

Tematy prac licencjackich dla studentów specjalności “Biofizyka molekularna” na kierunku “Zastosowanie fizyki w biologii i medycynie” w r. akad. 2013/2014

1. Opiekun: dr hab. Janusz Stępiński; e-mail: jastep@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 769

„Rola jonów Mn^{2+} w katalizie reakcji chemicznych”

Opis: Praca jest eksperymentalna, w opisie wymaga wstępu teoretycznego i omówienia uzyskanych wyników. Przedmiotem pracy mają być badania reakcji otrzymywania GDP (5'-difosforanu guanozyny) z GMP (5'-monofosforanu guanozyny) w celu dobrania optymalnych warunków jej przebiegu. 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 cieczowej).

2. Opiekun: dr hab. Jacek Jemielity; jacekj@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 774

„Synteza i badanie właściwości dinukleotydowych analogów hipermetylowanego kapu z biotyną przyłączoną do zasady nukleinowej drugiego nukleozydu”

Temat zarezerwowany

Opis: Metylacja grupy egzoaminowej w pozycji 2 7-metyloguanozyny w strukturze kapu występująca w pewnych rodzajach RNA stanowi sygnał transportu dojądrowego. Fakt ten może być wykorzystany do poprawienia importu jądrowego terapeutyków, dla których docelowym miejscem działania jest jądro komórkowe. W przypadku lokalizacji biocząsteczek w układach biologicznych stosuje się często różnego rodzaju znaczniki, pozwalające na śledzenie losów tych biocząsteczek w komórkach. Celem pracy licencjackiej jest opracowanie syntezy dinukleotydowych analogów trimetylokapu, zawierających linkery diaminowe różnej długości przyłączone w pozycji 6-adenozyny, jako drugiego nukleozydu. Linkery zostaną wykorzystane do przyłączania biotyny - znacznika powszechnie używanego w badaniach biologicznych. Otrzymane analogi zostaną scharakteryzowane metodami spektroskopowymi.

3. Opiekun: dr hab. Jacek Jemielity; jacekj@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 774

„Synteza i badanie właściwości analogów końca 5' mRNA odpornych na hydrolizę enzymatyczną, substratów do otrzymywania transkryptów mRNA znakowanych biotyną”

Temat zarezerwowany

Opis: Struktura kapu znajduje się na końcu 5' informacyjnego RNA stanowiącego matrycę do biosyntezy białek i pełni szereg ważnych funkcji w procesach ekspresji informacji genetycznej m. in. inicjacji translacji, degradacji RNA, dojrzewaniu RNA, transporcie wewnątrzkomórkowy. Do celów badań tych procesów zostaną zaprojektowane i otrzymane dinukleotydowe analogi struktury kapu, które będą modyfikowane w mostku trifosforanowym grupami metylenobisfosfonianowymi, imidodifosforanowymi lub tiofosforanowymi w celu nadania im odporności na enzymy hydrolityczne degradujące kap, a dodatkowo zostanie do nich przyłączona biotyna jako znacznik powinowactwa. Biotyna zostanie przyłączona do reszty rybozy 7-metyloguanozyny, w taki sposób aby w istotny sposób nie zaburzała oddziaływań z białkami wiążącymi kap oraz aby takie dinukleotydy mogły być wbudowywane przez polimerazę RNA do transkryptów. Związki zostaną zsyntetyzowane, oczyszczone, ich struktura potwierdzona metodami spektroskopowymi oraz wstępnie zostaną zbadane ich właściwości biochemiczne.

4. Opiekun: dr hab. Jacek Jemielity; jacekj@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 774

„Koniugaty nukleotydów z nanocząstkami złota – synteza, właściwości i potencjalne zastosowania bioanalityczne”

Temat zarezerwowany

Opis: Nanocząstki złota ze względu na swoje ciekawe właściwości, a w szczególności zależność właściwości spektralnych od ich otoczki są intensywnie badane pod kątem zastosowań w bioanalityce i diagnostyce medycznej. Wśród białek wiążących strukturę końca 5' mRNA są takie, których nadekspresja w komórkach skorelowana jest ze stanami chorobowymi. W ramach pracy licencjackiej zostaną zsyntetyzowane analogi kapu zawierające linkery zakończonymi grupami tiolowymi i disulfidowymi, które charakteryzują się dużym powinowactwem do nanocząstek złota. Zostaną one wykorzystane do otrzymania koniugatów nanocząstki złota – analog kapu. Koniugaty zostaną scharakteryzowane pod względem właściwości spektralnych, oraz jak te właściwości zmieniają się pod wpływem różnych czynników, w tym dodatku białka zdolnego do wiązania kapu.

