

TEMATY PRAC MAGISTERSKICH (rok akad. 2013/2014)

Fizyka, II stopień; specjalność „Biofizyka”

ZFBM, II stopień; specjalność „Biofizyka molekularna”

Tematy przydzielone magistrantom

1. Opiekun: dr Joanna Grzyb, IF PAN

e-mail: jgrzyb@ifpan.edu.pl

Współopiekun: prof. Bogdan Lesyng

e-mail: lesyng@biogeo.uw.edu.pl

tel. 55 40 809

„Nanohybrydy koloidalnych kropek kwantowych i białek enzymatycznych - tworzenie i przykłady zastosowania”

Opis: Planowana praca obejmuje następujące etapy. Utworzenie hydrofilowej otoczki koloidalnych kropek kwantowych (CdSe/Zns, CdSe) poprzez podstawienie otoczki za pomocą amfifilowych białek (np. membrane scaffold protein) poprzez: (a) dobór odpowiedniego detergentu; (b) dobór stężeń i warunków procesu. Pokazanie zastosowań uzyskanego koniugatu w drugorzędowej koniugacji z wybranymi białkami (np. enzym oksydoreduktaza ferredoksyna-NADP⁺). Charakterystyka koniugatów pod względem rozmiaru, stabilności, homogenności i własności spektralnych (sączenie molekularne, MALS-statyczne rozpraszanie światła, fluorymetria steady-state i czasowo rozdzielcza, FCS i FCCS, mikroskopia sił atomowych).

2. Opiekun: dr Joanna Grzyb, IF PAN

e-mail: jgrzyb@ifpan.edu.pl

Współopiekun: prof. Bogdan Lesyng

e-mail: lesyng@biogeo.uw.edu.pl

tel. 55 40 809

„Struktury nanohybrydowe o określonej stechiometrii - optymalizacja metody otrzymywania oraz przykłady zastosowania”

Opis: Planowana praca obejmuje następujące etapy. Utworzenie hydrofilowej otoczki koloidalnych kropek kwantowych (CdSe/Zns, CdSe) poprzez podstawienie hydrofobowej otoczki drobnocząsteczkowym związkiem tiolowym. Opracowanie metody uzyskania koniugatu dwóch kropek kwantowych o kontrolowanym składzie (układ 1:1) dla kropek kwantowych o emisji np. 550 i 650 - podstawowym zastosowaniem takiej struktury jest funkcja standardu ("kontrola pozytywna") do badania oddziaływań białek znakowanych kropkami kwantowymi. Przewiduje się uzyskanie koniugatów dla przynajmniej dwóch różnych długości łącznika oraz uzyskanie wersji kropka kwantowa-inny fluorofor (np. białko fikocyjanina). Charakterystyka koniugatów pod względem rozmiaru, homogenności i własności spektralnych (sączenie molekularne, MALS-statyczne rozpraszanie światła, fluorymetria steady-state i czasowo rozdzielcza, FCS i FCCS, mikroskopia sił atomowych).

3. Opiekun: dr Remigiusz Worch, IF PAN

e-mail: remiwo@ifpan.edu.pl

Współopiekun: prof. Jan Antosiewicz

e-mail: jantosi@biogeo.uw.edu.pl

tel. 55 40 786

„Wpływ cholesterolu na zdolność partycjonowania melityny i peptydów fuzyjnych wirusa grypy w błonach lipidowych”

Opis: Praca polegać będzie na określeniu zdolności inkorporacji peptydu fuzyjnego wirusa grypy (HAfp) oraz melityny w błonach lipidowych o różnej zawartości cholesterolu. Główną zastosowaną techniką będzie spektroskopia fluorescencyjna. Badane peptydy to N-końcowe fragmenty podjednostki HA2 hemaglutyniny (HA) wirusa grypy (o długości 20 oraz 23 aminokwasów) oraz peptyd naturalnie występujący w jadzie pszczelim (melityna). Mimo podobnej struktury peptydów (amfifilowa spinka do włosów), istniejące dane literaturowe świadczą o różnym partycjonowaniu tych peptydów w obecności cholesterolu. Nadal istnieje potrzeba otrzymania dokładnych i ścisłych danych fizyko-chemicznych, co jest celem niniejszej pracy.

