

**TEMATY PRAC LICENCJACKICH DLA STUDENTÓW SPECJALNOŚCI “BIOFIZYKA MOLEKULARNA”
KIERUNKU “ZASTOSOWANIE FIZYKI W BIOLOGII I MEDYCYNIE” PROPONOWANE W ROKU
AKADEMICKIM 2011/2012**

**1. “Badanie oddziaływań białko-ligand na podstawie wygaszania fluorescencji”
opiekun dr Elżbieta Bojarska, 55 40 779, elab@biogeo.uw.edu.pl**

Właściwości fluorescencyjne białek są wynikiem obecności w łańcuchach polipeptydowych trzech aminokwasów: tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny. Fluorescencja białek zależy od ich struktury, warunków środowiska oraz oddziaływań z innymi cząsteczkami. Wygaszanie fluorescencji jest bardzo często obserwowane podczas tworzenia kompleksów białko-ligand. Efekt ten jest wykorzystywany do wyznaczania stałych wiązania, identyfikacji struktur ligandów tworzących stabilne kompleksy z białkami, określania zmian konformacyjnych białek w wyniku tworzenia kompleksów. Celem pracy licencjackiej będzie badanie dynamicznego i statycznego mechanizmu wygaszania fluorescencji dla wybranego białka (jednego z enzymów DcpS). Zastosowane w badaniach zróżnicowane ligandy pozwolą określić najistotniejsze wymagania strukturalne dla efektywnego wiązania z białkiem DcpS jak również do głębszego zrozumienia mechanizmu rozpoznawania substratów przez ten enzym.

**2. “Badanie procesu enzymatycznej hydrolizy katalizowanej przez białko DcpS z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”
opiekun prof. dr hab. Edward Darżynkiewicz, 55 40 787, edek@biogeo.uw.edu.pl**

Białka DcpS (scavenger decapping enzymes) to kluczowe enzymy metabolizmu mRNA. Podstawową i najlepiej dotychczas poznaną ich funkcją jest usuwanie z komórek końcowych produktów jednego z głównych szlaków degradacji mRNA (w kierunku $3' \rightarrow 5'$). Enzymy DcpS katalizują reakcje hydrolizy dinukleotydów oraz krótkich oligonukleotydów zakończonych strukturą monometylo- i trimetylokapu. Rola enzymów hydrolizujących kap staje się w ostatnich latach przedmiotem coraz większego zainteresowania, ze względu na odkryte niedawno ich funkcje regulatorowe w warunkach stresu komórkowego i splicingu. Dotychczasowe badania biofizyczne dotyczyły głównie enzymu z komórek ludzkich oraz nicieni. Obiektem badawczym w ramach proponowanej pracy licencjackiej będzie białko DcpS pochodzące z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Dcs1). Jego struktura różni się od struktury określonej dla białek wyższych organizmów, a właściwości katalityczne sprawdzono dla nielicznych związków. Osoba zainteresowana tematem będzie miała za zadanie ustalenie optymalnych warunków hydrolizy katalizowanej przez Dcs1 (temperatura, pH, rodzaj buforu, wpływ jonów metali) oraz przetestowanie właściwości substratowych wybranych dinukleotydowych analogów kapu, wykorzystując fluorescencyjną i chromatograficzną metodę śledzenia procesu hydrolizy. Wyznaczone parametry kinetyczne reakcji pozwolą scharakteryzować właściwości katalityczne badanego enzymu i określić różnice w specyficzności białek DcpS pochodzących z różnych organizmów.

**3. “Wykorzystanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach struktur cząsteczek”
opiekun: prof. dr hab. Ryszard Stolarski, 55 40772, stolarsk@biogeo.uw.edu.pl**

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). Spektroskopia NMR umożliwia badania cząsteczek organicznych, od najprostszych do złożonych biopolimerów takich jak białka i kwasy nukleinowe oraz błony biologiczne, nie tylko *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, zarówno w roztworze jak i coraz częściej w ciele stałym. Praca licencjacka dotyczyć będzie zastosowań spektroskopii NMR do określania struktury chemicznej i przestrzennej cząsteczek organicznych. Może mieć charakter literaturowy lub zawierać część doświadczalną, w której przewidziane jest samodzielne wykonanie widm NMR w celu rozwiązania wybranego problemu strukturalnego.

