

Informacja o programie badawczym Zespołu Fizyki Biologicznej

1. Zespół Fizyki Biologicznej SL-1.5 został powołany decyzją dyrektora IF PAN prof. Jacka Kossuta z dnia 15 stycznia 2004 r. w Środowiskowym Laboratorium SL-1 – Badań Rentgenowskich i Elektronomikroskopowych kierowanym przez doc. Krystynę Ławniczak-Jabłońską. Kierownikiem Zespołu jest prof. Marek Cieplak. Badania naukowe Zespołu będą miały charakter interdyscyplinarny a pod względem metod pracy – doświadczalno-teoretyczny. W Zespole zatrudnionych jest czworo doświadczalników [dr Tomasz Kobiela (chemik), dr Anna Niedźwiecka (biofizyczka), dr Andrzej Sienkiewicz (fizyk) i doc. Ewa Sobczak (fizyczka, zatrudniona na pół etatu)] oraz dwoje teoretyków [prof. Marek Cieplak i mgr Joanna Kwiecińska]. Celowe wydaje się być zatrudnienie biologa w Zespole. Informacje o Zespole można znaleźć pod adresem info.ifpan.edu.pl/SL-1/sl15.

2. Podstawowymi domenami działalności Zespołu będą:

- a) Badanie struktury, dynamiki oraz zmian konformacji białek.
- b) Analiza procesów mechanicznej manipulacji molekułami białek.
- c) Badanie procesów zachodzących na granicach warstw lipidowych – modeli błon komórkowych.
- d) Analiza właściwości fizycznych komórki w obecności stresu utleniającego.

W dalszej perspektywie:

- e) Modelowanie białek motorycznych i zrozumienie mechanizmów ruchu komórek.
- f) Badanie układów oddziałujących ze sobą białek i inne aspekty proteomiki.

Wszystkie te tematy należą do głównych nurtów badań podstawowych współczesnej biofizyki i biologii a jednocześnie mają aspekty aplikacyjne. Na przykład, badania warstw lipidowych będą prowadzone pod kątem zrozumienia i projektowania sposobów transportu leków i innych substancji aktywnych przez barierę krew-mózg oraz przez błony komórkowe w terapii przeciwnowotworowej, czy dostarczania antybiotyków do wnętrza komórek bakteryjnych.

3. Badanie procesów kinetyki zwijania się białek (punkt 2a)

Badania doświadczalne nad białkami skupią się nad zrozumieniem kinetyki zwijania, innych zmian konformacyjnych, warunków agregacji chemicznej lub ciśnieniowej białek takich jak: cytochrom C (białko łańcucha oddechowego), lizozym T4L (enzym tnący ściany komórek bakteryjnych), karboksypeptydaza (enzym trawiący końce białek), troponina (białko mięśniowe), S100A1 (białko wiążące wapń), oraz trzy białka regulujące dojrzewanie, aktywność i zanik informacyjnego kwasu mRNA, którego metabolizm kontroluje cykl życiowy komórki. Są to eIF4E (białko inicjujące translację w komórkach organizmów wyższych), i niedawno odkryte

CBC (jądrowy heterokompleks związany ze splicingiem i transportem mRNA z jądra do cytoplazmy), PARN (enzym tnący łańcuch polyA mRNA). Wybór tych białek wynika z kilku czynników: ważnej roli w funkcjonowaniu żywych komórek, dostępności dla badań planowanych przez Zespół, oraz roli w tworzeniu modeli teoretycznych. Ekspresja i wyizolowanie białek oraz ich mutantów, jak również oznakowanie wybranych aminokwasów znacznikami spinowymi i luminescencyjnymi wymaga współpracy z innymi ośrodkami. Będą to Zakład Biofizyki UW, kierowany przez prof. Ryszarda Stolarskiego, grupa prof. Andrzeja Bierzyńskiego w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN oraz grupa prof. Petera Fajera z Florida State University w Tallahassee, USA. Zespół nawiązał też współpracę z grupą prof. Mariusza Jaskólskiego i doc. Michała Sikorskiego w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Badania opisane powyżej dotyczą kinetyki pojedynczych molekuł białkowych. Następnym krokiem będzie badanie kinetyki obiektów złożonych. Obiecującym tematem jest w szczególności zwijanie funkcjonalnie nieustrukturuwanego białka 4E-BP1 na białku targetowym eIF4E. Białko 4E-BP1 jest wielostopniowo regulowanym inhibitorem translacji w organizmach wyższych. Jego aktywność jest kluczowa dla procesów onkogenezy, apoptozy (programowanej śmierci komórki) i reakcji immunologicznych. 4E-BP1 jest jednym z nietypowych białek, które w natywnej formie pozbawione są struktury. Jego fragment ulega zwinięciu w α -helisę podczas oddziaływania z czynnikiem translacyjnym eIF4E. Celem badań Zespołu jest poznanie mechanizmu zwijania białka 4E-BP1 zachodzącego w asocjacji z białkiem eIF4E.