4. Opiekun: dr Remigiusz Worch, IF PAN

e-mail: remiwo@ifpan.edu.pl

Współopiekun: prof. Jan Antosiewicz

e-mail: jantosi@biogeo.uw.edu.pl

tel. 55 40 786

„Zastosowanie spektroskopii fluorescencyjnej do wyznaczenia stałych partycjonowania peptydów fuzyjnych wirusa grypy w błonach lipidowych”

Opis: Celem pracy jest określenie zdolności inkorporacji peptydu fuzyjnego wirusa grypy (HAfp) do błon biologicznych w różnym pH metodą spektroskopii fluorescencyjnej, oraz, jeżeli to możliwe, określenia mechanizmu poprzez który zachodzi fuzyja.

Badany peptyd to N-końcowy fragment podjednostki HA2 hemaglutyniny (HA). Porównane zostaną stałe wyznaczone dla peptydów o różnej długości oraz w wersjach z wolnym i acetylowanym N-końcem peptydu.

5. Opiekun: dr Maciej Łukaszewicz

e-mail: mlukas@biogeo.uw.edu.pl

tel. 55 40 781

„Badanie specyficzności substratowej i wybranych parametrów kinetycznych enzymu AsDcpS *A.suum*”

Opis: DcpS pasożytniczego nicienia *Ascaris suum* jest słabo zbadanym białkiem, homologiem CeDcpS (białko wolnożyjącego nicienia *C.elegans*). Pomimo że AsDcpS i CeDcpS są bardziej do siebie ewolucyjnie zbliżone, dotychczasowe dane pokazały, że AsDcpS ma dużo wyższe powinowactwo do monometylowanych analogów kapu niż do trimetylowanych analogów (inaczej niż dla CeDcpS, Wypijewska *et al.*, 2012). AsDcpS, podobnie jak ludzki enzym hDcpS, nie hydrolizuje niemetylowanego analogu GpppG, który jest substratem dla CeDcpS. Celem badań jest szersze zbadanie specyficzności substratowej AsDcpS. W trakcie pracy: 1) oczyszczone będzie AsDcpS z etykietą His-tag na N-końcu białka 2) porównana zostanie zdolność hydrolizy i specyficzność cięcia wybranych analogów kapu, 3) wyznaczone zostaną parametry kinetyczne AsDcpS dla wybranych niemodyfikowanych analogów kapu i analogów ze znacznikiem fluoroscencyjnym.

6. Opiekun: dr Maciej Łukaszewicz e-mail: mlukas@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 781

„Badanie specyficzności substratowej ludzkiego enzymu hNudt16 wobec dinukleotydowych analogów kapu”

Opis: Ostatnio opisany ludzki enzym hNudt16, podobnie jak Dcp2 należy do rodziny białek Nudix i odcina kap obecny na 5' końcu cząsteczki mRNA. W odróżnieniu od Dcp2 występuje w komórkach wszystkich analizowanych tkanek, wykazuje lokalizację cytoplazmatyczno-jądrową oraz hydrolizuje hipermetetylowany kap (TMG, m^{2,2,7}GpppG) występujący na snRNA i snoRNA. Oczyszczony enzym hydrolizuje również dinukleotydowe analogi struktury kapu. Celem badań jest szersze zbadanie specyficzności substratowej hNudt16 zarówno wobec dinukleotydowych analogów kapu jak i kapowanych rybonukleotydów o długości 5 nt (lub dłuższych). W trakcie pracy: 1) oczyszczone będzie hNudt16 z etykietą His-tag na C-końcu, 2) przeanalizowana zostanie zdolność hydrolizy i specyficzność cięcia wybranych dinukleotydowych analogów kapu, 3) przeanalizowana zostanie zdolność hydrolizy kapowanych oligorybonukleotydów otrzymanych metodą transkrypcji *in vitro*.

