

Tematy prac magisterskich w r. akad. 2012/2013 dla studentów specjalności

(A) „Biofizyka” na kierunku „Fizyka”

oraz

„Biofizyka molekularna” na kierunku „Zastosowanie fizyki w biologii i medycynie”

1. „Badania właściwości emisyjnych białek i ich wykorzystanie w charakterystyce oddziaływania z ligandami”

opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk, 55 40 784, borys@biogeo.uw.edu.pl

Wysoki stopień skomplikowania białek (enzymów) oraz niski poziom wiedzy o podstawowych oddziaływaniach fizycznych (np. wewnątrz- i między-cząsteczkowych oddziaływaniach elektrostatycznych) jest najczęstszym źródłem wielu konkurencyjnych i wzajemnie wykluczających się modeli rozpoznawania się enzymów i ligandów (substratów, inhibitorów) jak również nieścisłych i sprzecznych modeli reakcji enzymatycznych. Praca magisterska dotyczy określenia wymagań wybranego enzymu i sformułowania na tej podstawie modelu mechanizmu reakcji enzymatycznej katalizowanej przez wybrany enzym na bazie precyzyjnych informacji o strukturze i własnościach fizycznych enzymu, ligandów i asocjatów enzym-ligand, ze szczególnym uwzględnieniem wzajemnego wpływu enzymu na ligand(y) i vice versa. Planowane jest wykorzystanie szeregu mutantów tego enzymu w celu ustalenia wpływu struktury miejsca aktywnego na jego powinowactwo do ligandów. Podjęte będą także próby uogólnienia obserwacji na wszystkie enzymy danej klasy. Projekt pracy magisterskiej przewiduje wprowadzenie do metodologii pracy z cząsteczkami biologicznymi (białkami) i zapoznanie się z nowoczesnymi technikami fluorescencyjnymi stanu ustalonego oraz wysokiej rozdzielczości czasowej (impulsowymi i modulacyjnymi). 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. Porównanie selektywności substratowo-inhibitorowej z różnicami strukturalnymi i kinetycznymi między enzymami ludzkimi, zwierzęcymi i z mikroorganizmów (bakterii, wirusów) przyczyni się także do lepszego zrozumienia mechanizmu reakcji katalitycznych.

2. „Zastosowanie zwiększonej rozdzielczości czasowej i przestrzennej laserowej fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej w badaniach kompleksów enzym - ligand znakowanych sondami fluorescencyjnymi

opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk, 55 40 784, borys@biogeo.uw.edu.pl

Celem pracy magisterskiej jest wykorzystanie zwiększonej rozdzielczości przestrzennej i czułości metod fluorescencyjnych poprzez zastosowanie laserowej fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej, gdzie aby podwyższyć rozdzielczość przestrzenną i czasową wykorzystuje się wygaszanie stanów wzbudzonych za pomocą emisji stymulowanej (*Stimulated Emission Depletion*, STED) trójwymiarowego obrazowania struktury za pomocą przestrzennego rozkładu czasów życia stanów wzbudzonych (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*, FLIM). Badania te mogą być rozszerzone o badania dyfuzji cząsteczek i

makrocząsteczek biologicznych, np. białek i ich kompleksów z ligandami *in vitro* oraz *in vivo* w za pomocą fluorescencyjnej spektroskopii korelacyjnej (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*, FCS). 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) Bezpromieniste (rezonansowe) przeniesienie energii wzbudzenia w wyniku oddziaływania dipol-dipol między donorem w stanie wzbudzonym i akceptorem w stanie podstawowym.
- (e) Śledzenie dyfuzji, liczby cząsteczek ich masy cząsteczkowej oraz asocjacji.

3. „Oddziaływania białko-ligand i białko-białko w procesie inicjacji translacji - badania biofizyczne”

opiekun: dr Anna Modrak-Wójcik, 55 40 779, ankam@biogeo.uw.edu.pl

Inicjacja translacji w komórkach eukariotycznych jest wieloetapowym procesem tworzenia kompleksów wielu białek oraz 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, który inicjuje translację poprzez utworzenie kompleksu z charakterystyczną strukturą na 5'-końcu mRNA (kapem), a jego podwyższone stężenie występuje w wielu rodzajach komórek nowotworowych. Zahamowanie aktywności eIF4E może stać się skuteczną strategią w walce z nowotworami. Istotne jest więc poznanie mechanizmu oddziaływania białka eIF4E z kapem i innymi białkowymi czynnikami translacyjnymi na poziomie molekularnym. Praca będzie dotyczyła pomiarów stabilności tworzenia kompleksów eIF4E z wybranymi analogami kapu i/lub wybranym białkowym czynnikiem translacyjnym. W zależności od wariantu badania będą polegały na wyznaczaniu równowagowych stałych wiązania i parametrów termodynamicznych asocjacji przy użyciu stacjonarnej spektroskopii emisyjnej lub ultrawioletowego analizatora.

