

Warszawa, dn. 28.05.2010

Prof. dr hab. Ryszard Stolarski
UNIWERSYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ FIZYKI
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Zakład Biofizyki
ul. Żwirki i Wigury 93
02-89 Warszawa

Tel. 55 40772
Fax: 55 40771
E-mail: stolarsk@biogeo.uw.edu.pl

Prof. dr hab. Paweł Kowalczyk
Zastępca Dyrektora Instytutu Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki UW:

Zgłaszam następujące tematy prac licencjackich dla studentów Studiów Wydziału Fizyki UW na przyszły rok akademicki, w tym dla studentów indywidualnych (w kolejności alfabetycznej opiekunów):

1. „Generacja zespołu struktur białka drkN SH3 z muszki owocowej metodami dynamiki molekularnej”, opiekun: prof. dr hab. Jan Antosiewicz.

Opis: Białko drkN SH3 jest ciekawym obiektem do badań biofizycznych z uwagi na to, że w warunkach fizjologicznych przechodzi odwracalnie między formą natywną i rozwiniętą. Proces przejścia jest wolny w skali czasowej pomiarów spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR), co pozwala oddzielnie "obserwować" obie formy strukturalne. W banku danych PDB dostępne są struktury stanu natywnego. Wygenerowanie realistycznych struktur stanu rozwiniętego pozwoliłoby określić teoretycznie energie rozwijania struktury białka i zbadać ich zależność od takich parametrów jak pH roztworu. Odpowiednie dane doświadczalne, z którymi można porównać wyniki teoretyczne, zostały uzyskane metodami spektroskopii NMR. Projekt polega na zapoznaniu się z programem dynamiki molekularnej CHARMM lub GROMACS, na opracowaniu odpowiedniego „inputu”, pozwalającego na uzyskanie zespołu struktur rozwiniętych i na przeprowadzeniu symulacji.

2. „Badanie oddziaływań międzycząsteczkowych w roztworach metodami fotolizy błyskowej”, opiekun: prof. dr hab. Jan Antosiewicz.

Opis: Fotoliza błyskowa jest metodą relaksacyjną, w której badany układ wyprowadza się ze stanu równowagi działając na niego intensywnym impulsem światła, a następnie, wykorzystując pomiar absorpcji roztworu w wybranej długości promieniowania, obserwuje się powrót układu do stanu równowagi i wnioskuje o zachodzących w układzie procesach molekularnych (ich mechanizmach i szybkości). Możliwe są różne warianty wykonania pracy. Dwa następujące przykłady ilustrują istniejące możliwości.

a) badanie kinetyki zderzeń cząsteczek ksantonu i naftalenu w różnych rozpuszczalnikach. Cząsteczka ksantonu po wzbudzeniu impulsem lasera (promieniowanie o długości 355 nm) w ciągu ok. 1 ps przechodzi w długo-żyjący (rzędu 30 μ s) stan trypletowy. Obecność stanu trypletowego przejawia się pasmem absorpcji w 490 nm. Zderzenia z cząsteczką naftalenu przyspieszają dezaktywację ksantonu. W zderzeniu ksanton przekazuje energię naftaleniowi, który przechodzi w stan zbudzony trypletowy (widoczny jako pojawiająca się absorpcja przy 420 nm). W oparciu o analizę przyspieszenia dezaktywacji ksantonu wyznaczamy stałe szybkości asocjacji ksanton-naftalen (w sensie słynnego równania Smoluchowskiego).;

b) Istnieją cząsteczki, które pod wpływem impulsu światła 355 nm uwalniają do roztworu jony wodoru i zakwaszają środowisko (tzw. klatkowane protony). Zakwaszenie następuje w ciągu kilku-kilkunastu nanosekund (czas trwania impulsu lasera to 4 ns). Zakwaszenie roztworu może skutkować wywołaniem różnych procesów molekularnych, np. zmianami konformacyjnymi w białkach, które można śledzić poprzez pomiar absorpcji światła przy odpowiednio dobranej długości. Na przykład białko bren fluorescent protein można obserwować poprzez absorpcję w 490 nm. Pomiar absorpcji informuje nas o kinetyce zmian konformacyjnych białka w odpowiedzi na skok pH.

3. „Fluorescencyjne pomiary oddziaływań z ligandami mutantów białek z rodziny PNP (fosforylasy nukleozydów purynowych) - ważnych enzymów targetowych w terapii chorób nowotworowych i chorób układu immunologicznego”, opiekun: dr hab. Maria Agnieszka Bzowska.