5. Opiekun: dr hab. Jacek Jemielity; jacekj@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 774

„Synteza i właściwości podwójnie sfunkcjonalizowanych analogów kapu, substratów do kowalencyjnego łączenia z nanomateriałami i znacznikami fluorescencyjnymi”

Temat zarezerwowany

Opis: Ze względu na rolę jaką struktura końca 5' mRNA tzw. kapu pełni w komórce, analogi kapu znalazły szereg zastosowań w badaniach biofizycznych, biologicznych oraz w biotechnologii. Analogi kapu są również potencjalnymi czynnikami terapeutycznymi, oraz mogą być ligandami do wytwarzania specyficznych bioczujników, pozwalających na wykrywanie markerów skojarzonych z chorobami. Praca licencjacka dotyczy syntezy analogów kapu, do których zostaną przyłączone dwa różne linkery zawierające różne grupy funkcyjne (aminowe i karboksylowa). Poszczególne grupy funkcyjne posłużą z jednej strony do selektywnego łączenia analogów kapu z nanomateriałami a z drugiej do znakowania fluorescencyjnego tych koniugatów. W przyszłości tego typu koniugaty zostaną wykorzystane do opracowania nowych sposobów dostarczania leków nukleotydowych do komórek oraz bioczujników pozwalających na ocenę stężenia białek wiążących nukleotydy (w tym kap).

6. Opiekun: prof. dr hab. Edward Darżynkiewicz edek@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 787

Współopiekun: dr Anna Niedźwiecka (Instytut Fizyki PAN) e-mail: annan@ifpan.edu.pl
„Nadekspresja i oczyszczanie fragmentów białka GW182: (1) SD1, SD3x oraz SD10”

7. Opiekun: prof. dr hab. Edward Darżynkiewicz edek@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 787

Współopiekun: dr Anna Niedźwiecka (Instytut Fizyki PAN) e-mail: annan@ifpan.edu.pl
„Nadekspresja i oczyszczanie fragmentów białka GW182: (2) SDf1, uczestniczącego w wyciszaniu ekspresji genów przez miRNA”

Opis (do obu tematów): Białka z rodziny GW182 zaangażowane są wyciszanie ekspresji genów przez miRNA. Rekrutują one kompleks deadenylaz CCR4-NOT do wyciskanego mRNA, powodując zahamowanie translacji i/lub deadenylację mRNA. Celem pracy jest nadekspresja i oczyszczenie różnych fragmentów białka GW182: **1) SD1, SD3x oraz SD10 2) SDf1**, a w razie potrzeby także konstrukcja mutantów tychże białek. Białka będą wykorzystane do badań strukturalnych metodą H/D Ex ESI MS / IMS (wymiana proton-deuteron w spektrometrii mas z jonizacją przy użyciu elektrorozpylania, z wykorzystaniem spektrometrii ruchliwości jonów). Student(ka) zapozna się z kilkoma metodami oczyszczania białek (np. na złożach powinowactwa) oraz podstawowymi sposobami ich charakterystyki (ocena czystości, pomiar stężenia).

8. Opiekun: dr hab. Maria Agnieszka Bzowska e-mail: abzowska@biogeo.uw.edu.pl

tel. 55 40 789

„Spektroskopowe pomiary oddziaływań mutantów heksamerycznej fosforylasy nukleozydów purynowych z ligandami”

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 fosforylasy 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 oraz w opracowywanej terapii genowej niektórych nowotworów.

Osobie zainteresowanej wykonaniem pracy licencjackiej w roku akademickim 2013/2014 proponujemy zbadanie oddziaływania z fosforanem heksamerycznego PNP (*E. coli*) mutantu Y160W o wzmocnionej fluorescencji w stosunku do typu dzikiego poprzez zastąpienie jednej z tyrozyny resztą tryptofanową. W szczególności pragniemy uzyskać odpowiedź na pytanie, ile stałych dysocjacji potrzeba, aby prawidłowo opisać to wiązanie, to znaczy, ile rodzajów miejsc wiążących ma enzym. Uzyskane do tej pory struktury białka z ligandami wskazują jednoznacznie na istnienie co najmniej dwóch typów miejsc. Jednak niektóre dane, w tym miareczkowania fluorescencyjne mutantu Y160W, sugerują, że są to raczej trzy, a nie dwa rodzaje miejsc wiążących

9. Opiekun: dr Beata Wielgus-Kutrowska, e-mail beata@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 789 „Spektroskopowe badania agregacji wybranego mutantu zielono fluoryzującego białka GFP”

