



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej



80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, tel. (+48 58) 523 5010, fax (+48 58) 523 5012, e-mail: joanna.makowska@ug.edu.pl, www.chemia.ug.edu.pl

dr Joanna Makowska

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: Joanna Makowska

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- a) styczeń 2007 – doktor nauk chemicznych - Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk.
- b) czerwiec 2002– magister chemii – Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- a) kwiecień 2008 - obecnie: adiunkt na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego
- b) kwiecień 2007: asystent na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

Cykl prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej, stanowiących osiągnięcie naukowe (sumaryczny IF~21,166)

H1. J. Makowska, K. Bagińska, A. Liwo, L. Chmurzyński, H. A. Scheraga „Acidic-basic properties of three alanine-based peptides containing acidic and basic side chains: comparison between theory and experiment” *Biopolymers* **2008**, 90, 724-732, (IF=2,823).

H2. J. Makowska, K. Bagińska, A. Skwierawska, A. Liwo, L. Chmurzyński, H. A. Scheraga „Influence of charge and size of terminal amino-acid residues on local conformational states and shape of alanine-based peptides” *Biopolymers* **2008**, 90, 772-782, (IF=2,823).



UNIwersYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej



80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, tel. (+48 58) 523 5010, fax (+48 58) 523 5012, e-mail: joanna.makowska@ug.edu.pl, www.chemia.ug.edu.pl

dr Joanna Makowska

H3. J. Makowska, A. Liwo, L. Chmurzyński, H. A. Scheraga “Influence of the length of the alanine spacer on the acidic-basic properties of the Ac-Lys-(Ala)_n-Lys-NH₂ peptides (n=0, 1, 2,..., 5)” *Journal of Solution Chemistry* **2012**, 41, 10, 1738-1746, (IF=1,2).

H4. J. Makowska, A. Liwo, W. Żmudzińska, A. Lewandowska, L. Chmurzyński, H. A. Scheraga “Like-charged residues at the ends of an oligoalanine sequences might induce a chain reversal” *Biopolymers* **2012**, 97, 240-249, (IF=2,572).

H5. A Skwierawska, **J. Makowska**, S. Ołdziej, A. Liwo, H. A. Scheraga „Mechanizm of formation of the C-terminal β-hairpin of the B3 domain of the immunoglobulin binding protein G from Streptococcus. I. Importance of hydrophobic interactions in stabilization of β-hairpin structure” *Proteins: Structure Function and Bioinformatics* **2009**, 75, 4, 931-953, (IF=3,419).

H6. J. Makowska, D. Uber, L. Chmurzyński „Thermodynamics of protonation equilibria of two fragments of N-terminal β-hairpin of FPB28 WW domain”, *J. Phys Chem. B.* **2012**, 116, 653-659, (IF=3,603).

H7. J. Makowska, D. Uber, D. Lubowiecka, L. Chmurzyński „Studies of conformational preferences of derivatives fragments of protein G (IIGD) using temperature dependent potentiometric titration methodology” *J. of Chem Thermod.* **2014**, 70, 88-94, (IF=2,297).

H8. J. Makowska, W. Żmudzińska, D. Uber, L. Chmurzyński “NMR study of the influence of charged residues on β-hairpin formation” *The Protein Journal* **2014**, 33, 525–535, (IF=1,039).

H9. J. Makowska, D. Uber, L. Chmurzyński “Thermodynamical studies of the example peptide containing metaaminobenzoic acid (MABA) which promotes bends in proteins” *Journal of Solution Chemistry* **2015**, 44, 223-236, (IF=1,038) .

**dr Joanna Makowska****b) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania*****Badania fizykochemiczne i strukturalne nad wpływem naładowanych reszt aminokwasowych na tworzenie zwrotów oraz stabilizowanie struktury β w białkach*****Wstęp**

Białka są bardzo specyficznymi składnikami układów biologicznych o bardzo zróżnicowanej strukturze i wielkości. Aby mogły prawidłowo pełnić swoje funkcje każde z nich musi przyjąć unikalną strukturę zwaną "natywną", w procesie zwanym zwijaniem lub fałdowaniem (ang. *folding*). Nieprawidłowości zwijania białek będące wynikiem mutacji ich fragmentów powstałych w wyniku agregacji podczas niekontrolowanej proteolizy prowadzą często do wielu poważnych schorzeń, a nawet śmierci. Obecnie znanych jest ponad 40 chorób wywołanych błędnym sfałdowaniem białek (ang. *misfolding*). Wspomnieć tu należy chociażby chorobę Alzheimera, jako jedną z tzw. chorób "amyloidowych", w których amyloidowe złogi pochodzące z różnych białek są bezpośrednią lub pośrednią przyczyną śmierci [1]. Nasze zrozumienie głównych praw rządzących zwijaniem i rozwijaniem łańcucha polipeptydowego pozwala nam uświadomić sobie ich ogromną rolę w zakresie procesów komórkowych, od ich transportu po regulację cyklu komórkowego. Wyzwania stojące przed obecną biochemią to poznanie procesów konformacyjnych, którym podlegają białka, procesów agregacji i oligomeryzacji [2] oraz mechanizmu działania tzw. białek bezstrukturalnych. Zasadniczym powodem, dla którego pełna znajomość praw rządzących fałdowaniem jest tak istotna jest to, że metodami inżynierii genetycznej jesteśmy obecnie w stanie syntetyzować białka o dowolnej sekwencji, natomiast synteza np. enzymów o zadanych własnościach katalitycznych jest wyzwaniem, które czeka na zrealizowanie. Aby jednak zadanie to mogło być wykonane, musi być spełniony m. in. warunek dotyczący możliwości zaprojektowania precyzyjnych cech wiązań wewnątrz układu, tworzących się na początku całego mechanizmu reakcji powstawania ostatecznej struktury.

Ogromna większość białek posiada, w warunkach fizjologicznych, jednoznaczną strukturę trójwymiarową zależną tylko od ich sekwencji aminokwasowej. Wyjątkiem są ostatnio odkryte tzw. białka plastyczne (ang. *natively unfolded proteins*), które ostateczną strukturę uzyskują pod wpływem oddziaływań z miejscem wiązania [3]. Struktura trójwymiarowa danego białka zależy od sekwencji aminokwasowej z jakiej jest złożona [4] i jest stabilizowana wiązaniami wodorowymi, hydrofobowymi oraz siłami van der Waalsa [5]. Zgodnie z hipotezą termodynamiczną Anfinsena [4] struktura białka, to struktura charakteryzująca się minimalną energią swobodną w rozpuszczalniku. Znalezienie tej optymalnej struktury metodą przypadkowego przeszukiwania jest jednak niemożliwe gdyż, nawet przy założeniu, że pojedyncze białko składające się ze 100 aminokwasów, z których każdy może przyjmować zaledwie 2 konfiguracje, otrzymujemy 10^{30} możliwych konformacji łańcucha polipeptydowego. Zakładając dalej, iż przejście jednej konformacji w drugą zajmuje zaledwie 10^{-11} s losowe poszukiwanie natywnej konformacji może zająć nawet 10^{11} lat podczas, gdy zwijanie białek zachodzi w czasie $\sim 10^{-6}$ do $\sim 10^{-2}$ s ("paradoks Levinthala") [6]. Musi zatem istnieć jakiś „szlak”, zwany mechanizmem zwijania, który minimalizuje losowość tego procesu.

