helbing, T. Deckert-Gaudig, I. Firkowska-Boden, G. Wei, V. Deckert, K. D. Jandt, ACS nano, **12**, 1211-1219 (2018).
- [16] T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, Sci. Rep. **6**, 39622 (2016).
- [17] C. Blum, T. Schmid, L. Opilik, S. Weidmann, S. R. Fagerer, R. Zenobi, J. Raman Spectrosc. **43**, 1895–1904 (2012).
- [18] P. Hermann, H. Fabian, D. Naumann, A. Hermelink, J. Phys. Chem. **115**, 24512– 24520 (2011).
- [19] B. R. Wood, M. Asghari-Khiavi, E. Bailo, D. McNaughton, V. Deckert, Nano Lett., **12**, 1555–1560 (2012).
- [20] M. Moretti, R.P. Zaccaria, E. Descrovi, G. Das, M. Leoncini, C. Liberale, F. De Angelis, E. Di Fabrizio, Plasmonics, **8**, 25–33 (2013).
- [21] G. Gao, M. Zhang, P. Lu, G. Guo, D. Wang, T. Sun, Angew. Chem. Int. Ed. **2015**,

- 54,2245–2250; *Angew.Chem.*, **127**, 2273–2278 (2015).
- [22] Amenabar, et al. *Nat. Commun.*, **4**, 2890 (2013).
 - [23] Keilman, F., Hillenbrand, R. *Nano-Optics and Near-Field Optical Microscopy*, D. Richards, A. Zayats, Eds.; Artech House: Boston/London, 2009.
 - [24] Huth, F.; Schnell, M.; Wittborn, J.; Ocelic, N.; Hillenbrand, R. *Nat. Mater.* **10**, 352–356 (2011).
 - [25] Dazzi, C. B. Prater, Q. Hu, D. B. Chase, J. F. Rabolt, C. Marcott, *Appl. Spectrosc.* **66**, 1365–1384 (2012).
 - [26] F. S. Ruggeri, S. Vieweg, U. Cendrowska, G. Longo, A. Chiki, H. A. Lashuel, G. Dietler, *Sci. Rep.* **6**, 31155 (2016).
 - [27] D. Galante, F. S. Ruggeri, G. Dietler, F. Pellistri, E. Gatta, A. Corsaro, T. Florio, A. Perico, C. D'Arrigo, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **79**, 161–170 (2016).
 - [28] G. Ramer, F. S. Ruggeri, A. Levin, T. P. J. Knowles, A. Centrone *ACS Nano*, **1**, 6612–6619 (2018)
 - [29] A. Stanisław, *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny. Tom 3. Analizy wielowymiarowe*, StatSoft Polska, Kraów (2007).
 - [30] R. Riek, D. S. Eisenberg, *Nature* **539**, 227–235(2016).
 - [31] T. P. Knowles, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 384–396 (2014).
 - [32] M. Jucker, L. C. Walker, *Nature* **501**, 45–51 (2013).
 - [33] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **297**, 353–356 (2002).
 - [34] M. Goedert, *Nature*, **388**, 232–233 (1997).
 - [35] H. Y. Zoghbi, H. T. Orr, *Annu Rev Neurosci*, **23**, 217–247 (2000).
 - [36] C. A. Ross, M. A. Poirier, *Nat. Methods* **10**, 10–17 (2004).
 - [37] C. A. Ross, M. A. Poirier, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 891–898 (2005).
 - [38] D. Nemecek, J. Stepanek, G. J. Jr Thomas, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **71**, 17.8.1–17.8.52 (2013).
 - [39] M. F. Rosario-Alomar, T. Quinones-Ruiz, D. Kurouski, V. Sereda, E. B. Ferreira, L. De Jesus-Kim, S. Hernández-Rivera, D. V. Zagorevski, J. Lopez-Garriga, I. K. Lednev, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 1265–1274 (2015).
 - [40] L. Masino, G. Nicastro, L. Calder, M. Vendruscolo, A. Pastore, *Functional interactions as a survival strategy against abnormal aggregation. FASEB J.* **25**, 45–54 (2011).
 - [41] E. Sheremet, R. D. Rodriguez, A. L. Agapov, A. P. Sokolov, M. Hietschold, D. R. T. Zahn, *Carbon*, **96**, 588 (2016)
 - [42] R. Treffer, X. Lin, E. Bailo, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, Beilstein *J. Nanotechnol.*, **2**, 628 (2011).
 - [43] R. Treffer, R. Bohme, T. Deckert-Gaudig, K. Lau, S. Tiede, X. Lin, *Biochem. Soc. Trans.*, **40**, 609 (2012)
 - [44] D. Lin-Vien, N. B. Colthrup, W. G. Fateley, J. G. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press Inc., San Diego, USA 1991.

- [45] M. Gnyba , M. Kozaniecki , P. Wierzba , Mol. Quantaum Acoust., **26**, 81 (2005).
- [46] S. J. LeBlanc J. W. Gauer, P. Hao, B. C Case, M. M. Hingorani, K. R. Weninger, D. A. Erie, Nucl. Acids Res., **46(20)**, 10782–10795 (2018).
- [47] E. L. Elson, E. Fried, J.E. Dolbow, G.M. Genin, , Annu. Rev. Biophys. **39**, 207–226 (2010).
- [48] F. Lu, M. Jin, M. A. Belkin, Nat. Photonics., **8**, 307–312 (2014).
- [49] M. Troccoli, L. Diehl, D.P. Bour, S.W. Corzine, N. Yu, C.Y. Wang, M.A. Belkin, G. Hofler, R. Lewicki, G. Wysocki, F.K. Tittel, F. Capasso, J. Light. Technol., **26**, 3534–3555 (2008).
- [50] F. Lu, M. A. Belkin, Opt. Express. **19**, 19942 (2011).
- [51] V. Giliberti, M. Badioli, A. Nucara, P. Calvani, E. Ritter, L. Puskar, E.F. Aziz, P. Hegemann, U. Schade, M. Ortolani, L. Baldassarre, Small., **13** 1701181, (2017).
- [52] A. Dazzi, C.B. Prater, Q. Hu, D.B. Chase, J.F. Rabolt, C. Marcott, Appl. Spectrosc., **66**, 1365–1384 (2012).
- [53] K. M. Marzec, T. P. Wrobel, A. Rygula, E. Maslak, A. Jaształ, A. Fedorowicz, S. Chlopicki, M. Baranska, J. Biophotonics, **7(9)** 744–756 (2014).
- [54] A. Lattermann, C. Matthaus, N. Bergner, C. Beleites, B. F. Romeike, C. Krafft, B. R. Brehm, J. Popp, J. Biophotonics, **6**, 110–121 (2013).
- [55] P. Weinmann, M. Jouan, N. Q. Dao, B. Lacroix, C. Groiselle, J.-P. Bonte, G. Luc,, Atherosclerosis, **140**, 81–88 (1998).
- [56] K. Czamara, K. Majzner, M. Pilarczyk, K. Kochan, A. Kaczor, M. Baranska, J. Raman Spectrosc., **46**, 4–20 (2014).
- [57] S. Beloribi-Djefafli, S. Vasseur, F. Guillaumond, Oncogenesis **5**, 189 (2016).

Eveline Dipre