7. Opiekun: dr Maciej Łukaszewicz e-mail: mlukas@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 781

„Porównanie specyficzności substratowej i wybranych parametrów kinetycznych enzymu CeDcpS *C.elegans* z etykietą powinowactwa na N- lub C-końcu białka”

Opis: DcpS *Caenorhabditis elegans* (CeDcpS) jest jednym z modelowych białek wykorzystywanych w badaniach mono- i dinukleotydowych analogów struktury kapu 5'-końca mRNA. Dotychczasowe badania prowadzone były na białku z przyłączoną etykietą powinowactwa His-tag na N-końcu CeDcpS. Obserwowany brak hydrolizy m⁷GDP przez N-His-CeDcpS (i inne N-His tagowane DcpS-y, Wypijewska *et al.*, 2012) nie zgadzał się z wcześniejszymi doniesieniami, które sugerowały cięcie m⁷GDP (bazując na radioaktywnie znakowanych analogach i enzymie z etykietą powinowactwa na C-końcu). Celem badań jest sprawdzenie, czy obecność etykiety His-tag na N-końcu lub C-końcu CeDcpS ma wpływ na jego specyficzność w stosunku do mono- lub/i dinukleotydowych analogów kapu i czy obecność etykiety wpływa na Km lub/i Vmax enzymu. W trakcie pracy: 1) oczyszczone będą N-His-CeDcpS, CeDcpS-C-His i białko z odciętej etykiety, 2) porównana zostanie zdolność hydrolizy i specyficzność cięcia wybranych analogów kapu, 3) porównane zostaną parametry kinetyczne wybranych form CeDcpS dla niemodyfikowanych analogów kapu i analogów ze znacznikiem fluoroscencyjnym.

8. Opiekun: prof. Edward Darżynkiewicz e-mail: edek@biogeo.uw.edu.pl 55 40 787

„Porównanie specyficzności substratowej enzymów DcpS wobec dinukleotydowych analogów kapu modyfikowanych w obrębie 7-metyloguanozyny”

Opis: Białka DcpS to kluczowe enzymy metabolizmu mRNA, których podstawową funkcją jest usuwanie z komórek końcowych produktów degradacji mRNA w kierunku 3'→5'. Specyficzność substratowa enzymów DcpS pochodzących z różnych organizmów wykazuje znaczne różnice w zależności od długości łańcucha nukleotydowego analogu kapu, struktury mostka fosforanowego oraz modyfikacji w obrębie nukleotydów. Niezwykle istotne dla poznania właściwości katalitycznych białek DcpS jest badanie ich oddziaływań z modyfikowanymi analogami naturalnych substratów. Osoba zainteresowana tematem będzie miała za zadanie ustalenie optymalnych warunków enzymatycznej hydrolizy kapu katalizowanej przez białka DcpS nicieni (*C. elegans* i *A. suum*) oraz porównanie ich specyficzności substratowej wobec dinukleotydowych analogów kapu modyfikowanych w obrębie 7-metyloguanozyny (w pozycji N2 i N7). Wyznaczone zostaną parametry kinetyczne reakcji hydrolizy, które pozwolą określić wpływ podstawnika na efektywność cięcia dinukleotydów przez badane białka DcpS.