4. “Naśladowanie reakcji enzymatycznych metodami chemicznymi”

opiekun: dr hab. Janusz Stępiński, 55 40 769, jastep@biogeo.uw.edu.pl

Praca jest eksperymentalna, w opisie wymaga wstępu teoretycznego i omówienia uzyskanych wyników. Przedmiotem badań ma być chemiczna synteza GDP (5'-difosforanu guanozyny) z GMP (5'-monofosforanu guanozyny). W żywych komórkach analogiczna reakcja przebiega z udziałem kinaz monofosforanów nukleozydów. Główną metodą badawczą części eksperymentalnej pracy będzie analiza przebiegu reakcji za pomocą HPLC (wysokociśnieniowej chromatografii cieczerwowej).

5. “Spektroskopowe 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, 55 40789, abzowska@biogeo.uw.edu.pl

Fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP) to enzymy znajdujące się praktycznie w każdej żywej komórce i kluczowe dla metabolizmu składników kwasów nukleinowych. 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 silnych inhibitorów PNP o potencjalnych praktycznych zastosowaniach. Osobie zainteresowanej wykonaniem pracy licencjackiej proponujemy albo zbadanie właściwości jednego otrzymanych właśnie mutantów białka, t.j. jego aktywności, stabilności i podatności na hamowanie typowymi inhibitorami, przy użyciu spektroskopowego oznaczania szybkości katalizowanej reakcji lub też zbadanie oddziaływania jednego z już scharakteryzowanych przez nas wcześniej mutantów białka z wybranym ligandem przy wykorzystaniu fluorescencyjnej metody detekcji powstającego kompleksu. W zależności od wyboru wariantu pracy, temat zostanie odpowiednio doprecyzowany.

6. “Wpływ warunków redukujących na oddziaływanie białka 4E-BP z eukariotycznym czynnikiem inicjacji translacji eIF4E – badania spektroskopowe”

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 – badania wskazują na obecność nienormalnie wysokiego poziomu tego białka w ludzkich komórkach nowotworowych. Białko 4E-BP (4E binding protein) bezpośrednio oddziałuje z eIF4E. Powstanie kompleksu tych dwóch białek uniemożliwia przyłączanie się kolejnych czynników translacyjnych i prowadzi do zablokowania procesu translacji. Znajomość molekularnego mechanizmu oddziaływania białek eIF4E i 4E-BP może okazać się istotna z medycznego punktu widzenia (projektowanie leków). Z dotychczasowych badań wynika, że krótkie fragmenty 4E-BP zawierające kilkanaście reszt aminokwasowych mają skłonność do dimeryzacji w wyniku tworzenia międzycząsteczkowych mostków disiarczkowych. Ten niekorzystny proces ma prawdopodobnie miejsce również w przypadku białka 4E-BP pełnej długości. Celem pracy będzie zbadanie wpływu obecności związków redukujących mostki disiarczkowe (DTT, TCEP) na równowagową stałą wiązania białek 4E-BP i eIF4E oraz znalezienie optymalnych warunków eksperymentalnych ograniczających dimeryzację. Jako metoda badawcza zostanie zastosowana stacjonarna spektroskopia emisyjna.

7. “Badanie fragmentacji nukleotydów i ich syntetycznych analogów metodą spektrometrii mas”

opiekun dr Joanna Kowalska, 55 40 774, asia@biogeo.uw.edu.pl

Spektrometria mas jest potężnym narzędziem umożliwiającym identyfikację szerokiej gamy związków poczynając od małych cząsteczek organicznych a na biocząsteczkach takich jak białka i kwasy nukleinowe kończąc, a także umożliwiającym badanie oddziaływań tych biocząsteczek ze specyficznymi ligandami. Tandemowa spektrometria mas (MS2) jest wygodnym narzędziem do badania fragmentacji mało- i wielkocząsteczkowych związków oraz biomolekuł, umożliwiającym tym samym nie tylko ich identyfikację, ale również pozyskanie informacji na temat ich struktury. Celem proponowanego projektu jest zbadanie fragmentacji zestawu naturalnie występujących nukleotydów, oligonukleotydów oraz ich syntetycznych analogów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS2). Zakładanym rezultatem projektu jest zaproponowanie prawdopodobnych ścieżek fragmentacji dla badanych nukleotydów oraz powiązanie charakterystycznych sygnałów fragmentacyjnych z odpowiednimi elementami strukturalnymi związków. Na podstawie wyciągniętych wniosków student(ka) dokona następnie jakościowej analizy nukleotydów wchodzących w skład wybranej próbki biologicznej (np. lizatu komórkowego).