Opis: Fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP) to kluczowe enzymy metabolizmu składników kwasów nukleinowych. PNP znajduje się praktycznie w każdej żywej komórce. Fosforylasy izolowane z różnych źródeł oraz silne selektywne inhibitory fosforylaz z tkanek ludzkich czy organizmów chorobotwórczych mają potencjalne ogromne znaczenie praktyczne, głównie w medycynie, np. jako leki immunosupresyjne czy przeciwpasożytnicze, a także – mniej specyficzne fosforylasy z niektórych bakterii - w chemii nukleozydów purynowych. Głównym celem projektu realizowanego przez naszą grupę jest poznanie biofizycznych podstaw działania fosforylaz, co ma m.in. prowadzić do syntezy serii silnych inhibitorów PNP o potencjalnych praktycznych zastosowaniach. W projekcie stosujemy interdyscyplinarne podejście do badań fosforylaz: od inżynierii genetycznej pozwalającej na uzyskanie dużych ilości modelowej fosforylasy i jej mutantów, poprzez różnorodne biofizyczne metody eksperymentalne, takie jak pomiary zaniku fluorescencji i fluorescencji stacjonarnej, spektroskopia zatrzymanego przepływu, dyfrakcja promieniowania X na kryształach białka, jak i komputerowe modelowanie w celu zaprojektowania inhibitorów o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym. Osobie zainteresowanej wykonaniem pracy licencjackiej w ramach projektu proponujemy zbadanie oddziaływania jednego z mutantów białka z wybranym ligandem przy wykorzystaniu fluorescencyjnej metody detekcji powstającego kompleksu.

4. „Od biofizycznych badań czynników determinujących selektywne i silne wiązanie się inhibitorów z enzymami do skuteczniejszych leków”, opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk.

Opis: Absorpcja fotonów przez cząsteczki biologiczne (np., białka) powoduje przejście tych cząsteczek ze stanu podstawowego do wzbudzonego, natomiast przejście odwrotne jest realizowane poprzez emisję fotonów zwaną fluorescencją. Absorpcja i emisja zależą od własności białka i jego oddziaływania z innymi cząsteczkami i środowiskiem, zarówno w stanie podstawowym jak i wzbudzonym. W pracy licencjackiej wykorzystane będą właściwości emisyjne białek (enzymów) w charakterystyce ich oddziaływań z ligandami (substratami, inhibitorami) oraz identyfikacji preferowanych struktur ligandów, ich form konformacyjnych i jonowych, które uczestniczą w powstawaniu stabilnych kompleksów enzym-ligand, katalizie enzymatycznej lub hamowaniu (inhibicji) reakcji enzymatycznej. Projekt pracy licencjackiej przewiduje wprowadzenie do metodologii pracy z białkami i zapoznanie się z nowoczesnymi technikami spektroskopowymi. Celem pracy licencjackiej jest identyfikacja czynników fizycznych (strukturalnych, konformacyjnych, dysocjacji i asocjacji protonów) decydujących o selektywnym rozpoznawaniu i silnym wiązaniu ligandów. Wyniki będą mogły być wykorzystane w projektowaniu inhibitorów (leków) o selektywnych właściwościach terapeutycznych wobec enzymów izolowanych z pasożytów (np. nicieni) i mikroorganizmów chorobotwórczych (bakterii, wirusów), na podstawie różnic między enzymami ludzkimi i ich odpowiednikami w mikroorganizmach chorobotwórczych. Zbadanie tych różnic strukturalnych i kinetycznych między enzymami ludzkimi, zwierzęcymi i z mikroorganizmów (bakterii, wirusów) przyczyni się także do lepszego zrozumienia mechanizmu reakcji katalitycznej. Ponadto różnice między enzymami ludzkimi i z mikroorganizmów mogłyby być wykorzystane do ulepszenia metod stosowanych w terapii genowej nowotworów za pomocą wszczepienia do tkanki nowotworowej mniej specyficznego „samobójczego” genu enzymu z mikroorganizmu. Enzym będący produktem tego genu mógłby aktywować nietoksyczny analog substratu do toksycznego produktu tylko w komórkach nowotworowych, podczas gdy zarówno substrat jak i produkt byłyby nieaktywne wobec enzymów ludzkich, tj. tkanek zdrowych.

5. „Zastosowanie spektroskopii emisyjnej w badaniach właściwości fizycznych cząsteczek biologicznych”, opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk.