Opis: Przedmiotem badań prowadzonych w ramach podanego wyżej tematu jest mutant zielono fluoryzującego białka GFP. Jest to niewielkie białko, o masie około 26 kDa, złożone 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 dojrzewaniu 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. GFP ma skłonność do agregacji, która stanowi powszechny problem w medycynie (wiele chorób neurodegeneracyjnych jest stowarzyszonych z powstawaniem nierozpuszczalnych agregatów białkowych), w produkcji leków opartych na białkach, czy w produkcji białek do badań naukowych. W ramach zaproponowanego tematu uzyskamy materiał do badań spektroskopowych - mutantu GFP. Następnie scharakteryzujemy agregaty powstające w trakcie uzyskiwania i utraty przez niego właściwości fluorescencyjnych.

10. Opiekun: dr Maciej Łukaszewicz, e-mail: mlukas@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 781 „Konstrukcja wektora do ekspresji mutantu białka hydrolizującego strukturę kapu 5'-końca mRNA i jego oczyszczanie na złożu powinowactwa”

Opis: Cechą charakterystyczną eukariotycznych mRNA jest struktura kapu, obecna na końcu 5' cząsteczki (7-metyloguanozyna 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 Dcp2 hydrolizuje kap przyłączony do długich łańcuchów mRNA zawierających powyżej 25 nukleotydów (odcina m⁷Gpp) i tym samym inicjuje degradację w kierunku 5'→3'. Enzym DcpS hydrolizuje dinukleotydowy kap

powstały w wyniku degradacji mRNA w kierunku 3'→5'. Ostatnio opisano nowy enzym hNUDT16 zaangażowany w hydrolizę kapu na końcu 5'mRNA, który podobnie jak Dcp2 należy do rodziny białek Nudix i odcina kap obecny na mRNA, jednak w odróżnieniu od Dcp2 występuje w komórkach wszystkich analizowanych tkanek i wykazuje lokalizację cytoplazmatyczno-jądrową. Ludzki enzym DcpS jest również potencjalnym celem terapeutycznym w rdzeniowym zaniku mięśni (*spinal muscular atrophy, SMA*). Celem pracy jest konstrukcja plazmidu (metodą ukierunkowanej mutagenezy) umożliwiającego ekspresję mutantu enzymu hydrolizującego kap (DcpS lub NUDT16) i jego oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa na złożu niklowym.

11. Opiekun: dr Maciej Łukaszewicz, e-mail: mlukas@biogeo.uw.edu.pl tel. 55 40 781
„Analiza wydajności translacji transkryptów mRNA lucyferazy kapowanych wybraną serią analogów struktury czapeczki (kapu) 5'-końca mRNA”

Opis: 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'-końca 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.

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

„Od biofizycznych badań czynników determinujących selektywne i silne wiązanie się inhibitorów z enzymami do skuteczniejszych leków”,

Opis: Absorpcja fotonów przez 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 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 fluorescencyjnymi. Celem pracy licencjackiej jest opis 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.

13. Opiekun: prof. dr hab. Borys Kierdaszuk, e-mail: borys@biogeo.uw.edu.pl

tel. 55 40 784

„Zastosowanie spektroskopii fluorescencyjnej w badaniach właściwości fizycznych cząsteczek i makrocząsteczek biologicznych”

Opis: 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 z makrocząsteczkami i zapoznanie się z nowoczesnymi technikami fluorescencyjnymi. Celem pracy licencjackiej jest wykorzystanie zwiększonej rozdzielczości czasowej i czułości tych metod.

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

„Fizyczna interpretacja zaniku fluorescencji cząsteczek biologicznych”

Opis: Celem pracy licencjackiej jest porównanie dwóch modeli opisujących kinetykę dezaktywacji elektronowych stanów wzbudzonych w białku na skutek emisji fotonów (fluorescencji). Białko to i jego kompleks z ligandem wykazują złożone relaksacje, będące wynikiem oddziaływania wzbudzonych cząsteczek z otoczeniem i transferu energii wzbudzenia do stanów elektronowych innych cząsteczek. Dotychczas do opisu zaniku fluorescencji białek zawierających reszty tyrozyny i tryptofanu stosowano sumę dyskretnych składników wykładniczych, których liczba wynikała z jakości dopasowania do danych doświadczalnych a interpretacja fizyczna poszczególnych komponentów wykładniczych była niejasna. Nasze badania wykonane w ubiegłych latach pokazały, że funkcja potęgowa otrzymana za pomocą modelu ciągłego rozkładu czasów życia w prosty sposób opisuje zaniki stanów wzbudzonych i może stanowić dobrą alternatywę dla modeli wielowykładniczych. Projekt pracy licencjackiej przewiduje także wprowadzenie do nowoczesnej metodologii czasoworozdzielczej spektrofлуorymetrii i zapoznanie się z nowoczesnymi metodami interpretacji zaników fluorescencji.