8. “Badanie wpływu jonów metali dwuwartościowych na szybkość i wydajność tworzenia wiązania pirofosforanowego w oparciu o metodę HPLC”

opiekun dr Joanna Kowalska, 55 40 774, asia@biogeo.uw.edu.pl

Oligofosforany mono- i dinukleozydów pełnią liczne ważne funkcje biologiczne m.in. energetyczną, regulatorową, sygnalizacyjną oraz służą jako bloki budulcowe w ekspresji informacji genetycznej. Niektóre z tego typu związków znalazły zastosowanie w medycynie. Tworzenie wiązania pirofosforanowego jest kluczowym elementem chemicznej syntezy tego typu związków. Celem niniejszego projektu jest zbadanie wpływu różnych jonów metali dwuwartościowych na szybkość i wydajność reakcji pomiędzy wybranym nukleotydem a innym nukleotydem w postaci zaktywowanej, prowadzącej do powstania odpowiedniego dinukleotydu. Innymi parametrami, które mogą mieć wpływ na szybkość reakcji są temperatura, stosunek reagentów oraz rodzaj rozpuszczalnika. Zakładany rezultat projektu to

znalezienie optymalnych warunków dla przeprowadzenia badanej reakcji oraz wyciągnięcie wniosków na temat prawdopodobnej roli jonów metalu(II) na podstawie uzyskanych wyników. Głównym narzędziem w prowadzonych badaniach będzie wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Student(ka) będzie miał(a) również możliwość zapoznania się z technikami takimi jak spektrometria mas, spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego oraz różne techniki chromatograficzne.

**9. “Analogi difosforanu 7-metyloguanozyny modyfikowane w pozycji niemostkowej grupy pirofosforanowej jako inhibitory enzymu DcpS”
opiekun dr Jacek Jemielity, 55 40 774, jacekj@biogeo.uw.edu.pl**

Inhibitory enzymów stanowią cenne narzędzie w badaniach procesów biochemicznych. Nieprawidłowe funkcjonowanie enzymów w organizmach prowadzi do licznych chorób dlatego też enzymy często są celami terapeutycznymi, a hamowanie działania niektórych enzymów ma znaczenie medyczne. Z tych powodów istnieje duża potrzeba poszukiwania nowych inhibitorów reakcji enzymatycznych. Szereg ważnych związków aktywnych biologicznie posiada w swej strukturze ugrupowanie pirofosforanowe. Od wielu lat podejmowane są prace mające na celu otrzymanie związków, analogów nukleotydów zawierających modyfikację tego ugrupowania. Modyfikacje te można podzielić na dwie grupy modyfikowane w pozycji mostkowej oraz niemostkowej. Do tych pierwszych analogów należą m. in. analogi bisfosfonianowe (pCH_2p) oraz analogi imidodifosforanowe ($pNHp$), a do drugich tiofosforanowe (p_s) i boranofosforanowe (p_{BH_3}). Modyfikacje te posiadają różne właściwości np. powinowactwo do jonów metali, zdolność do tworzenia wiązań chemicznych, właściwości kwasowo-zasadowe, długość wiązań w ugrupowaniu pirofosforanowym, a to wszystko to przekłada się na oddziaływania z enzymami. W proponowanym temacie badaniom poddane zostaną analogi difosforanu 7-metyloguanozyny, które w celu zapewnienia im odporności na degradację enzymatyczną zostały zmodyfikowane w pozycji **niemostkowej** ugrupowania pirofosforanowego. Wcześniej wykazano, że modyfikacje tego typu w odpowiedniej pozycji struktury trifosforanu dinukleozydu ($NpppN$) są w stanie zapobiegać hydrolizie wiązania pirofosforanowego przez enzymy należące do hydrolaz nukleotydowych z super rodziny HIT, której przedstawicielem jest jeden z enzymów odpowiedzialnych za degradację struktury 5' mRNA kapu, enzym DcpS. Wybrane analogi m^7GDP **modyfikowane w pozycji niemostkowej** zostaną scharakteryzowane pod kątem zdolności do hamowania reakcji degradacji dinukleotydowego analogu kapu ($m^7GpppG \rightarrow m^7GMP + GDP$). Główną techniką stosowaną w badaniach będzie wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), dzięki której badając szybkości reakcji przy różnych stężeniach inhibitora i substratu można będzie wyznaczyć stałą inhibicji dla poszczególnych analogów.