Opis: Absorpcja fotonów przez cząsteczki biologiczne (np., białka, barwniki roślinne) powoduje przejście tych cząsteczek ze stanu podstawowego do wzbudzonego, natomiast przejście odwrotne jest realizowane poprzez emisję fotonów zwaną fluorescencją. Absorpcja i emisja zależą od właściwości fizycznych badanej cząsteczki i jej oddziaływania z innymi cząsteczkami (otoczeniem), zarówno w stanie podstawowym jak i wzbudzonym. Wybór spektroskopii emisyjnej jako podstawowego narzędzia badawczego wynika m.in. z następujących obserwacji. Po pierwsze, chociaż metody spektroskopii emisyjnej stanów elektronowych cząsteczek biologicznych i ich kompleksów nie udzielają tak precyzyjnej informacji o strukturze jak krystalografia lub spektroskopia wielowymiarowego

magnetycznego rezonansu magnetycznego (NMR), to można je uznać za komplementarne, a nawet posiadające większe możliwości. Dostarczają informacji o strukturze, oddziaływaniach i dynamice układów cząsteczkowych w roztworze, tj. w warunkach zbliżonych do takich jakie są w żywych komórkach i tkankach. W przypadku białek (enzymów) możemy to sprawdzić m.in. na podstawie pomiaru ich aktywności katalitycznej wobec typowych ligandów (substratów, inhibitorów) oraz na podstawie wpływu oddziaływania białek z ligandami na emisję znaczników emisyjnych przyczepionych kowalencyjnie do białek i ligandów. Projekt pracy licencjackiej przewiduje wprowadzenie do metodologii pracy z chloroplastami roślin i zapoznanie się z nowoczesnymi technikami spektroskopowymi. Celem pracy licencjackiej jest zwiększenie rozdzielczości przestrzennej i czułości tych metod poprzez zastosowanie laserowej fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej, gdzie wykorzystuje się wygaszanie stanów wzbudzonych za pomocą emisji stymulowanej (*Stimulated Emission Depletion, STED*) trójwymiarowego obrazowania struktury chloroplastów roślinnych za pomocą przestrzennego rozkładu czasów życia chlorofilu w stanie wzbudzonym (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM*). Badania te mogą być rozszerzone o badania dyfuzji cząsteczek biologicznych, np. białek i ich kompleksów z ligandami za pomocą fluorescencyjnej spektroskopii korelacyjnej (*Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS*).

6. „Fizyczna interpretacja zaniku fluorescencji cząsteczek biologicznych”, opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk

Opis: Celem pracy licencjackiej (doświadczalno-teoretycznej) jest sformułowanie modelu opisującego kinetykę dezaktywacji elektronowych stanów wzbudzonych cząsteczek w układach biologicznych na skutek emisji fotonów (fluorescencji). Układy te wykazują złożone relaksacje, będące wynikiem oddziaływania wzbudzonych cząsteczek z otoczeniem i transferu energii wzbudzenia do stanów elektronowych innych cząsteczek. Rozważeniu poddane zostaną układy z przeniesieniem energii wzbudzenia. W dotychczasowych badaniach pokazaliśmy, że czasowo zależna szybkość migracji energii, której zaproponowana postać zgodna jest z doświadczeniem, prowadzi do potęgowej członu w funkcji zaniku. Ten z kolei jest jeszcze jedną manifestacją q -eksponencjalnej funkcji Tsallisa. Dodatkowo implikuje czasową hierarchiczność w procesach migracji energii będącą wynikiem hierarchicznej struktury poziomów energetycznych. We współpracy z grupą naukową dr hab. A. Sobolewskiego (Instytut Fizyki PAN, Warszawa) oraz prof. B. Lesynga (Zakład Biofizyki IFD UW) wyznaczone będą zależności energii wewnętrznej od konformacji i oddziaływań badanych cząsteczek zarówno w stanie podstawowym jak i w stanie wzbudzonym. Projekt pracy licencjackiej przewiduje wprowadzenie do nowoczesnej metodologii spektroskopowej i zapoznanie się z nowoczesnymi metodami teoretycznymi. Celem pracy licencjackiej będzie interpretacja wyników doświadczalnych dotyczących dezaktywacji stanów wzbudzonych w białkach i ich kompleksach z ligandami. Spodziewamy się, że połączenie badań doświadczalnych i teoretycznych doprowadzi do odkrycia dróg migracji energii wzbudzenia. Wstępne badania pokazały, że funkcja potęgowa w prosty sposób opisuje zaniki stanów wzbudzonych i może stanowić dobrą alternatywę dla modeli wielo-wykładniczych, gdzie