Początkowo nie było jasnego rozwiązania paradoksu Levinthala. Tanford i jego współpracownicy w roku 1966 stwierdzili, że w obecności silnie denaturujących czynników, cząsteczki białek mają strukturę przypadkowego kłęбка (ang. *statistical coil*) bez żadnego elementu, który odpowiadałby natywnej strukturze [7]. Model przypadkowego kłęбка stał się standardem do interpretowania danych uzyskanych na drodze eksperymentu, odnoszących się do nieuporządkowanych, „rozwinętych” białek i jako wyjściowy punkt dla większej części rozważań teoretycznych procesu zwijania białek. W roku 1969 Flory opisał w swojej pracy [8] teorię odnoszącą się do izolowanych par kątów ϕ i ψ (ang. *isolated-pair hypothesis*). Stwierdził za niemożliwe zdefiniowanie jakiegokolwiek konformacji dla pierwszego stadium w procesie zwijania białek. Jednakże, w roku 1973 Tiffany i Krimm [9] zasugerowali, że kształt widma UV-CD dla denaturowanych białek wskazuje na dużą obecność konformacji poli-L-proliny II (P_{II}), nawet dla sekwencji ubogich w reszty prolinowe, co zawęziłoby silnie zbiór możliwych konformacji wyjaśniając częściowo paradoks Liventhala. W roku 2004 Plaxco [10] i jego współpracownicy poparli tezę Tanforda i jego grupy twierdząc, że chemicznie zdenaturowane białka spełniają warunki dla statystyki przypadkowego kłęбка. Według nich rozmiar czy typ lokalnej struktury łańcucha głównego w stanie zdenaturowanym nie został jeszcze poznany. Oznaczało to, że proteiny o tak niezdefiniowanej budowie mogą należeć do

dowolnej przestrzeni na mapie Ramachandrana. Jednak wielu badaczy, szczególnie grupa badawcza Kallenbacha [11], analizując wyniki badań konformacyjnych modelowych peptydów posunęło się nawet do stwierdzenia, że P_{II} jest nie tylko lokalnym stanem konformacyjnym, ale również można go uznać za dominującą konformację, która występuje w peptydach. Rozpowszechnili oni również opinię, że P_{II} odgrywa fundamentalną rolę w procesie zwijania białek, uznając ją za początkowy stan dla tego procesu [11].

Powszechnie jest znane, że dla stosunkowo małych rozmiarów cząsteczek peptydów nie ma sensu pojęcie jednoznacznie określonej konformacji. W tym przypadku należy mówić raczej o zbiorze możliwych konformacji peptydu. Przeprowadzone przeze mnie i współpracowników wcześniejsze badania NMR [12] dowiodły, że konformacja P_{II} występuje jako stan lokalny w resztach aminokwasowych w peptydach i rozwiniętych (zdenaturowanych) białkach, a nie jako stan określający typ zwinięcia łańcucha we wczesnych etapach zwijania. Pomimo, że dominacja konformacji P_{II} ogranicza liczbę stanów konformacyjnych reszt łańcucha, nie jest to stan specyficzny i dlatego jego tworzenie nie może być decydujące we wczesnych etapach zwijania. Centrami inicjacji mogą być natomiast zgięcia (zwroty) łańcucha występujące w ściśle określonych miejscach sekwencji.

Do dnia dzisiejszego zaproponowano trzy podstawowe modele mechanizmów zwijania białek [13]: model szkieletowy (ang. *framework model*), model hydrofobowego zapadania się (ang. *hydrophobic collapse*) oraz model nukleacji-kondensacji (ang. *nucleation-condensation*). W modelu szkieletowym pierwszym etapem jest formowanie się regularnych fragmentów struktury drugorzędowej, które następnie składają się razem w regularną strukturę trzeciorzędową. W modelu hydrofobowego zapadania się, nieuporządkowana, zapadnięta struktura utrzymująca się dzięki oddziaływaniom hydrofobowym następnie przechodzi w strukturę natywną. W modelu nukleacji-kondensacji, w pierwszym etapie zaczynają się wytwarzać miejsca tzw. Nukleacji; są to krótkie fragmenty struktury drugorzędowej (najczęściej zgięcia), które katalizują późniejszy folding. Wszystkie te drogi prowadzą poprzez nie jeden ale kilka etapów, do struktury natywnej. Pierwszy z etapów zwijania wydaje się być najważniejszy.

Tworzenie zwrotów jako centrów inicjacji zwijania poprzez asocjację reszt hydrofobowych zostało po raz pierwszy zaproponowane przez Mathesona i Scheragę [14]. Muñoz i współpracownicy [15] zaproponowali mechanizm tworzenia zwrotów w β -spinkach poprzez „dopinanie” wiązań wodorowych i oddziaływań hydrofobowych. Karplus i

współpracownicy [16] podkreślili dominującą rolę hydrofobowego „zapadania się” tej części sekwencji.

O ile wiedza na temat mechanizmu powstawania, stabilności i zależności struktura-sekwencja dla struktur α -helikalnych jest dość duża to podobna wiedza dotycząca struktur typu β -kartki na razie nie jest znana, a stanowi nieodzowny element niezbędny do zrozumienia procesu fałdowania protein. Przedstawione wyniki badań w opublikowanych, składających się na mój cykl habilitacyjny pracach, miały na celu wyjaśnienie czy obecność dodatnio naładowanych reszt po obu stronach fragmentu sekwencji wymusza zwrot tego fragmentu łańcucha. Taki mechanizm powstawania zwrotów nie został dotąd zaproponowany. Wyniki badań uzyskane przeze mnie w trakcie ostatnich kilku lat pokazały, że oddziaływania występujące tylko pomiędzy naładowanymi resztami okalającymi niepolarny łańcuch peptydowy, to kolejny rodzaj oddziaływań (oprócz stwierdzonych już kluczowych oddziaływań hydrofobowych, lokalnych i mostków solnych), który inicjuje zwijanie łańcucha (pierwszy etap nukleacji). W dalszej części mojego autoreferatu chciałabym scharakteryzować wyniki moich badań, które zostały zebrane w 9 publikacjach [H1-H9] z tzw. *listy filadelfijskiej*, będących osiągnięciem naukowym i wykorzystanych przeze mnie w postępowaniu habilitacyjnym.

Opis osiągnięć naukowych

Szczegółowa wiedza na temat zależności dysocjacji protolitycznej grup bocznych reszt aminokwasowych o właściwościach kwasowo-zasadowych od wartości pH w stanie zwiniętym oraz rozwiniętym w przypadku białek jest niezbędna dla zrozumienia roli oddziaływań elektrostatycznych w stabilizowaniu struktury ostatecznej protein [17]. Stan sprotonowania grupy zdolnej do jonizacji jest uzależniony od pH rozpuszczalnika i wartości pK_a danej grupy. Wartość pK_a dla danej grupy, z kolei zależy od jej otoczenia czyli pola elektrostatycznego w jakim się znajduje, które jest określone przez konformację jaką białko przyjmuje oraz stanu sprotonowania innych grup zdolnych do jonizacji obecnych w sekwencji [18].