**10. “Analogi difosforanu 7-metyloguanozyny modyfikowane w pozycji mostkowej grupy pirofosforanowej jako inhibitory enzymu DcpS”
opiekun dr Jacek Jemielity, 55 40 774, jacekj@biogeo.uw.edu.pl**

Inhibitory enzymów stanowią cenne narzędzie w badaniach procesów biochemicznych. Nieprawidłowe funkcjonowanie enzymów w organizmach prowadzi do licznych chorób dlatego też enzymy często są celami terapeutycznymi, a hamowanie działania niektórych enzymów ma znaczenie medyczne. Z tych powodów istnieje duża potrzeba poszukiwania nowych inhibitorów reakcji enzymatycznych. Szereg ważnych związków aktywnych biologicznie posiada w swej strukturze ugrupowanie pirofosforanowe. Od wielu lat podejmowane są prace mające na celu otrzymanie związków, analogów nukleotydów

zawierających modyfikację tego ugrupowania. Modyfikacje te można podzielić na dwie grupy modyfikowane w pozycji mostkowej oraz niemostkowej. Do tych pierwszych analogów należą m. in. analogi bisfosfonianowe (pCH_2p) oraz analogi imidodifosforanowe ($pNHp$), a do drugich tiofosforanowe (p_s) i boranofosforanowe (p_{BH_3}). Modyfikacje te posiadają różne właściwości np. powinowactwo do jonów metali, zdolność do tworzenia wiązań chemicznych, właściwości kwasowo-zasadowe, długość wiązań w ugrupowaniu pirofosforanowym, a to wszystko to przekłada się na oddziaływania z enzymami. W proponowanym temacie badaniom poddane zostaną analogi difosforanu 7-metyloguanozyny, które w celu zapewnienia im odporności na degradację enzymatyczną zostały zmodyfikowane w pozycji **mostkowej** ugrupowania pirofosforanowego. Wcześniej wykazano, że modyfikacje tego typu w odpowiedniej pozycji struktury trifosforanu dinukleozydu ($NpppN$) są w stanie zapobiegać hydrolizie wiązania pirofosforanowego przez enzymy należące do hydrolaz nukleotydowych z super rodziny HIT, której przedstawicielem jest jeden z enzymów odpowiedzialnych za degradację struktury 5' mRNA kapu, enzym DcpS. Wybrane analogi m^7GDP **modyfikowane w pozycji mostkowej** zostaną scharakteryzowane pod kątem zdolności do hamowania reakcji degradacji dinukleotydowego analogu kapu ($m^7GpppG \rightarrow m^7GMP + GDP$). Główną techniką stosowaną w badaniach będzie wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), dzięki której badając szybkości reakcji przy różnych stężeniach inhibitora i substratu można będzie wyznaczyć stałą inhibicji dla poszczególnych analogów.

11 i 12. opiekun: dr Joanna Żuberek, 55 40 781, jzuberek@biogeo.uw.edu.pl

Temat 1

“Charakterystyka wybranych izoform eIF4E z *Trypanosoma brucei*, badania biochemiczne i biofizyczne”

Temat 2

“Badanie oddziaływania wybranych izoform eIF4E z *Trypanosoma brucei* z analogami 5' końca mRNA metodą miareczkowania fluorescencyjnego”

Trypanosoma brucei to pasożytniczy pierwotniak z rodziny *Trypanosomatidae* wywołujący groźną chorobę zwaną śpiączką afrykańską. Co roku na tę chorobę zapada ponad 1,5 mln ludzi, głównie w krajach tropikalnych. Za przenoszenie pasożytów odpowiedzialne są muchy tse-tse, w momencie ukłucia kręgowca przez muchę pasożyty przedostają się z jej gruczołów ślinowych do organizmu kręgowca, gdzie pasożytują wewnątrzkomórkowo. Pierwotniaki z rodziny *Trypanosomatidae* posiadają również rzadkie u eukariontów cechy molekularne, takie jak: policistronowy mRNA, trans-splicing czy też występująca tylko u tej rodziny hipermetylowaną strukturę 5' końca mRNA zwaną kapem-4. Rozpoznawanie struktury kapu przez białko eIF4E jest kluczowym punktem regulacji inicjacji translacji u organizmów eukariotycznych, zaś odmienna struktura kapu-4 może wymuszać u pierwotniaków z rodziny *Trypanosomatidae* u *Leishmanii* odmienny niż u wyższych eukariontów mechanizm jej rozpoznawania przez czynnik eIF4E. Analizując bazę zdeponowanych sekwencji genomu *Trypanosoma brucei* na podstawie homologii z mysim i drożdżowym eIF4E, zidentyfikowano sześć różnych homologów białka eIF4E. Białka te zostały oznaczone TBEIF4E1 do TBEIF4E6. Celem pracy licencjackiej jest otrzymanie metodą nadekspresji w komórkach bakteryjnych rekombinowanych białek wybranych izoform TbEIF4E i zbadanie ich powinowactwa do analogów kapu-4.