wzrost liczby składników wykładniczych bardzo często poprawia dopasowanie, ale interpretacja fizyczna poszczególnych komponentów wykładniczych jest niejasna. Ponadto, w przypadku układów, gdzie występują zjawiska migracji energii wzbudzenia, opis wielowykładniczy zawodzi. Zastosowanie proponowanych modeli dostarczyłoby nowych informacji fizycznych o badanym układzie, takich jak liczba dróg dezaktywacji i średni czas dezaktywacji oraz pozwoliłoby traktować zaniki fluorescencji w skomplikowanych (heterogennych) układach biologicznych w ujęciu statystycznym

7. „Badania Właściwości emisyjne białek i ich wykorzystanie w charakterystyce oddziaływań z ligandami”, opiekun: dr hab. Borys Kierdaszuk.

Opis: Wysoki stopień skomplikowania białek (enzymów) oraz niski poziom wiedzy (bio)fizycznej o podstawowych oddziaływaniach fizycznych (np. wewnątrz- i międzycząsteczkowych oddziaływaniach elektrostatycznych) jest najczęstszym źródłem wielu konkurencyjnych i wzajemnie wykluczających się modeli rozpoznawania się enzymów i ligandów (substratów, inhibitorów) jak również nieściśłych i sprzecznych modeli reakcji enzymatycznych. Praca licencjacka dotyczy określenia wymagań strukturalnych wybranego enzymu i sformułowania na tej podstawie modelu mechanizmu reakcji enzymatycznych katalizowanych przez wybrany enzym na bazie precyzyjnych informacji o strukturze i własnościach fizycznych enzymu, ligandów i asocjacji enzym-ligand, ze szczególnym uwzględnieniem wzajemnego wpływu enzymu na ligand(y) i *vice versa*. Podjęte będą także próby uogólnienia obserwacji na wszystkie enzymy danej klasy. Projekt pracy licencjackiej przewiduje wprowadzenie do metodologii pracy z cząsteczkami biologicznymi (białkami) i zapoznanie się z nowoczesnymi technikami spektroskopowymi. W badaniach tych uwzględnione będą następujące zjawiska fizyczne i ich ewentualny wpływ na emisję (fluorescencję) cząsteczek i ich kompleksów:

- (a) Kinetyka rozpoznawania się (asocjacji) enzymów z ligandami na podstawie wpływu zmieszania składników kompleksu na ich fluorescencję;
- (b) Wpływ oddziaływań na delokalizację gęstości elektronowej, przyłączenie protonu (protonację) i odłączenie protonu (dysocjację) oraz przeniesienie protonu wewnątrz cząsteczek (tautomerię);
- (c) Oddziaływania elektrostatyczne, np. typu wiązań wodorowych;
- (d) Bezpromienne (rezonansowe) przeniesienie energii wzbudzenia w wyniku oddziaływania dipol-dipol między donorem w stanie wzbudzonym i akceptorem w stanie podstawowym.

8. „Białka uczestniczące w procesie inicjacji translacji jako potencjalne „cele” w terapii nowotworów”, opiekun: dr Anna Modrak-Wójcik.

Opis: Inicjacja translacji w komórkach eukariotycznych jest wieloetapowym procesem tworzenia kompleksów wielu białek i RNA i determinuje wypadkową szybkość biosyntezy białek. Regulacja tego procesu ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego wzrostu i podziału komórki, a jego „rozregulowanie” wiąże się ściśle z kancerogenezą. Szczególną rolę odgrywa

białkowy czynnik translacyjny eIF4E – badania wskazują na obecność nienormalnie wysokiego poziomu tego białka w ludzkich komórkach nowotworowych. Praca licencjacka stanowiłaby przegląd literaturowy przedstawiający obecny stan wiedzy dotyczący zagadnienia biofizycznych podstaw specyficznych oddziaływań eIF4E z końcami 5' kwasu rybonukleinowego tzw. kapem. Przewidziane jest również zapoznanie się ze stroną eksperymentalną badania tych oddziaływań techniką spektrofluorometryczną.

9. „Spektroskopia NMR w wyjaśnianiu struktur cząsteczek”, opiekun: prof. dr hab. Ryszard Stolarski.