9. Opiekun: prof. Edward Darżynkiewicz e-mail: edek@biogeo.uw.edu.pl 55 40 787

„Badanie aktywności enzymatycznej białek DcpS metodami fluorescencyjnymi”

Opis: Białka DcpS należą do hydrolaz nukleotydowych z rodziny HIT, które biorą udział w końcowym etapie szlaku degradacji mRNA, w kierunku 3'→5'. Reakcja hydrolizy katalizowana przez enzymy DcpS polega na przecięciu wiązania pirofosforanowego w mostku fosforanowym kapu, zgodnie z równaniem: $m^7GpppN \rightarrow m^7GMP + ppN$. W ramach pracy magisterskiej przeprowadzona zostanie analiza porównawcza właściwości katalitycznych enzymów DcpS z *H. sapiens* i *C. elegans*. Badanymi substratami będą analogi końca 5' mRNA z różnymi modyfikacjami zasady oraz pierścienia rybozy w obrębie 7-metyloguanozyny. Metoda eksperymentalna oparta na rejestracji zmian sygnału fluorescencji substratu w funkcji czasu trwania reakcji pozwala wyznaczyć parametry kinetyczne reakcji hydrolizy (prędkość maksymalna i stałą Michaelisa-Menten). Otrzymane rezultaty mają pokazać zależności temperaturowe oraz wpływ inhibicji produktowej na efektywność enzymatycznej hydrolizy katalizowanej przez białka DcpS.

10. Opiekun: prof. Wiktor Koźmiński, Wydział Chemii/CENT UW e-mail: kozmin@chem.uw.edu.pl

Współopiekun: prof. Ryszard Stolarski e-mail: stolarsk@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 772

„Przypisanie sygnałów w widmach NMR białek nieustrukturyzowanych z użyciem eksperymentów o wysokiej wymiarowości”

Opis: Jednym z najważniejszych problemów eksperymentalnych współczesnej spektroskopii NMR, jest szybko rosnący z liczbą wymiarów oraz oczekiwaną zdolnością rozdzielczą czas trwania eksperymentu. Wymagania rosną także przy zwiększaniu indukcji magnetycznej co powoduje, że wzrost czułości nie przekłada się na skrócenie pomiarów. W badaniach polimerów biologicznych jak białka i kwasy nukleinowe, metodami spektroskopii NMR konieczne jest użycie widm wielowymiarowych. Dotychczas stosowane metody pozwalały jednak, w 'rozsądnym czasie' kilku dni, uzyskać jedynie widma trójwymiarowe o wciąż ograniczonej rozdzielczości. W grupie prof. Wiktora Koźmińskiego (CENT III UW) opracowano nowe metody pomiarowe oparte na rzadkim i losowym próbkowaniu przestrzeni czasu, znoszących ograniczenie liczby wymiarów i rozdzielczości w dziedzinie częstości. Nowe metody eksperymentalne i przetwarzania danych znajdują zastosowania, przede wszystkim w badaniach białek, a w szczególności białek częściowo nieustrukturyzowanych IDP (*Intrinsically Disordered Proteins*) stanowiących wyzwanie współczesnej biochemii. IDP charakteryzują się bardzo niewielkim zróżnicowaniem pików w widmach NMR wskutek uśredniania konformacyjnego. W związku z tym analiza widm o niskiej wymiarowości jest trudna, a najczęściej całkowicie niemożliwa. Jednocześnie, ze względu na duże rozpowszechnienie i bardzo istotne funkcje biologiczne, IDP są bardzo ważnymi obiektami badań, a ponieważ niemożliwe zazwyczaj jest uzyskanie kryształów takich białek, spektroskopia NMR pozostaje w praktyce jedynym źródłem informacji o ich resztkowej strukturze, dynamice i oddziaływaniach.

11. Opiekun: dr Anna Modrak-Wójcik e-mail: ankam@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 779

„Charakterystyka oddziaływania czynnika inicjacji translacji eIF4E z inhibitorowym białkiem 4E-BP1”