W pierwszej pracy wchodzącej w skład rozprawy habilitacyjnej [H1], zgromadzone zostały wartości pK_a , wyznaczone przy zastosowaniu metody miareczkownia potencjometrycznego w wodzie oraz metanolu, dla reszt jonizowalnych obecnych w trzech peptydach opartych o łańcuch heptaalaninowy o następujących sekwencjach: Ac-KK-(A)₇-

KK-NH₂ (KAK), Ac-OO-(A)₇-DD-NH₂ (OAD) oraz Ac-KK-(A)₇-EE-NH₂ (KAE), (O, A, D, K i E, to skróty jednoliterowe reszt: ornityny, alaniny, kwasu asparaginowego, lizyny oraz kwasu glutaminowego). Reszty jonizowalne obecne w powyżej wspomnianych peptydach różniły się od siebie rodzajem oraz długością łańcuchów bocznych. Krzywe otrzymane w wyniku miareczkowania potencjometrycznego zostały dopasowane w oparciu o model równowag kwasowo-zasadowych za pomocą programu STOICHIO [19,20], który jest oparty na nieliniowej analizie konfluencji. Program ten bazuje na algorytmie opierającym się na modelu równowag zachodzących w roztworze podczas miareczkowania, w oparciu o dane uzyskane podczas eksperymentu. W kolejnym etapie dopasowania zostają dobrane nieznanne parametry w taki sposób, aby zakładany model teoretyczny pokrywał się z danymi uzyskanymi doświadczalnie. Parametry dobierane są zgodnie z metodą Gaussa-Newtona-Marquarta, czyli iteracyjnej metody rozwiązywania zagadnień liniowych. Zaletą tej metody obliczeniowej jest fakt, iż umożliwia ona wyznaczenie wartości stałych równowag bez względu na ich stopień złożoności. Program ten może rozpatrywać każdy model równowag chemicznych i bierze pod uwagę wszystkie możliwe źródła błędu doświadczalnego (błąd w EMF, objętości roztworu mianowanego titranta, zanieczyszczenia odczynników, itp.). Wszystkie peptydy poddane badaniu (KAK, OAD, KAE) były traktowane jako kwasy czterofunkcyjne, a wszystkie cztery wartości pK_a zostały założone jako parametry do ustalenia. Model równowagi chemicznej składał się z postępującego stopniowo procesu odszczepienia protonów z peptydu i reakcji dysocjacji wody, która została wprowadzona do układu za pomocą miareczkowania roztworem metanolu, wodorotlenku tetra-butylamoniowego, który wytwarza wodę w wyniku reakcji z grupami kwasowymi peptydu. Wzięto również pod uwagę fakt, że peptydy mogą zawierać nadmiar kwasu (najprawdopodobniej domieszki TFA), który w wyniku procesu oczyszczania peptydów pozostał w cząsteczkach układu peptydowego (efekt uboczny).

Różnice w wartościach pK_a wyznaczonych dla reszt jonizowalnych obecnych w badanych związkach można wyjaśnić jakościowo wpływem wytworzonego przez jedną z grup zdolnych do odszczepiania protonu pola elektrostatycznego na drugą grupę aminokwasową. W przypadku obydwu peptydów: Ac-OO-(A)₇-DD-NH₂ (OAD) oraz Ac-KK-(A)₇-EE-NH₂ (KAE), wartości pK_{a1} są niższe od wartości referencyjnych, które odpowiadają związkom modelowym reprezentującym dane łańcuchy boczne (patrz tabela I i II w **H1**) ze względu na wpływ dodatniego pola elektrostatycznego wytworzonego przez reszty zasadowe z drugiego końca cząsteczki. Otrzymane wartości stałych pK_{a2} są większe w

związku z wpływem pola elektrycznego wytworzonego przez ujemnie naładowane zdeprotonowane sąsiednie grupy karboksylowe. Dla KAK, pK_{a1} (w wodzie) lub pK_{a1} i pK_{a2} (w metanolu) są o około 1 jednostkę niższe niż pK_{a2} , pK_{a3} i pK_{a4} (w wodzie) lub pK_{a3} i pK_{a4} (w metanolu) (patrz tabele I i II w **H1**) ze względu na wpływ ładunku dodatniego pochodzącego z sąsiedniej dodatnio naładowanej sprotonowanej grupy aminowej. Różnice w wartościach pK_a wykazały, że wszystkie trzy peptydy, których skład aminokwasowy był oparty o łańcuch heptaalaninowy prawdopodobnie mają tendencję do przyjmowania bardziej kompaktowej struktury niż rozciągnięta czy P_{II} .

Następstwem obserwacji wynikających z badań opisanych w **H1**, było przeprowadzenie dalszych uzupełniających badań konformacyjnych trzech opisanych powyżej systemów, z zastosowaniem metod eksperymentalnych CD (spektroskopii dichroizmu kołowego) i NMR (spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego) oraz obliczeniowych: dynamiki molekularnej (MD) przy uwzględnieniu ograniczeń wynikających z danych eksperymentalnych NMR [**H2**]. Pomiar CD pokazały, że wszystkie trzy peptydy występują w roztworze wodnym jako zbiór konformacji, w których dominuje lokalnie P_{II} rzędowa struktura kłębka statystycznego. Pewien wzrost procentowy struktury typu P_{II} uzyskać można było dodając mocznik do badanych roztworów; obserwacja ta została potwierdzona wynikami uzyskanymi z pomiarów mikrokalorymetrycznych przeprowadzonych przy zastosowaniu DSC (różnicowa kalorymetria skaningowa) w postaci braku wyraźnego piku na krzywej pojemności cieplnej, który pojawia się zawsze, gdy następuje zdecydowane przejście fazowe dla układów o dobrze określonej, stabilnej strukturze. Otrzymane w wyniku symulacji MD z ograniczeniami wynikającymi z przeprowadzonego eksperymentu NMR zbiory dominujących konformacji wskazały na brak odcinków w sekwencji, które odpowiadałyby strukturze P_{II} rzędowej typu α -helisa, rozciągnięta β kartka lub P_{II} . Podobne wyniki otrzymano we wcześniejszym badaniu sekwencji XAO [13], chociaż P_{II} stanowiła w tym przypadku dużą część z dostępnych stanów konformacyjnych.

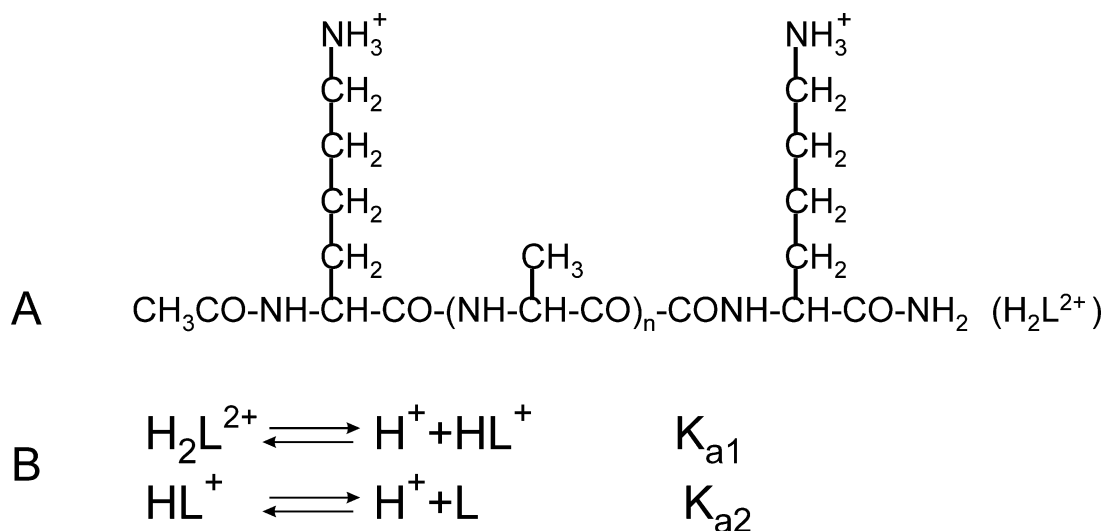
Dla peptydu KAK, stany konformacyjne odpowiadające konformacji P_{II} były najbardziej charakterystyczne (najgłębsze minimum potencjału średniej siły (PMF) w funkcji kątów ϕ i ψ dla siedmiu reszt alaninowych budujących rdzeń peptydu); P_{II} wraz z konformacją rozciągniętą zdominowały cały zbiór lokalnych konformacji. Peptydy KAK i KAE różniły się kształtem od OAD. W przypadku peptydu OAD najbardziej dominujące