13. “Otrzymywanie enzymu DcpS, hydrolizującego strukturę kapu 5'-kooca mRNA, z dołączoną 10-histydynową etykietą i badanie jego własności”

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

DcpS (*scavenger mRNA decapping enzyme*) jest enzymem biorącym udział w degradacji mRNA na ścieżce 3'→5'. Enzym ten hydrolizuje krótkie kapowane oligonukleotydy i dinukleotydy struktury kapu (czapeczki) 5'-kooca mRNA, powstałe w wyniku egzonukleolitycznej degradacji mRNA od kooca 3' do 5'. Ludzki enzym DcpS jest również potencjalnym celem terapeutycznym w rdzeniowym zaniku mięśni (*spinal muscular atrophy, SMA*). W związku z tym niezbędne jest opracowanie metody otrzymywania czystego enzymu w ilościach wystarczających do badań biofizycznych i biochemicznych. Celem pracy jest konstrukcja plazmidu umożliwiającego ekspresję enzymu DcpS z dołączoną etykietą dziesięciu histydyn, jego jednoetapowe oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa na złożu niklowym, analiza czystości i wydajności otrzymanego białka oraz badanie jego aktywności na wybranych analogach struktury kapu 5'-kooca mRNA.

14. “Analiza wydajności translacji transkryptów mRNA lucyferazy kapowanych wybraną serią analogów struktury czapeczki (kapu) 5'-kooca mRNA”
opiekun: dr Maciej Łukaszewicz, 55 40 781, mlukas@biogeo.uw.edu.pl

Otrzymywanie *in vitro* transkryptów mRNA, które z jednej strony są stabilne w środowisku wewnątrzkomórkowym, a z drugiej ulegają w nim wydajnej translacji, jest ważnym etapem opracowywania m.in. terapii genowych opartych na mRNA. Celem pracy jest otrzymanie w reakcji transkrypcji *in vitro* cząsteczek mRNA lucyferazy kapowanych wybraną serią analogów struktury czapeczki (kapu) 5'-kooca mRNA. Wydajność translacji tak otrzymanych transkryptów będzie następnie analizowana w bezkomórkowym układzie translacji *in vitro* (lizat z retikulocytów króliczych - RRL), w odniesieniu do mRNA lucyferazy kapowanego standardowym analogiem m7GpppG. Poziom translacji badanych w transkryptów w RRL mierzony będzie metodą luminometryczną.

15. “Od biofizycznych badań czynników determinujących selektywne i silne wiązanie się inhibitorów z enzymami do skuteczniejszych leków”,
opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk. , 55 40 784, borys@biogeo.uw.edu.pl

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 (enzymu) i jego oddziaływania z innymi cząsteczkami (substratami, inhibitorami) i środowiskiem, zarówno w stanie podstawowym jak i wzbudzonym. W pracy licencjackiej wykorzystane będą spektroskopowe metody pomiaru kinetyki enzymatycznej oraz 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 enzymologicznymi i 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. 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. 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.

**16. “Zastosowanie spektroskopii emisyjnej i mikroskopii konfokalnej w badaniach właściwości fizycznych i strukturalnych cząsteczek i makrocząsteczek biologicznych”
opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk. , 55 40 784, borys@biogeo.uw.edu.pl**

Absorpcja fotonów przez cząsteczki i makrocząsteczki 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 makrocząsteczkami (np. białka) i makroobiektami biologicznymi (np. organelle) i zapoznanie się z nowoczesnymi technikami spektroskopowymi. Celem pracy licencjackiej jest wykorzystanie zwiększonej rozdzielczości przestrzennej i czułości tych metod 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 chloroplastów roślinnych 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).