Opis: Inicjacja translacji w komórkach eukariotycznych jest złożonym procesem tworzenia kompleksów wielu białek oraz RNA i determinuje wypadkową szybkość biosyntezy białek. Szczególną rolę odgrywa białkowy czynnik translacyjny eIF4E, który inicjuje translację przyłączając się do charakterystycznej struktury kapu na 5'-końcu mRNA. Podwyższone stężenie eIF4E występuje w wielu rodzajach komórek nowotworowych. Białko 4E-BP1 (4E binding protein), poprzez utworzenie kompleksu z eIF4E i uniemożliwienie przyłączania się kolejnych czynników translacyjnych, prowadzi do zahamowania procesu translacji. Znajomość molekularnego mechanizmu oddziaływania białek eIF4E i 4E-BP1 może okazać się istotna z medycznego punktu widzenia. Praca będzie dotyczyła pomiarów tworzenia kompleksów podwójnych 4E-BP1/eIF4E i potrójnych 4E-BP1/eIF4E/kap oraz wyznaczania równowagowych stałych wiązania i parametrów termodynamicznych asocjacji. Jako metoda badawcza zostanie zastosowana spektroskopia emisyjna.

12. Opiekun: dr hab. Maria Agnieszka Bzowska e-mail: abzowska@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 789

„Czy metoda ”near UV CD” pozwala na badanie oddziaływania fosforylasy nukleozydów purynowych z ligandami?”

Opis: W ramach pracy magisterskiej zostanie sprawdzone czy metodą ”near UV CD” można określić model wiązania, oraz wyznaczyć stałe dysocjacji i ewentualnie także stochiometrię wiązania ligandów do heksametyrycznej fosforylasy nukleozydów purynowych z *E. coli* i jej mutantów: Y160W, R24Ala, D204Ala/R217Ala. Celem jest przede wszystkim odpowiedź na pytanie czy do opisu wiązania

substratów i ich analogów, np. fosforanu i formycyny A, niezbędne są dwie czy trzy stałe dysocjacji. W przypadku mutantu R24Ala ważne będzie nawet uzyskanie odpowiedzi na pytania czy mutant ten wiąże fosforan z podobną czy znacząco większą stałą dysocjacji, w porównaniu z enzymem typu dzikiego. Informacje te są potrzebne do weryfikacji proponowanego, na podstawie wcześniejszych pomiarów w roztworze i niepublikowanych danych krystalograficznych, mechanizmu reakcji.

13. Opiekun: dr Joana Kowalska e-mail: asia@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 774
„Synteza analogów końca 5' mRNA (kapu) selektywnie znakowanych stabilnymi izotopami węgla wodoru i tlenu oraz wykorzystanie ich do opracowania ilościowej metody oznaczania biologicznie ważnych pochodnych kapu metodą HPLC-MS”

Opis: Eukariotyczne mRNA posiadają są na końcu 5' unikalną pod względem budowy i właściwości chemicznych strukturę zwaną kapem (lub czapeczką). Kap zbudowany jest z 7-metyloguanozyny połączonej mostkiem 5',5'-trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem. Obecność kapu na końcu 5' mRNA jest niezbędna do prawidłowego przebiegu wielu procesów związanych z obróbką i funkcjonowaniem mRNA, w tym w regulacji stabilności i degradacji. Produktami degradacji mRNA są m.in. małowcząsteczkowe, nukleotydy, będące ufosforylowanymi pochodnymi 7-metyloguanozyny takie jak m⁷GMP, m⁷GDP, czy dinukleotydy typu m⁷GpppN. Różne ścieżki degradacji mRNA prowadzą do powstawania różnych nukleotydowych pochodnych kapu. Celem niniejszej pracy będzie synteza i charakteryzacja ufosforylowanych pochodnych 7-metyloguanozyny znakowanych stabilnymi izotopami ¹³C, ²H lub ¹⁸O i wykorzystanie ich do opracowania metody ilościowego oznaczania tych biologicznie ważnych pochodnych. Opracowana metoda może umożliwić oznaczanie zawartości różnych pochodnych 7-metyloguanozyny w ekstraktach biologicznych, a dzięki temu bliższe poznanie wzajemnych relacji różnych ścieżek degradacji mRNA.