konformacje miały kształt zagięty, z leżącymi dość blisko siebie naładowanymi resztami aminokwasowymi znajdującymi się na przeciwległych końcach. Pozostałe dwa peptydy charakteryzowały się kształtem bardziej rozciągniętym. Na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań można zauważyć, że w podobny sposób układał się łańcuch peptydu XAO oparty o rdzeń oligoalaninowy, który miał również wygięty kształt i jego końce znajdowały się w pobliżu siebie [13,21]. Z powyższych badań wynika zatem, że różnica w budowie trzech peptydów wynika raczej z długości łańcuchów bocznych reszt zdolnych do jonizacji, a mniej od tego czy są one naładowane równo- czy też różnoimiennie. Jeżeli łańcuch boczny reszty zdolnej do jonizacji nie jest wystarczająco krótki, to posiada dużą (nadmiarową) entropię, która przekłada się na większą swobodę konformacyjną i jednocześnie na mniejsze zaangażowanie w ochronie hydrofobowego (niepolarnego), centralnego fragmentu sekwencji. Dodatkowo możliwym jest, że tworzenie mostków solnych pomiędzy przeciwnie naładowanymi końcami łańcucha w sekwencji OAD okazało się być w tym przypadku mniej istotne dla ostatecznego kształtu konformacji. Przy zastosowaniu miareczkowania potencjometrycznego wyznaczono w wodzie dla grup kwasowych obecnych w sekwencji OAD wartości $pK_{a1} = 3,46$, $pK_{a2} = 4,67$ [H1]. Zaobserwowano, że wartość pK_{a1} jest rażąco niska, co przedstawiło dowody na bliskość w sekwencji naładowanych reszt kwasowych. Różnica pomiędzy wartościami pK_{ai} dla reszt zdolnych do jonizacji powinna się zmniejszać (ale nie do zera) gdy wydłuża się długość odcinka separującego te dwie reszty od siebie, tak jak w przypadku kwasów dikarboksyłowych, dla których wraz ze wzrostem długości metylenowego segmentu separującego, czynnik statystyczny z zależność $K1/K2$ równy jest 4 [22].

Wyniki badań przedstawionych powyżej [H1, H2, 13,21] pozwoliły na zaproponowanie hipotezy, że wygięty kształt łańcucha peptydowego jest charakterystyczny dla oligopeptydów oflankowanych resztami aminokwasowymi o jednoimiennie lub przeciwnie naładowanych łańcuchach bocznych, pod warunkiem że długość odcinka separującego (w tym segment łańcucha głównego i łańcuchów bocznych) między naładowanymi resztami aminokwasowymi wystarczy do tworzenia zagiętej struktury, a jednocześnie, że będzie wystarczająco krótka żeby spadek energii swobodnej układu w wyniku otoczenia rdzenia hydrofobowego eksponowanymi na rozpuszczalnik resztami naładowanymi nie został przeważony spadkiem entropii konformacyjnej wskutek utworzenia „pierścieniowej” struktury zgiętej. Peptydy są w stanie uzyskać kształt zagięty prawdopodobnie dlatego, że naładowane łańcuchy boczne aminokwasów zdolnych do

jonizacji wymuszają zagięcie niepolarniej sekwencji alaninowej, jednocześnie chroniąc reszty niepolarne od kontaktów z rozpuszczalnikiem.

W dalszym etapie pracy zbadalam właściwości kwasowo-zasadowe serii peptydów rozpuszczalnych w wodzie o ogólnym wzorze Ac-Lys (A)_n-Lys-NH₂, w którym *n* zawierało się w przedziale od 0 do 5 [H3]. Za pomocą metody miareczkowania potencjometrycznego, wyznaczyłam wartości pK_a w wodzie dla dwóch końcowych grup lizynowych w sześciu peptydach alaninowych różnicując sekwencje za pomocą wprowadzanego o różnej długości odcinka separującego zbudowanego z reszt alaninowych: Ac-Lys-Lys-NH₂ (KK), Ac-Lys-Ala-Lys-NH₂ (KAK), Ac-Lys-Ala-Ala-Lys-NH₂ (KAK2), Ac-Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-NH₂ (KAK3), Ac-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-NH₂ (KAK4), Ac-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-NH₂ (KAK5). Obecność tylko jednego typu reszt zdolnych do jonizacji na każdym końcu sekwencji umożliwiła mi wyraźną ocenę wpływu długości alaninowego separatora na kwasowo-zasadowe właściwości dwóch jednakowo naładowanych grup aminokwasowych znajdujących się w sekwencji peptydowej, w przeciwieństwie do poprzednich badań, gdzie występujące na każdym końcu łańcucha reszty były różniamiennie naładowane, dla których druga wartość pK_a mogła odpowiadać procesowi protonowania lub deprotonowania reszty.

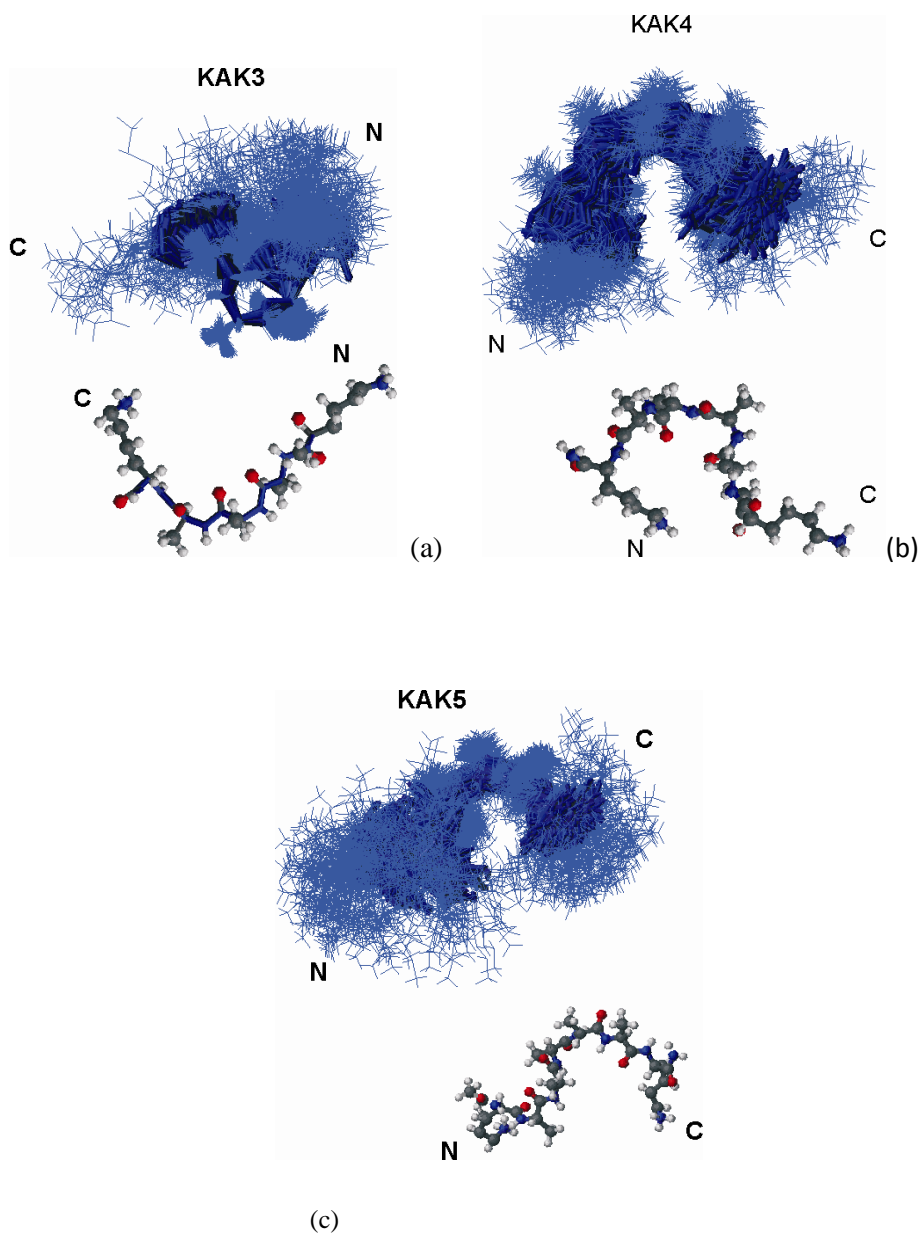


Rysunek 1. (A) Ogólny schemat struktury badanych peptydów i (B) równowagi kwasowo-zasadowe ustalające się w układzie o ogólnym wzorze Ac-Lys (A)_n-Lys-NH₂ (n=0,1,..,5). (Schemat 1 w H3)