4. „Badanie specyficzności substratowej enzymu DcpS bez etykiety powinowactwa”

opiekun: dr Maciej Łukaszewicz, 55 40 781, mlukas@biogeo.uw.edu.pl

Cechą charakterystyczną eukariotycznych mRNA jest struktura kapu, obecna na końcu 5' cząsteczki (7-metyloguanosyna przyłączona do pierwszego transkrybowanego nukleotydu mostkiem trifosforanowym, m⁷GpppN). Usunięcie struktury kapu jest jednym z kluczowych etapów regulujących stabilność mRNA w komórce. Głównymi enzymami hydrolizującymi strukturę kapu są DcpS i Dcp2. Enzym DcpS hydrolizuje dinukleotydowy kap powstały w wyniku degradacji mRNA w kierunku 3'→5'. Ludzki enzym DcpS jest również potencjalnym celem terapeutycznym w rdzeniowym zaniku mięśni (*spinal muscular atrophy*, SMA). Dotychczasowe badania wykorzystywały formę enzymu z dołączoną etykietą powinowactwa, która ułatwiała jego oczyszczanie. Nie został jednak określony wpływ danej etykiety

powinowactwa na właściwości enzymu. Celem pracy jest uzyskanie enzymu DcpS bez sekwencji etykiety powinowactwa oraz badanie specyficzności substratowej takiego enzymu (metody: spektroskopia fluorescencyjna, HPLC). Podjęta zostanie również próba krystalizacji badanego enzymu.

5. „Charakterystyka wybranego enzymu z rodziny *Nudix* hydrolizującego strukturę kapu”

opiekun: dr Maciej Łukaszewicz, 55 40 781, mlukas@biogeo.uw.edu.pl

Usunięcie struktury kapu (7-metyloguanozyny przyłączonej do pierwszego transkrybowanego nukleotydu mostkiem trifosforanowym, m⁷GpppN) jest jednym z kluczowych etapów regulujących stabilność mRNA w komórce. Jednym z enzymów hydrolizujących strukturę kapu jest Dcp2 – fosfohydrolaza z rodziny *Nudix* (**N**ucleoside **D**iphosphate linked to **X**). Dcp2 hydrolizuje kap przyłączony do długich łańcuchów mRNA zawierających powyżej 25 nukleotydów (odcina m⁷Gpp) i tym samym inicjuje degradację w kierunku 5'→3'.

Ostatnio opisano nowy enzym - hNUDT16 - zaangażowany w hydrolizę kapu na końcu 5'mRNA. Podobnie jak Dcp2 należy on do rodziny białek *Nudix* i odcina kap obecny na mRNA. W odróżnieniu od Dcp2 występuje w komórkach wszystkich analizowanych tkanek, wykazuje lokalizację cytoplazmatyczno-jądrową oraz hydrolizuje hipermetylowany kap (TMG, m^{2,2,7}GpppG) występujący na małych jądrowych RNA (snoRNA).

Praca będzie dotyczyła m.in. analizy specyficzności substratowej enzymu *nudix* (pod kątem długości dekapowanych RNA), wpływie na translację w układzie *in vitro*, oraz poszukiwaniu potencjalnych białek oddziałujących z Nudt. Podjęta zostanie również próba krystalizacji badanego enzymu.

6. „Modyfikowane analogi struktury kapu 5'-końca mRNA jako potencjalne inhibitory kap-zależnej translacji i czynniki modulujące właściwości translacyjne transkryptów mRNA - badania w układach translacji *in vitro*.”

opiekun: dr Maciej Łukaszewicz, 55 40 781, mlukas@biogeo.uw.edu.pl

Modyfikowane analogi struktury kapu 5'-końca mRNA są badane pod kątem zastosowań terapeutycznych: jako inhibitory białka eIF4E nadprodukowanego w niektórych typach nowotworów, i jako element struktury mRNA terapeutycznego poprawiający jego stabilność w warunkach komórkowych i właściwości translacyjne. Praca będzie dotyczyła charakterystyki nowych serii modyfikowanych analogów kapu, m.in.: analizy ich właściwości inhibitorowych w układzie translacji *in vitro*, analizy oporności na enzymy dekapujące, syntezy kapowanych mRNA i badań ich właściwości biofizycznych oraz wpływie na poziom translacji w układzie *in vitro*.