14. Opiekun: dr hab. Jacek Jemielity e-mail: jacekj@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 774
„Opracowanie metod fluorescencyjnych pozwalających na ocenę nukleotydowych inhibitorów procesów zależnych od kapu”

Opis: Koniec 5' mRNA zwany kapem pełni szereg funkcji w komórkach, istnieje również wiele białek rozpoznających tę strukturę. To powoduje, że syntetyzowanych jest wiele analogów kapu, o różnorodnych zastosowaniach. Celem pracy jest ocena właściwości analogów kapu modyfikowanych m.in. w mostku oligofosforanowym, przy użyciu metod opartych o zjawisko fluorescencji. Na wyselekcjonowanej bibliotece analogów kapu przeprowadzone zostaną badania obejmujące wyznaczenie stałych asocjacji eIF4E-kap, parametrów kinetycznych dla substratów enzymu DcpS, oraz zdolności poszczególnych analogów kapu do inhibicji reakcji hydrolizy wiązania pirofosforanowego przez enzym DcpS. Obok powszechnie znanych metod opartych na fluorescencji (HPLC z detekcją fluorescencji, miareczkowanie fluorescencyjne, badania zmian fluorescencji w czasie) zaproponowana zostanie nowa metoda wykorzystująca detekcję jonów fluorkowych aktywujących sondy fluorescencyjne.

15. Opiekun: dr hab. Jacek Jemielity e-mail: jacekj@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 774
„Wykorzystanie modyfikowanych analogów końca 5' mRNA do poszukiwania inhibitorów białek wiążących kap o znaczeniu terapeutycznym”

Opis: Wśród białek wiążących kap są dwa, które są celami terapeutycznymi przy poszukiwaniu leków przeciwko poważnym schorzeniom. Hamowanie aktywności czynnika inicjującego translację 4E (eIF4E) ma potencjalne znaczenie w leczeniu szeregu nowotworów. Natomiast hamowanie specyficznej dla kapu pirofosfatazy, enzymu *Decapping Scavenger* (DcpS), ma znaczenie przy poszukiwaniu skutecznej terapii przeciwko rdzeniowemu zanikowi mięśni (SMA). W pracy zbadane zostaną właściwości analogów kapu zawierających modyfikacje tio- i boranofosforanowe pod kątem zdolności do hamowania procesów, w które zaangażowane są wyżej wymienione białka. W niektórych badaniach, gdzie może wystąpić problem z niewystarczającą czułością pomiarową użytych metod zostaną wykorzystane specjalnie zaprojektowane analogi kapu zawierające znacznik fluorescencyjny.

16. Opiekun: dr Richard Smith (Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Kolonia, Niemcy)
Współopiekun: dr Maciej Łukaszewicz e-mail: mlukas@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 781
„Growth tracking of leaves using MorphoGraphX” (tytuł polski: „Analiza wzrostu liści z użyciem programu MorphoGraphX”)

Opis: Liście są głównymi organami fotosyntezy w roślinach i wykazują wyraźną zmienność kształtów, których mechanizm powstawania nie jest poznany. Proponowane badania obejmą wzrost liści o prostej lub złożonej morfologii w modelowych gatunkach przy zastosowaniu konfokalnej, laserowej mikroskopii skaningowej w połączeniu z analizą obrazów 3D z wykorzystaniem własnego

oprogramowania MorphoGraphX. Doświadczalne dane o przestrzenno-czasowym wzroście komórek i ich proliferacji będą poddane symulacjom matematycznym. Celem badań jest lepsze zrozumienie rozwoju różnych kształtów liści w przyrodzie.