Wyniki przedstawione w publikacji H3 wykazały, że wartości stałej pK_{a1} są znacznie mniejsze w porównaniu z wartością odpowiadającą n-butyloaminie, która może być

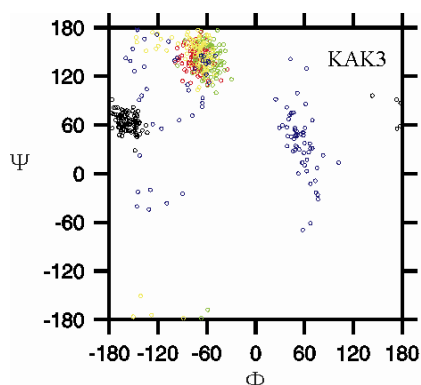
uznana za model łańcucha bocznego lizyny, dla sekwencji KK, KAK, KAK2, KAK3. Jednakże liczba odpowiadająca różnicy $pK_{a2}-pK_{a1}$ jest nadal większa niż czynnik statystyczny $\log_{10}(4)$ (uznany za ograniczenie wartości różnicy w wartości pK_a dla kwasów dikarboksylowych odseparowanych dość długim odcinkiem zbudowanym z reszt metylenowych [22]), nawet dla sekwencji KAK5. Wykluczając w dalszych rozważaniach peptydy KK i KAK z serii badanych układów, dla których dwie grupy lizyny znajdują się bardzo blisko siebie, można zaobserwować, że dwie naładowane grupy lizyny mimo zwiększającego się pomiędzy nimi dystansu (wzrost liczby oddzielających je reszt alaniny) znajdują się w dość bliskim sąsiedztwie, co oznacza tworzenie się zagięcia na łańcuchu dla tych dłuższych peptydów. To potwierdza hipotezę podaną we wcześniejszej pracy [**H1**]. Jednakże, w celu uzyskania dalszych dowodów, było wymagane przeprowadzenie bardziej dokładnych badań konformacyjnych dla peptydów KAK_n .

Dlatego też, w kolejnym etapie postanowiłam zbadać wpływ długości łańcucha alaninowego na preferencje konformacyjne peptydów o ogólnym wzorze $Ac-K-(A)_nK-NH_2$, gdzie $n = 3, 4$ i 5 przy wykorzystaniu technik eksperymentalnych CD oraz NMR. Dane doświadczalne, które opublikowałam w publikacji **H4** wskazały, że wszystkie trzy peptydy występują w roztworze wodnym w przeważającej ilości w postaci konformacji, które charakteryzują się w swojej budowie lokalnymi preferencjami do tworzenia zagięcia oraz przyjmują lokalnie formy kłęбка statystycznego. Powyższe obserwacje potwierdziłam za pomocą badań mikrokalorymetrycznych (DSC). Na krzywej kalorymetrycznej brak było wyraźnie zaznaczonego przejścia fazowego dla wszystkich układów, które jest charakterystyczne dla przypadków gdy ma miejsce przemiana fazowa dla struktury stabilnej o dobrze określonej konformacji. Przeprowadzone symulacje MD z ograniczeniami wynikającymi z uprzednio przeprowadzonego eksperymentu NMR wskazały na brak jednej regularnej struktury drugorzędowej (α -helisy lub rozciągniętej struktury) oraz pokazały że peptydy posiadają zagięty kształt. Prawdopodobnym powodem tego zjawiska jest tendencja do osłaniania niepolarnego odcinka alaninowego przez uwodnione naładowane reszty lizyny znajdujące się na obydwu końcach sekwencji. Kiedy łańcuch alaninowy staje się dłuższy, naładowane grupy lizyny są w znacznej odległości od siebie (co przejawiało się zwiększonymi wartościami pK_{a1} [**H3**]) chociaż wygięty kształt jest utrzymywany (patrz rysunek 2). Dla najdłuższych sekwencji z serii, zostały zarejestrowane podczas pomiarów NMR oddziaływania dalekiego zasięgu, tzw. sygnały ROE (rysunek 3 w **H4**).

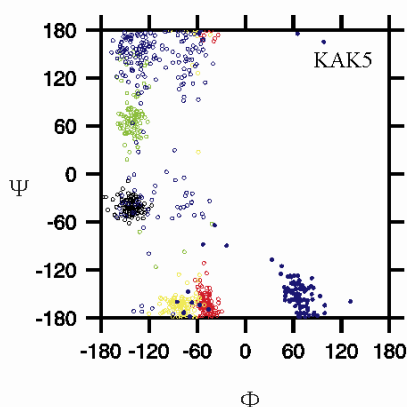
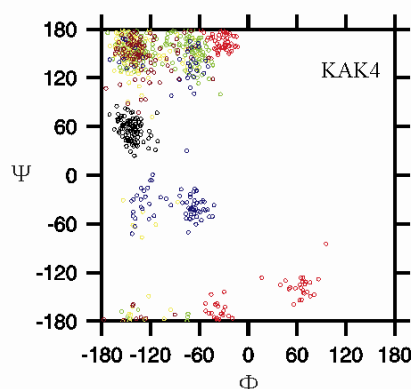


Rysunek 2 Zbiory konformacji peptydów: (a) KAK3, (b) KAK4, oraz (c) KAK5 (MD w T=298 K) wyznaczone metodą klastrowania za pomocą programu MOLMOL. Dla każdej rodziny, łańcuchy C_{α} dla wszystkich konformacji są wyświetlane jako niebieskie linie; łańcuch główny dla wybranej reprezentatywnej konformacji każdej z rodzin jest przedstawiony w reprezentacji „stick”; zaznaczone zostały N-i C-końce cząsteczki. (Figura 4 **H4**)

Przeanalizowałam również stany konformacyjne lokalnie ustalające się w badanych peptydach. Na diagramach (mapach tzw. Ramachandrana) przedstawiłam zależności punktowe dla stanów konformacyjnych charakterystycznych dla każdego aminokwasu obecnego w sekwencjach KAK3, KAK4 i KAK5, które wygenerowałam na podstawie obliczeń MD z ograniczeniami NMR i przedstawiłam na rysunku poniżej (Rysunek 3).



Rysunek 3. Zależność kątów dwuściennych (ϕ i ψ) dla wszystkich reszt aminokwasowych obecnych w sekwencji peptydowej (1000 ostatnich konformacji wyznaczonych na podstawie MD z zastosowaniem informacji pochodzących z NMR): (a) KAK3: Lys1 (czarny), Ala2 (czerwony), Ala3 (zielony), Ala4 (żółty), Lys5 (fioletowy), (b) KAK4: Lys1 (czarny), Ala2 (czerwony), Ala3 (zielony), Ala4 (żółty), Ala5 (brązowy), Lys6 (fioletowy), (c) KAK5: Lys1 (czarny), Ala2 (czerwony), Ala3 (zielony), Ala4 (żółty), Ala5 (brązowy), Ala6 (fioletowe punkty), Lys7 (fioletowy).