W badaniach kinetyki procesów molekularnych wykorzystana będzie metoda Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego (EPR) w sprzężeniu z metodą szybkiego mieszania substratów w warunkach przepływowych i wykonywania pomiarów po nagłym ustaniu przepływu (Stopped-Flow). W badaniach zmian konformacyjnych białek metoda EPR stosowana jest od zaledwie kilku lat, a jej potencjał wynika z możliwości selektywnego wprowadzenia znaczników spinowych w wybrane położenia w łańcuchu peptydowym. Dzięki temu możliwe jest badanie zarówno globalnej dynamiki molekuly białka, jak i próbkowanie lokalnych zmian konformacyjnych. Komplementarnych informacji dostarczą metody optyczne, takie jak stacjonarna i rozdzielcza w czasie spektroskopia fluorescencyjna oraz optyczne metody przepływowe (Optical Stopped-Flow). Prace badawcze dotyczące dynamiki procesów molekularnych będą wykonywane na spektrofluorymetrze SPEX tau 3, we współpracy z prof. Ryszardem Stolarskim (Zakład Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej UW) oraz na aparaturze dostępnej w IF PAN, dzięki uprzejmości prof. Marka Godlewskiego. Badania doświadczalne nad kinetyką białek będą ściśle sprzężone z modelowaniem teoretycznym. Jeden z możliwych punktów 'sprzęgnięcia' to porównanie kolejności zdarzeń zwijania przewidzianej w prostych modelach z kolejnością obserwowaną doświadczalnie. Drugi, to określenie roli temperatury w procesie zwijania i doświadczalne stwierdzenie, czy fakty-

cznie istnieje temperatura, która jest dla zwijania optymalna pod względem kinetycznym.

4. Analiza procesów mechanicznej manipulacji molekułami białek (punkt 2b)

Głównym zadaniem tej analizy będzie dostarczenie mikroskopowej interpretacji właściwości mechanicznych białek na podstawie wykresów siły potrzebnej na rozciągnięcie ich o zadaną odległość. Rozciągania białek dokonuje się za pomocą dwóch podstawowych technik: mikroskopu siły atomowej (AFM) oraz szczypców optycznych (Optical Tweezers). Każde badane białko ma swoją specyficzną zależność siły od przemieszczenia ciągniętego końca. Mikroskopowe zrozumienie takich zależności wymaga interpretacji teoretycznej i, jak dotąd, zostało wykonane w przypadku tylko nielicznych białek, w szczególności zaś dla tytyny – wielodomenowego białka odpowiedzialnego za elastyczność mięśni. Zadaniem zespołu będzie, m. in., wykonanie systematycznej analizy teoretycznej rozciągania wielu białek w ramach prostych modeli i dokonanie badań porównawczych.

Zespół będzie też uczestniczył w doświadczalnych pracach nad manipulacją wybranymi białkami. Będzie się to odbywało w laboratorium prof. Laszlo Forro w Ecole Polytechnique Federale de Lausanne w Szwajcarii również we współpracy z dr Małgorzatą Lekką z Instytutu Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie. W laboratorium w Lozannie będą też prowadzone badania EPR konformacji struktur białkowych wykonywane w warunkach wysokiego ciśnienia hydrostatycznego.