7. „Badanie oddziaływań białka DcpS z analogami kapu”

opiekun: prof. dr hab. Edward Darzynkiewicz, 55 40 787, edek@biogeo.uw.edu.pl

Białka DcpS (scavenger decapping enzymes) to kluczowe enzymy metabolizmu mRNA. Najlepiej dotychczas poznaną ich funkcją jest usuwanie z komórek końcowych produktów jednego z głównych szlaków degradacji mRNA (w kierunku 3'→5'). Enzymy DcpS katalizują reakcje hydrolizy dinukleotydów oraz krótkich oligonukleotydów zakończonych strukturą monometylo- i trimetylokapu. Rola tych białek staje się w ostatnich latach przedmiotem coraz większego zainteresowania, ze względu na odkryte niedawno ich funkcje regulatorowe w warunkach stresu komórkowego i splicingu oraz znaczenie w terapii rdzeniowego zaniku mięśni. Specyficzność substratowa enzymów DcpS pochodzących z komórek człowieka, nicieni oraz drożdży różni się znacznie w zależności od długości łańcucha nukleotydowego analogu kapu, długości mostka fosforanowego oraz modyfikacji w obrębie poszczególnych elementów struktury kapu (zasad nukleinowych, pierścieni cukrowych oraz mostka fosforanowego). Niezwykle istotne dla poznania różnorodnych funkcji komórkowych białek DcpS jest badanie oddziaływań z modyfikowanymi analogami kapu. Zastosowanie zróżnicowanych ligandów pozwala określić wymagania strukturalne niezbędne dla efektywnego wiązania jak również do głębszego zrozumienia mechanizmu katalizy na poziomie molekularnym. Osoba zainteresowana tematem będzie miała za zadanie ustalenie optymalnych warunków wiązania analogów kapu przez wybrane białko DcpS oraz zbadanie jego powinowactwa do serii modyfikowanych ligandów metodą miareczkowania fluorescencyjnego.

8. „Wpływ modyfikacji nukleozydów na kinetykę enzymatycznej hydrolizy analogów kapu katalizowanej przez białko DcpS”

opiekun: prof. dr hab. Edward Darzynkiewicz, 55 40 787, edek@biogeo.uw.edu.pl

Białka DcpS należą do hydrolaz z rodziny HIT, o wysokiej specyficzności wobec dinukleotydowych analogów kapu. W warunkach komórkowych enzymy te biorą udział w końcowym etapie jednego z głównych szlaków degradacji mRNA, w kierunku 3'→5' z udziałem kompleksu nukleaz nazywanego egzosomem. Substratami DcpS są dinukleotydowe analogi kapu oraz dłuższe fragmenty zawierające do 10 nukleotydów. Centrum wiążące zawiera ewolucyjnie zachowany motyw HIT, który stanowią 3 reszty histydynowe. Dwie histydyny biorą udział w wiązaniu grup fosforanowych cząsteczki substratu, natomiast trzecia histydyna pełni rolę czynnika nukleofilowego w procesie katalizy. Reakcja hydrolizy katalizowana przez enzymy DcpS polega na przecięciu wiązania pirofosforanowego w mostku fosforanowym kapu, zgodnie z równaniem: $m^7GpppN \rightarrow m^7GMP + ppN$. Warunkiem efektywnej hydrolizy jest dodatni ładunek w pierścieniu 7-metyloguaniny decydujący o rozpoznaniu cząsteczki substratu oraz przynajmniej 3 grupy fosforanowych w mostku. Obecność drugiego nukleozydu nie jest konieczna do przebiegu hydrolizy, ale znacznie przyspiesza jej przebieg. Celem pracy magisterskiej będzie określenie roli drugiego nukleozydu w procesie hydrolizy analogów kapu katalizowanej przez białko DcpS, poprzez badanie substratów zawierających modyfikacje w obrębie drugiego nukleozydu oraz wprowadzenie mutacji w białku powodującej osłabienie wiązanie drugiego nukleozydu.

9. „Spektroskopowe pomiary właściwości kinetycznych i inhibitorowych oraz oddziaływań z ligandami wybranego mutantu fosforylasy nukleozydów purynowych z *E. coli*”

opiekun: dr hab. Maria Agnieszka Bzowska, 55 40789, abzowska@biogeo.uw.edu.pl

Fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP) to kluczowe dla metabolizmu składników kwasów nukleinowych enzymy znajdujące 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. W ramach pracy magisterskiej zostaną scharakteryzowane właściwości kinetyczne i podatność na inhibicję jednego z mutantów heksamerycznej fosforylasy nukleozydów purynowych z *E. coli* (przy użyciu spektroskopowego oznaczania szybkości katalizowanej reakcji) oraz wyznaczenie stałe oddziaływania i stechiometria wiązania białka z wybranymi ligandami, substratami i inhibitorami (przy wykorzystaniu fluorescencyjnej metody detekcji powstającego kompleksu lub izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego).

(B) “Projektowanie molekularne i bioinformatyka” na kierunku “Zastosowanie fizyki w biologii i medycynie”

(na razie brak tematów)