Najbardziej wypełnione na mapie miejsca, to obszar, który jest charakterystyczny dla układów mających tendencję do tworzenia β oraz zagiętych struktur. W przypadku peptydów KAK3 i KAK4 reszty alaniny miały największą skłonność do wypełniania na mapie regionu charakterystycznego dla β struktur, podczas gdy dla KAK5 oprócz reszt alaniny jedna z lizyn również znajdowała się w regionie charakterystycznym dla β (około $\phi = -60^\circ$, $\psi = -160^\circ$).

Dostępne dane literaturowe pokazują, że część proponowanych motywów strukturalnych pojawiających się w białkach może tworzyć podobne do tych obserwowanych w natywnie zwiniętych białkach również wtedy, gdy są badane jako fragmenty peptydowe w izolacji od trzeciorzędowej struktury całego białka [23] chociaż

wyzolowane fragmenty pozbawione są zwykle drobnych szczegółów, np. wiązań wodorowych. Takie fragmenty peptydowe mogą odgrywać ważną rolę w inicjowaniu mechanizmu zwijania białka za pośrednictwem wywoływania lokalnych interakcji, stanowiąc tzw. centra nukleacji [11,24]. Doniesienia literaturowe są bogate w wyniki badań nad kinetyką i termodynamiką powstawania α -helikalnej struktury w peptydach [25-32]. Przykładowo, wiele badań wykazało, że zastąpienie wewnętrznych reszt aminokwasowych tworzących lokalnie struktury α -helikalne resztami alaniny ma znaczny wpływ na stabilność α -helikalną peptydów. Doprowadziło to do udanej konstrukcji w roztworze wodnym pojedynczych monomerycznych helikalnych peptydów charakteryzujących się wysoką zawartością reszt alaninowych oraz wytworzonymi wewnątrz kilkoma mostkami solnymi [33], a także prostych sekwencji peptydowych o wysokiej zawartości alaniny z kilkoma resztami lizyny, dzięki którym następuje zawsze wzrost rozpuszczalności takich układów [34]. O ile wiedza na temat mechanizmu powstawania i stabilności struktur α -helikalnych jest dość duża, to podobna wiedza dotycząca struktur typu β -kartki na razie nie jest znana, a stanowi nieodzowny element niezbędny do zrozumienia bardziej skomplikowanego procesu, a mianowicie fałdowania białek.

Pierwsze doniesienia literaturowe na temat spontanicznie tworzącej się konformacji β w roztworze wodnym dotyczyła 17 aminokwasowego fragmentu pochodzącego z N-końca ubikwityny [7,35]. Jednakże, zauważono, że peptyd w roztworze wodnym przyjmuje tylko 20% regularnej struktury typu β [23,35]. Badania nad innymi peptydami, pochodzącymi z tendamistatu [36], z domeny B1 białka G [36,37] oraz ferredoksyny [38] wykazały, że peptydy mogą charakteryzować się strukturą β jednocześnie istniejąc w postaci monomerycznej, bez tendencji do agregacji, lecz w większości przypadków zaobserwowano bardzo ograniczoną tendencję do zaginania układów z powodu braku kontaktów występujących w trzeciorzędowej strukturze.

Blanco i współpracownicy [37] badali 16-aminokwasowy odcinek domeny B1 białka G (IIGD) występujący na C-końcu tej sekwencji białkowej i wykazali, że tworzenie się badanego fragmentu stanowi pierwszy etap zwijania się całej proteiny w wodzie. Ten peptyd pozostał w formie monomeru nawet w próbkach o dużym stężeniu [37]. Szacowano, że przyjmuje on ok. 40% struktury typu β takiej samej jaką przyjmuje w natywnym białku, i w związku z tym, spekulowano, że stanowi on miejsce inicjacji łańcucha całego białka czyli może stanowić tzw. centrum nukleacji, zainicjując

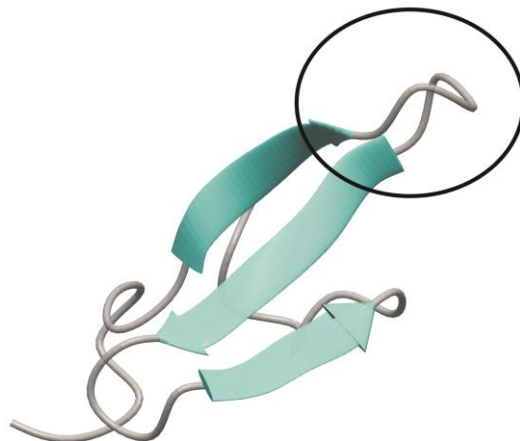
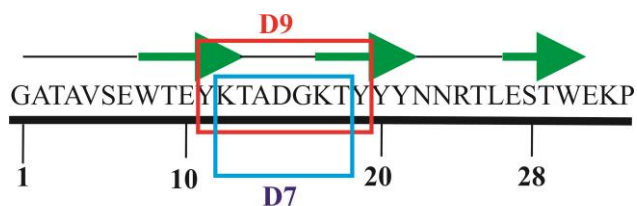
fałdowanie reszty białka. Z drugiej strony, badania przeprowadzone przez Blanco i współpracowników wykonano w bardzo niskiej temperaturze, w której struktura jest zwykle bardzo stabilna [39]. Tego typu wyniki zatem nie mogą bezpośrednio określić mechanizmu fałdowania białka, dla którego temperatura zwijania jest w rzeczywistości znacznie wyższa (temperatura zwijania domeny B w białku G wynosi około 353K) [40,41].

W publikacji **H5** zostały zamieszczone wyniki badań konformacyjnych dla dwóch peptydów (12- i 14-resztowych sekwencji peptydowych), wyizolowanych z białka G pochodzącego z bakterii *Streptococcus* wiążącego immunoglobulinę, ściśle z C-końcowego fragmentu domeny B3 [42] (patrz rysunek 1 w **H5**). To białko, jak również każda z domen zawartych w białku G, posiada strukturę trzeciorzędową kompaktową, ma mały rozmiar i bardzo wysoką stabilność termiczną. Te cechy sprawiają, że każdy fragment domeny B3 jest idealnym systemem do badania procesu zwijania oraz stabilności białek [40,43-46]. Wcześniej wykazano [47], że 16-aminokwasowy fragment C-końcowego odcinka domeny B3 białka G pochodzącego ze *Streptococcus* przyjmuje podobny kształt jaki zaobserwowano w natywnym białku właściwie w każdej temperaturze. Jednakże okazało się, że struktura stabilizowana jest głównie oddziaływaniami hydrofobowymi tworzącymi się pomiędzy łańcuchami bocznymi reszt niepolarnych, a nie przez wiązania wodorowe, co sugerowane było w poprzednich badaniach [37,48]. Ten fragment 16-aminokwasowy wykazywał bardzo wysoką stabilność termiczną w $T \sim 320$ K, ustaloną przy zastosowaniu różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) [47]. Sugerując się wyżej opisanymi badaniami zsyntetyzowano i zbadano dwa krótsze fragmenty peptydowe pochodzące z fragment C-końcowego odcinka domeny B3 białka G. Wyniki przedstawione w publikacji **H5** wykazały, że oba badane peptydy (12- oraz 14-aminokwasowe) (1IGD (48-59) 1IGD (47-60), patrz rysunek 1 w **H5**), mogą tworzyć w roztworze struktury zbliżone kształtem do struktury typu β , a dodatkowo potwierdzono, że struktura jest w głównej mierze stabilizowana przez oddziaływania hydrofobowe.