15. Opiekun: prof. dr hab Jan Antosiewicz, e-mail: jantosi@biogeo.uw.edu.pl
tel. 55 40 786,

„Badania zmian strukturalnych w białkach metodami dynamiki molekularnej w stałym pH”

Temat zarezerwowany

Opis: W naszej grupie rozwinięto algorytmy symulacji metodami dynamiki molekularnej w stałym pH. Jeden z algorytmów wykorzystuje program dynamiki molekularnej Gromacs oraz własne oprogramowanie do elektrostatyki molekularnej białek. W pracy będą wykonane symulacje rybonukleazy przy skokowej zmianie pH od neutralnego do silnie alkalicznego. Na

podstawie wysymulowanych trajektorii będzie podjęta próba określenia czasu relaksacji dla alkalicznej denaturacji rybonukleazy.

16. Opiekun: prof. dr hab Jan Antosiewicz, e-mail: jantosi@biogeo.uw.edu.pl
tel. 55 40 786,

„Badania zmian struktury trzeciorzędowej białek przy alkalizacji roztworu metodami spektroskopii dichroizmu kolowego w zakresie bliskiego ultrafioletu”

Temat zarezerwowany

Opis: Dichroizm kolowy (CD) znalazł zastosowanie w badaniach białek przede wszystkim jako metoda określania ich struktury drugorzędowej i zmian w tej strukturze w różnych procesach jakim podlegają białka. Są to badania w zakresie dalekiego ultrafioletu. Okazuje się jednak, że białka mają często charakterystyczne pasma CD w zakresie bliskiego ultrafioletu, gdzie absorbują ich aromatyczne aminokwasy (tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina), a istnienie tych pasm jest interpretowane jako odzwierciedlenie struktury trzeciorzędowej białek. Choć nie ma jeszcze możliwości obliczania widm CD w zakresie bliskiego ultrafioletu na podstawie założonej struktury białka, tak jak ma to miejsce dla widm w dalekim ultrafiolecie i struktury drugorzędowej, to można wykorzystywać zmiany w widmach CD w bliskim ultrafiolecie do śledzenia zmian struktury trzeciorzędowej białek w procesach wiązania ligandów czy też procesach denaturacji za pomocą ciepła, denaturantów czy zmian pH. W pracy licencjackiej jest planowane wyznaczenie zmian jakie zachodzą przy alkalizacji roztworu dla albuminy ludzkiej i/lub wołowej.

17. Opiekun: dr Sen Hou, Instytut Chemii Fizycznej PAN e-mail: hs0010910@gmail.com
tel. 790 662 634

Współopiekun: prof. dr hab. Jan Antosiewicz, e-mail: jantosi@biogeo.uw.edu.pl
tel. 55 40 786,

„Quantitative analysis of cleavage kinetics of imperfectly labeled DNA with restriction enzyme by fluorescence correlation spectroscopy” (praca w języku angielskim)

Temat po polsku: „Ilościowa analiza cięcia niedoskonale wyznakowanego DNA przez enzym restrykcyjny metodą spektroskopii korelacji fluorescencji”.

Temat zarezerwowany

Opis: Praca dotyczy enzymatycznych badań cięcia niedoskonale znakowanego fluorescencyjnie kwasu deoksyrybonukleinowego ssDNA (*single-stranded DNA*) techniką spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS). Obejmuje przygotowanie próbek fluoryzującego DNA, spektrofotometryczne pomiary UV-VIS stężeń DNA w próbkach, pomiary wydajności wyznakowania fluorescencyjnego metodą FCS (*fluorescence correlation spectroscopy*) oraz połączenie ssDNA w helisy dwuniciowe dsDNA (*double-stranded DNA*). Na podstawie dokładnej znajomości czynnika PDL (procent ilości wyznakowanych nici DNA w roztworze) będzie przeprowadzone cięcie dsDNA za pomocą enzymu restrykcyjnego. Do ilościowej analizy kinetyki reakcji zostanie wykorzystana nowa technika oparta na pomiarach FCS. Uzyskane wyniki umożliwią wyznaczenie stałych Michaelisa-Menten dla reakcji w różnych stężeniach DNA w zakresie nanomolarnym, oraz do analizy stosowalności procedury w innych reakcjach enzymatycznych.