**17. “Fizyczna interpretacja zaniku fluorescencji cząsteczek biologicznych”
opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk. , 55 40 784, borys@biogeo.uw.edu.pl**

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 potęgowego członu w funkcji zaniku. 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 wielowykładniczych, 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

18. “Badania właściwości emisyjnych białek i ich wykorzystanie w charakterystyce oddziaływań 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 (bio)fizycznej 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 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 asocjatu 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) Bezpromieniste (rezonansowe) przeniesienie energii wzbudzenia w wyniku oddziaływania dipol-dipol między donorem w stanie wzbudzonym i akceptorem w stanie

podstawowym.

19. "Badanie wiązania guaniny przez cielęce PNP (fosforylaze nukleozydów purynowych) metodami spektrometrii dichroizmu kołowego (CD)"

opiekun prof. dr hab Jan Antosiewicz, 55 40 786, janek@biogeo.uw.edu.pl

Procesy tworzenia kompleksów guaniny z cielęcym PNP były tematem dwóch prac opublikowanych przez pracowników Zakładu Biofizyki. W badaniach tych wykorzystana została spektroskopia fluorescencyjna. Tematem proponowanej pracy licencjackiej jest powtórzenie tamtych badań, ale z wykorzystaniem spektroskopii CD jako narzędzia obserwacji tworzenia kompleksów i porównanie parametrów termodynamicznych charakteryzujących kompleksy, jakie otrzymuje się w obydwu metodach pomiarowych.

22. Badanie rozwijania rybonukleazy A w środowisku alkalicznym metodami spektrometrii zatrzymanego przepływu

opiekun prof. dr hab Jan Antosiewicz, 55 40 786, janek@biogeo.uw.edu.pl

W 1952 roku, prof. David Shugar, twórca Zakładu Biofizyki w Instytucie Fizyki Doświadczalnej, opublikował prace przedstawiającą wyniki pomiarów absorpcji światła w zakresie UV roztworów rybonukleazy A, w funkcji rosnącego pH roztworu. Autor wykazał rozwijanie struktury rybonukleazy pod wpływem wysokiego pH i że proces rozwijania może być śledzony poprzez pomiar absorpcji roztworu, gdyż towarzyszy mu wydobywanie się reszt tyrozynowych z wnętrza białka na powierzchnię, przy czym następuje natychmiastowa deprotonacja ich grup hydroksylowych, powodująca zmianę właściwości absorpcyjnych tych reszt. Tematem proponowanej pracy licencjackiej jest przeprowadzenie obserwacji kinetyki procesu rozwijania struktury rybonukleazy A poprzez pomiar absorpcji przy mieszaniu równoobjętościowym roztworów rybonukleazy w pH neutralnym i buforu o wysokim pH, takim, że pH mieszaniny jest wystarczająco duże do inicjacji procesu rozwijania.

21. "Próba krystalizacji wybranych mutantów zielono fluoryzującego białka (GFP)"

opiekun dr Beata Wielgus-Kutrowska, 55 40 789, beata@biogeo.uw.edu.pl

GFP jest niewielkim białkiem, o masie około 26 kDa, złożonym z 282 aminokwasów. Jego powszechne wykorzystywanie jako znacznika w badaniach biologicznych, w biotechnologii i medycynie wynika z obecności nietypowego chromofora tworzonego przez trzy sąsiadujące ze sobą w łańcuchu białkowym aminokwasy. Są to treonina 65, tyrozyna 66 i glicyna 67. Po prawidłowym zwinięciu białka i dojrzaniu chromofora (obejmującym cyklizację, dehydratację i utlenianie) powstaje układ emitujący promieniowanie w zielonym zakresie widma. Począwszy od lat 90-tych ubiegłego wieku projektowane są mutanty GFP o zmienionych właściwościach spektralnych. Skonstruowano m.in. białka takie jak YFP, BFP, RFP, emitujące promieniowanie odpowiednio w kolorze żółtym, niebieskim lub czerwonym. Tematem pracy licencjackiej będzie ekspresja w komórkach bakteryjnych i uzyskanie jednego z mutantów GFP oraz próba jego krystalizacji. Jeśli w wyniku pracy zostaną uzyskane kryształy odpowiednie do badań dyfrakcyjnych, posłużą one do wyznaczenia struktury białka.