17. Opiekun: prof. Jan Antosiewicz e-mail: jantosi@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 786

„Badania nukleotydocukrów metodami spektroskopii dichroizmu kołowego”

Opis: Nukleotydocukry są to związki zbudowane z części nukleozydowej i reszty cukrowej, połączonych mostkiem fosforanowym, występujące naturalnie w organizmach żywych i mające znaczącą rolę biochemiczną jako substraty w reakcjach syntezy oligo- i poli-sacharydów oraz glikolipidów i glikoprotein. Wydaje się, że jedyną pracą związaną z zastosowaniem spektroskopii dichroizmu kołowego do badania tych związków jest artykuł *Circular Dichroism Changes in Galactosyltransferase upon Substrate Binding*, opublikowana przez C. R. Geren'a, S. C. Magee'a i K. E. Ebner'a w *Biochemistry* (tom 14, str. 1461-1463, rok 1975), w której zaobserwowano zmiany w widmie CD badanego enzymu po dodaniu UDP-galaktozy w zakresie dalekiego i bliskiego ultrafioletu, jak również obecność pasm CD w okolicy 270 nm dla roztworu samego nukleotydocukru. W pracy planowane jest wykonanie systematycznych pomiarów widm dichroizmu kołowego szerokiej gamy nukleotydocukrów, zsyntetyzowanych przez magistranta w ramach jego pracy magisterskiej z chemii, wykonanej pod opieką dr. hab. Jacka Jemielitego, w Zakładzie Biofizyki IFD WF UW. Zmierzone zostaną widma CD samych nukleotydocukrów, w różnych warunkach roztworu, jak również ich wpływ na widma CD galaktozylotransferazy. Planowanej jest też podjęcie próby teoretycznego wyznaczenia widm dichroizmu kołowego badanych związków przy wykorzystaniu programu chemii kwantowej o nazwie DALTON.

Propozycje tematów prac magisterskich (bez przydziału)

18. Opiekun: dr Maciej Łukaszewicz e-mail: mlukas@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 781

“Charakterystyka wybranego enzymu z rodziny Nudix hydrolizującego strukturę kapu”

Opis: 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 nowe enzymy z rodziny Nudix zaangażowane w hydrolizę struktury kapu (np. hNudt16, hNudt12, Nudt15). hNudt16 podobnie jak Dcp2 należy do rodziny białek Nudix i odcina kap obecny na mRNA. W odróżnieniu od Dcp2 występuje w komórkach wszystkich analizowanych tkanek, wykazuje lokalizację cytoplazmatyczną oraz hydrolizuje hipermetylowany kap (TMG, m2,2,7GpppG) występujący na snRNA i snoRNA. Oczyszczony enzym hydrolizuje również dinukletydowe analogi struktury kapu. Praca będzie związana z otrzymywaniem oczyszczonego hNudt16 (lub innego z wymienionych enzymów), następnie charakterystyki jego specyficzności substratowej w wybranych warunkach reakcji oraz wyznaczenie podstawowych parametrów kinetycznych.

19. Opiekun: dr Maciej Łukaszewicz e-mail: mlukas@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 781

“Modyfikowane analogi struktury kapu 5'-końca mRNA jako potencjalne inhibitory kap-zależnej translacji - badania w układach translacji *in vitro*.”

Opis: 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* oraz analizy oporności na enzymy dekapujące (DcpS, Nudt).

20. Opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk e-mail: borys@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 784

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

Opis: Wpływ oddziaływania elektrostatycznego między makromolekulą (białkiem) i molekulą (ligandem) na ich widma absorpcji i emisji fotonów umożliwia ilościową charakterystykę kompleksów (asocjatów) białko-ligand. Nauczmy się jak na podstawie zależności tych widm od stężenia liganda i temperatury w roztworze można wyznaczyć powinowactwo, tj. stałą asocjacji i liczbę molekul liganda

wiązanych przez jedną makromolekulę białkową. Praca magisterska dotyczy określenia wymagań wybranego enzymu i sformułowania na tej podstawie modelu mechanizmu reakcji enzymatycznej na bazie precyzyjnych informacji o strukturze i własnościach fizycznych enzymu, ligandów i asocjatów enzym-ligand. Uwzględniony będzie wzajemny wpływ 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. Odpowiemy na pytanie: jakich parametrów należałoby się spodziewać w przypadku bardzo dobrego inhibitora enzymu - potencjalnego leku? Uzyskane wyniki będą podstawą pracy magisterskiej.

21. Opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk e-mail: borys@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 784
„Zastosowanie zwiększonej rozdzielczości czasowej i przestrzennej laserowej fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej w badaniach kompleksów enzym - ligand znakowanych sondami fluorescencyjnymi.

Opis: 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) Oddziaływania elektrostatyczne, np. typu wiązań wodorowych;
- (c) Bezpromieniste (rezonansowe) przeniesienie energii wzbudzenia w wyniku oddziaływania dipol-dipol między donorem w stanie wzbudzonym i akceptorem w stanie podstawowym.
- (d) Śledzenie dyfuzji, liczby cząsteczek ich masy cząsteczkowej oraz asocjacji.

22. Opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk e-mail: borys@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 784
„Entalpia swobodna oddziaływania enzym-inhibitor”

Opis: Zbadanie wpływu oddziaływania elektrostatycznego między makromolekulą (białkiem) i molekulą (ligandem) na ich widma absorpcji i emisji fotonów umożliwia ilościową charakterystykę kompleksów (asocjatów) białko-ligand. Nauczmy się jak na podstawie zależności tych widm od stężenia liganda w roztworze białka oraz temperatury tego roztworu można wyznaczyć entalpię swobodną asocjacji wybranego enzymu z inhibitorem. 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. Odpowiemy na pytanie, jakiej entalpii należałoby się spodziewać w przypadku „silnych inhibitorów” (potencjalnych leków).

23. Opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk e-mail: borys@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 784
„Analiza własności spektralnych chloroplastów roślin i kompleksów LHCII – obrazowani strukturalne”

Opis: Chloroplasty są to obiekty makromolekularne składające się między innymi z chromoforów (kilku typów chlorofilu, karotenoidów), białek i błon lipidowych. O ich własnościach spektralnych i funkcjonalnych decydują głównie własności kompleksów białkowo-chromoforowych. Kompleksy białkowo-chromoforowe absorbują i emitują fotony światła widzialnego, odpowiednio w zakresie 350-750 i 620-800 nm. Ponadto zainteresujemy się także rozpraszaniem światła oraz porównamy absorpcję, emisję i rozpraszanie w przypadku chloroplastów izolowanych z różnych roślin, np. wrażliwych i odpornych na chłód. Nauczmy się jak przestrzenny rozkład charakterystycznych czasów zaniku emisji fotonów (fluorescencji) może być podstawą obrazowania przestrzennego chloroplastów za pomocą fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej (ang. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*, FLIM). Zbadamy czy środowisko wpływa na strukturę chloroplastów oraz czy ten wpływ ma znaczenie dla ich roli biologicznej.

24. Opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk e-mail: borys@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 784
„Wyznaczanie odległości między białkiem (enzymem) i ligand (inhibitorem) na podstawie rezonansowego transferu energii wzbudzenia fluorescencji”

Opis: W połowie XX wieku Theodore Foerster opracował fizyczne podstawy transferu energii wzbudzenia fluorescencji (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET) między molekułami zwanymi odpowiednio donorem i akceptorem energii. Głównym elementem teorii Foerstera jest oddziaływanie dipol-dipol między stanem wzbudzonym donora i podstawowym akceptora. Foerster pokazał, że transfer ten jest **rezonansowy**, tzn. widmo emisji donora powinno chociaż częściowo przykrywać się z widmem absorpcji akceptora. Jako konsekwencja oddziaływania dipolowego, wydajność transferu energii powinna być proporcjonalna do czynnika orientacji wzajemnej (κ^2) dipolowych momentów przejść - emisyjnego w przypadku donora i absorpcyjnego w przypadku akceptora oraz odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości (R^6) między nimi. Badając te dwie zależności nauczymy się podstaw modelu Foerstera.