5. Badanie fizyki warstw lipidowych (punkt 2c)

Warstwy lipidowe będą otrzymywane na przykład z fosfolipidu cholinowego DMPC z wykorzystaniem technologii Langmuira-Blodgett, zaś technikami badawczymi będą mikroskopia siły atomowej i spektroskopia fluorescencyjna. Badane będą procesy łączenia się związków biologicznie aktywnych z błonami (rozpoznawanie molekularne) oraz procesy przenikania przez błony. Zrozumienie procesów przenikania prostych molekuł przez błony jest ważne, m. in., z punktu widzenia podstaw anestezjologii. Interesujące jest też wytwarzanie kompleksów nośnik-lek, które byłyby w stanie przekroczyć barierę błony komórkowej. W wypadku mózgu chodzi np. o dostarczenie leków psychotropowych a wypadku guza - leków antyrakowych. Potencjalnym lekiem jest molekula zwana "kapem", badana od wielu lat na Wydziale Fizyki UW. Kap stanowi koniec 5' transkryptów RNA, co można spróbować wykorzystać do blokowania białka hamującego apoptozę i indukującego transformację nowotworową. Kap jest silnie naładowany i przeniesienie go przez membranę wymaga odpowiedniego hydrofobowego nośnika. Na UW i SGGW prowadzone są prace nad zsyntetyzowaniem kapu z kwasem poliizomasłowym i innymi nośnikami. Zadaniem Zespołu będzie badanie mechanizmów przechodzenia takich kompleksów przez modelowe membrany i możliwość zastosowania dendromerów jako nowych nośników transportu. Zespół zamierza też podjąć analizę właściwości warstw okluzyjnych umieszczonych na skórze (jak kremy).

Badania nad tymi zagadnieniami będą prowadzone we współpracy z prof. Edwardem

Darżynkiewiczem z Zakładu Biofizyki UW, z prof. Zygmuntem Kazimierczukiem z Wydziału Chemii SGGW, z prof. Tomaszem Motylem z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, z dr. hab. Wojciechem Fabianowskim z Wydziału Chemii PW, z dr Jackiem Arctem z Wyższej Szkoły Zawodowej Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia, z prof. Ryszardem Dusiem z IChF, oraz z dr. Jarosławem Majewskim z Los Alamos National Laboratory w USA, uprzednio pracującym w SL1 w IF PAN.

6. Analiza właściwości fizycznych komórki w obecności stresu utleniającego (punkt 2d)

Technika mikroskopii siły atomowej będzie także stosowana do badania lokalnych własności mechanicznych komórek poddanych działaniu różnych czynników, w szczególności tzw. stresowi utleniającemu. Badania te prowadzone będą pod kątem procesów patologicznych, apoptozy, oraz terapii fotodynamicznej (zwłaszcza antyrakowej). Badania będą prowadzone w IF PAN (w początkowej fazie w laboratorium SL-3 kierowanym przez prof. Grzegorza Karczewskiego), a także w IFJ w Krakowie oraz w EPFL w Lozannie. Badania będą kontynuacją współpracy z prof. Alfredą Graczyk z WAT.

7. Oczekuje się, że w wielu podjętych tematach badawczych znajdą zastosowanie techniki rentgenowskie i synchrotronowe. Przykładem takiego tematu jest badanie struktur błon fosfolipidowych.

8. Działalność organizacyjna.

Zespół uzyskał pomieszczenia biurowe oraz pomieszczenie o powierzchni 100-m² w tzw. Hali C do przystosowania na laboratoria doświadczalne wraz ze stanowiskami do prac z odczynnikami chemicznymi. Środowiskowe Laboratorium 1 wystąpiło do Fundacji Nauki Polskiej o środki na remont Hali C. Obecnie realizowany jest zakup klastrera komputerowego. Zespół będzie też występował o środki grantowe na zakup aparatury badawczej: stanowiska badań EPR, wyciągarki membran techniką Langmuira-Blodgett, mikroskopu siły atomowej, oraz spektrofotometrów i spektrofluorometrów. W początkowym okresie planuje się wykorzystanie aparatury istniejącej już w IF PAN oraz w innych ośrodkach naukowych. Większość badań opisanych w tej Informacji została już rozpoczęta w dotychczasowej działalności osób wchodzących w skład zespołu. Najmniej doświadczenia ma Zespół w badaniach membran lipidowych i ta działalność będzie prowadzona od podstaw. Pierwszą konferencją organizowaną przez Zespół jest 'Workshop on Structure and Function of Biomolecules' w maju 2004 w Będlewie – w ramach działalności Europejskiego Centrum Doskonałości ASPECT, którego dyrektorem jest doc. Adrian Kozanecki.

Warszawa, 24 lutego 2004 r.

Prof. Marek Cieplak