Opis: Odkryte w połowie ubiegłego wieku zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) znalazło niezwykle szerokie zastosowania: od fizyki ciała stałego, poprzez chemię, biochemię, biofizykę i biologię molekularną, do diagnostyki medycznej (MRI, magnetic resonance imaging). Prowadzone są również prace nad jego wykorzystaniem w budowie komputerów kwantowych. Za badania z wykorzystaniem techniki NMR przyznano już cztery nagrody Nobla: w dziedzinie fizyki za odkrycie zjawiska, dwie w dziedzinie chemii za rozwój podstaw teoretycznych spektroskopii NMR i jej zastosowania w wyznaczaniu struktur przestrzennych białek i kwasów nukleinowych oraz w dziedzinie fizjologii i medycyny za nieinwazyjne obrazowanie narządów, tkanek (MRI) i czynności mózgu (fMRI). Spektroskopia NMR umożliwia badania cząsteczek organicznych, od najprostszych do złożonych biopolimerów takich jak białka i kwasy nukleinowe oraz błony biologiczne, nie tylko w próbówce (*in vitro*), ale także w żywych komórkach i tkankach. Obok dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na kryształach molekularnych jest to druga dostępna aktualnie metoda wyznaczania struktur przestrzennych dużych biomolekuł (białka, kwasy nukleinowe) z rozdzielczością atomową, tzn. z dokładnością do położenia poszczególnych zrębów atomowych cząsteczki. Praca licencjacka dotyczyć będzie zastosowań spektroskopii NMR do określania struktury chemicznej i przestrzennej cząsteczek organicznych oraz do badania oddziaływań między cząsteczkami. W ramach części doświadczałnej przewidziane jest samodzielne wykonanie widm NMR w celu rozwiązania jednego z z tych problemów .

10. „Optymalizacja warunków fałdowania wybranego mutanta zielono fluoryzującego białka”, opiekun: dr Beata Wielgus-Kutrowska.

Opis: Zielono białko fluoryzujące (ang. *green fluorescent protein, GFP*) jest małym białkiem (238 aminokwasów) pochodzącym z meduzy *Aequorea victoria*. W 2008 roku za jego odkrycie, badania właściwości i zastosowania została przyznana Nagroda Nobla w dziedzinie chemii. Ze względu na intensywną fluorescencję w zakresie widzialnym chromofora zawartego w GFP jest ono powszechnie używane w naukach medycznych, biologicznych i biotechnologii jako znacznik ekspresji genów, lokalizacji innych białek i jako wskaźnik oddziaływania białko-białko. GFP jest skłonne do nieprawidłowego zwijania i agregacji. Zagregowane GFP jest bezużyteczne jako marker, dlatego poszukiwane są mutanty o zwiększonej wydajności prawidłowego zwijania. Przedmiotem pracy będzie eksperymentalne poszukiwanie warunków w których fałdowanie wybranego mutanta GFP (przyjmowanie

struktury aktywnej biologicznie) będzie przebiegało z najwyższą wydajnością. Sprawdzimy warunki takie jak stężenie białka, temperatura fałdowania, skład chemiczny roztworu reakcyjnego. Metodami spektroskopowymi ocenimy wydajność fałdowania.

11. „Modele fałdowania białek”, opiekun: dr Beata Wielgus-Kutrowska..

Opis: Aby białka mogły prawidłowo pełnić swoją biologiczną rolę muszą zwinąć się do zwykle jedynej aktywnej biologicznie struktury. Zgodnie z paradoksem Levinthala: „Jeśli założymy, że każda reszta aminokwasowa może przybierać tylko dwie różne konformacje przestrzenne to dla niewielkiego białka o długości 100 aminokwasów, całkowita ilość struktur jakie może przyjąć wynosi 2^{100} , a czas potrzebny na ustalenie optymalnej struktury (przy założeniu, że przekształcenie jednej struktury w drugą zachodzi w czasie 10^{-12} s) jest dłuższy niż wiek wszechświata”. Tymczasem przyjęcie przez białko struktury aktywnej biologicznie następuje w ułamkach sekund. Na pytanie dlaczego tak się dzieje poszukują odpowiedzi specjaliści różnych dziedzin nauki opisując różne modele zwijania. Praca będzie polegała na przeglądzie literatury dotyczącej problemu przyjmowania przez białka struktury aktywnej biologicznie i opisanie dostępnych modeli fałdowania białek

Z poważaniem
Ryszard Stolarski