Dla obydwu badanych peptydów uwidoczniła została następująca wspólna cecha strukturalna: część sekwencji od reszty Asp52 do Lys55 zawsze ma przewagę struktury β we wszystkich rozważanych dla układu temperaturach, niezależnie od długości łańcucha peptydowego. Ponieważ ta część sekwencji domeny B3 w białku G charakteryzuje się ściśle ustalonymi preferencjami konformacyjnymi, to sugeruje, że ta właśnie niewielka

część białka może być uważana za miejsce inicjacji zwijania całego łańcucha niezależnie od przyjętych warunków zewnętrznych. We fragmencie Asp52-Lys55, na podstawie badań NMR, zaobserwowano, że kilka amidowych protonów posiada bardzo niskie współczynniki temperaturowe. To potwierdza hipotezę, że region o zdefiniowanej strukturze, jest zdolny do efektywnego ekranowania amidowych protonów od środowiska rozpuszczalnika. Ten efekt ochronny jest zazwyczaj związany z tworzeniem się wewnątrz struktury, wiązania wodorowego. Dane przedstawione w **H5** sugerują, że jeśli tworzenie wiązania wodorowego jest możliwe, to jest to proces bardzo dynamiczny; jeden proton amidowy o niskim współczynniku temperaturowym może tworzyć wiązania wodorowe z różnymi atomami akceptorowymi. Niemniej jednak, powstawanie tych dynamicznych wiązań wodorowych może przekładać się w dużej mierze na całkowitą stabilność tego regionu. Zauważono, że w celu dalszego wyznaczenia mechanizmu powstawania β struktury należy wykonać badania konformacyjne, nawet krótszych sekwencji (sześćo-aminokwasowych), aby ocenić znaczenie oddziaływań hydrofobowych w stabilizacji struktury, a co dalej idzie wyznaczyć wpływ na stabilność i tworzenie się miejsca inicjacji zwijania łańcucha całego białka. Zauważyłam że część, która tworzy zagiętą strukturę w domenie B3 białka G (kod PDB 1IGD Rys 1 w pracy **H5**), jest zbudowana w taki sposób, że reszty tworzące środkową część zagięcia są otoczone szeregiem naładowanych reszt aminokwasowych. Cała część, która ma kształt wygięty znajduje się w dużej odległości od reszty struktury. Uważałam, że jest bardzo prawdopodobnym fakt, że stabilizacja zwrotu w tym przypadku jest możliwa głównie dzięki naładowanym resztom aminokwasowym, które się tam znajdują.

Głównym celem badań opublikowanych w następnych dwóch pracach [**H6,H7**] było zbadanie, czy obecność pary naładowanych reszt aminokwasowych oddzielonych od siebie kilkoma hydrofobowymi resztami obecnymi w sekwencji peptydu przyczynia się do powstawania zwrotu w łańcuchu. Najpierw zbadalam N-końcową domenę bogatą w reszty tryptofanowe białka wiążącego forminę FBP28 (domena WW białka FBP28) [**H6**]. Należy zauważyć, że formowanie się C-końcowej β -spinki w domenie WW białka FBP28 uznano wcześniej za pierwszy etap formowania się całego białka [49,50]. Struktura białka FBP28 została przedstawiona poniżej na rysunku 4.



Rysunek 4. Struktura białka FBP28 z domeną WW wyznaczona na podstawie pomiarów NMR [51], (kod PDB: 1E0L); fragmenty białka FBP28 poddane badaniu zostały umieszczone w ramkach: FPB28 (12-18) D7 (niebieska ramka) i FPB28 (11-19) D9 (czerwona ramka).

W pracy **H6** zostały opublikowane wyniki badań potencjometrycznych w postaci stałych kwasowo-zasadowych wyznaczonych dla reszt jonizowalnych obecnych w obydwu fragmentach białka FBP28, w zakresie temperaturowym od 25°C-60°C, które odpowiadały stopniom deprotonowania badanych układów. W tej pracy zostały również zamieszczone krzywe pojemności cieplnej wyznaczone w wodzie dla tych dwóch fragmentów N-końcowej części domeny WW białka FBP28, która charakteryzowała się strukturą drugorzędową typu β (25°C-60°C). Obydwa fragmenty zawierały w swoim składzie dwie reszty lizyny, których łańcuchy boczne ochraniały (flankowały) rdzeń tworzący β zagięcie w białku 1E0L [51]. Sekwencje aminokwasowe wyżej wymienionych fragmentów były następujące: Ac-Lys-Thr-Ala-Asp-Gly-Lys-Thr-NH₂ (zwany dalej D7, trzy protony zdolne do oddysocjowania) oraz Ac-Tyr-Lys-Thr-Ala-Asp-Gly-Lys-Thr-Tyr-NH₂ (zwany dalej D9, pięć protonów zdolnych do jonizacji). Dla obydwu peptydów zaobserwowano maksimum pojemności cieplnej w $t \approx 50^\circ\text{C}$ co zasugerowało, że w niższych temperaturach oba peptydy posiadają w miarę stabilne struktury (Rysunki 2 i 3, **H6**). Przejście fazowe na krzywej pojemności cieplnej dla układu D9 było bardziej wyraźne prawdopodobnie dlatego, iż D9 zawiera w swoim składzie parę reszt tyrozyny, które oddziałują ze sobą

(oddziaływania hydrofobowe), a tym samym przyczyniają się do większej stabilizacji układu w porównaniu z D7 (Rysunek 1 w **H6**). Dla obydwu peptydów wyznaczone w temperaturze pokojowej wartości pK_{a1} i pK_{a2} były znacznie niższe w porównaniu do wartości referencyjnych. To sugerować mogło, że łańcuchy boczne reszt jonizowalnych, które oddysocjowywały proton jako pierwsze (Asp, Lys) znajdowały się w dodatnio naładowanym polu elektrostatycznym drugiej z lizyn. To z kolei sugerowało względnie zwartą strukturę łańcucha peptydowego zarówno D7 jak i D9. Jednak byłam świadoma, że taki wniosek powinien być poparty przez wyniki badań strukturalnych np. przy wykorzystaniu techniki NMR.

W celu przeanalizowania termodynamiki kolejnych procesów deprotonowania w układach D7 i D9 przeprowadziłam analizę funkcji termodynamicznych dla tych układów. W tym celu obliczyłam zmiany energii Gibbsa (ΔG), entalpii (ΔH), entropii (ΔS) i pojemności cieplnej (ΔC_p) w zależności od temperatury oraz wartości pK_a . Skorzystałam w tym celu z następujących zależności:

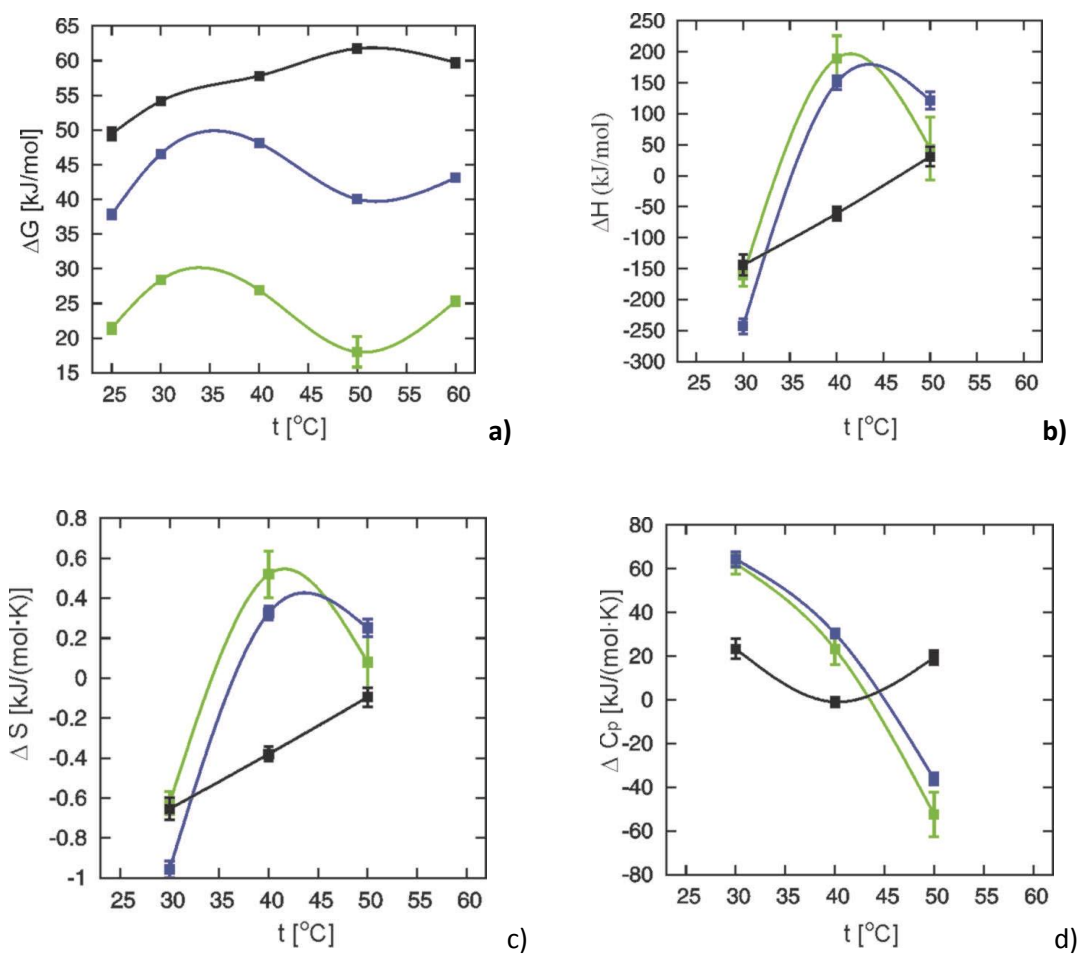
$$\Delta G^\circ = \ln 10 \times RT \times pK_a \quad (1)$$

$$\Delta S^\circ = -\frac{\partial \Delta G^\circ}{\partial T} \quad (2)$$

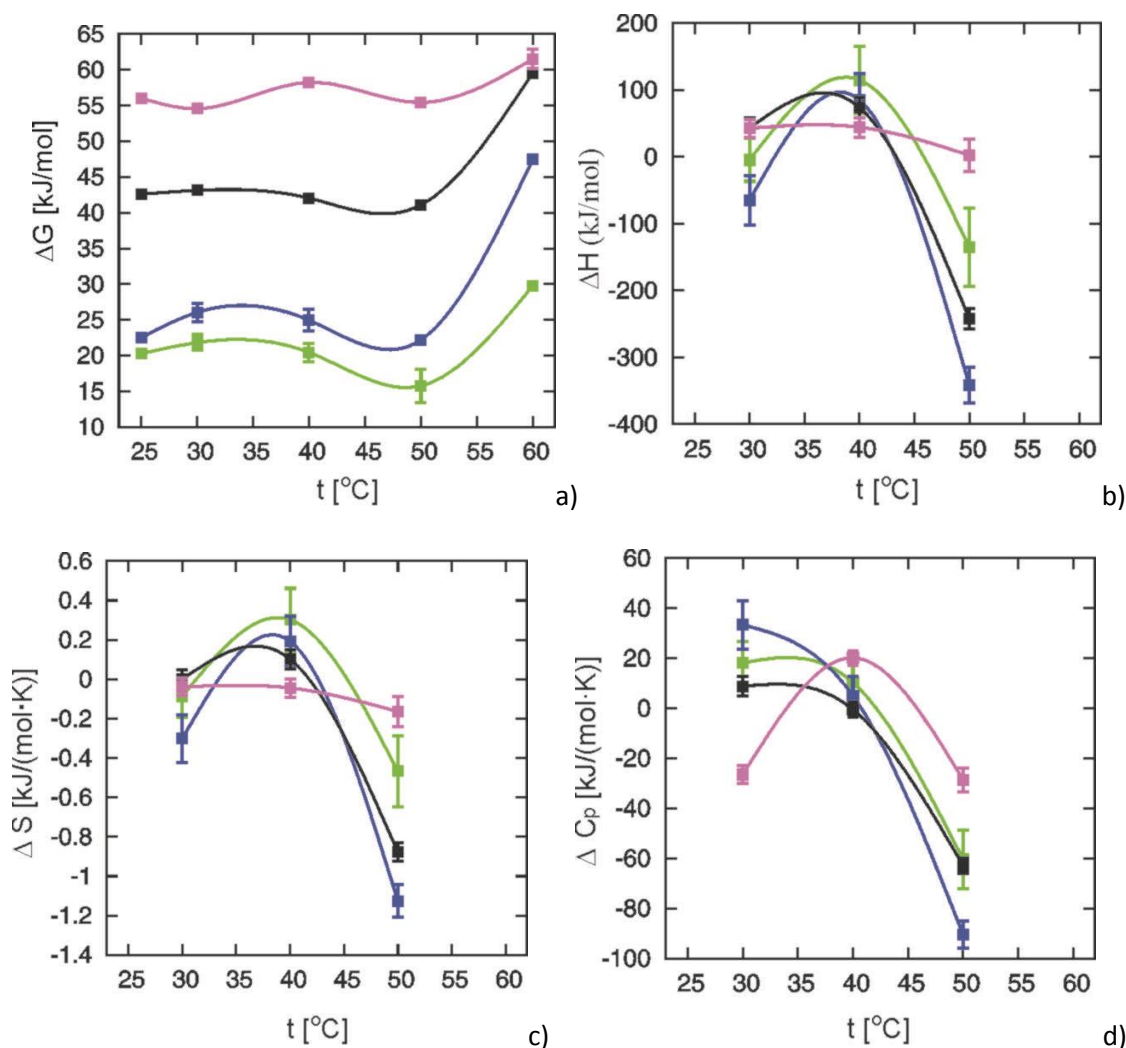
$$\Delta H^\circ = \Delta G^\circ + T\Delta S^\circ \quad (3)$$

$$\Delta C_p^\circ = -T \frac{\partial^2 \Delta G^\circ}{\partial T^2} \quad (4)$$

Pierwsza i druga pochodna ΔG została oszacowana z podzielenia różnic (dla pierwszej pochodnej wykonana symetryzacja). Wykresy odpowiadające układom D7 i D9 dla poszczególnych wartości wyznaczonych na podstawie równań 1-4 są przedstawiono poniżej na rysunkach 5 i 6, odpowiednio dla D7 i D9. Z powodu uwzględnienia symetrii dla pierwszej pochodnej na wykresach pierwszy i ostatni punkt został pominięty z wyjątkiem wartości odpowiadającym ΔG° .



Rysunek 5. Zależność zmiany (a) energii swobodnej Gibbsa (ΔG), (b) entalpii (ΔH), (c) entropii (ΔS) i (d), ciepła właściwego (ΔC_p) dla deprotonowania kolejnych etapów jonizowalnych łańcuchów bocznych obecnych w peptydzie D7 w wodzie. Wartości dla poszczególnych funkcji zostały obliczone w oparciu o wartości pK_a dla D7, które zostały przedstawione w tabeli 3 w publikacji H6. Pionowe linie odnoszą się do błędów wyznaczonych stałych, punkty są punktami eksperymentalnymi, a linie są liniami interpolacji między punktami doświadczalnymi. Zielone, niebieskie i czarne linie oraz symbole odpowiadają pierwszemu, drugiemu oraz trzeciemu etapowi dysocjacji protonów, (rysunek 4 w **H6**).

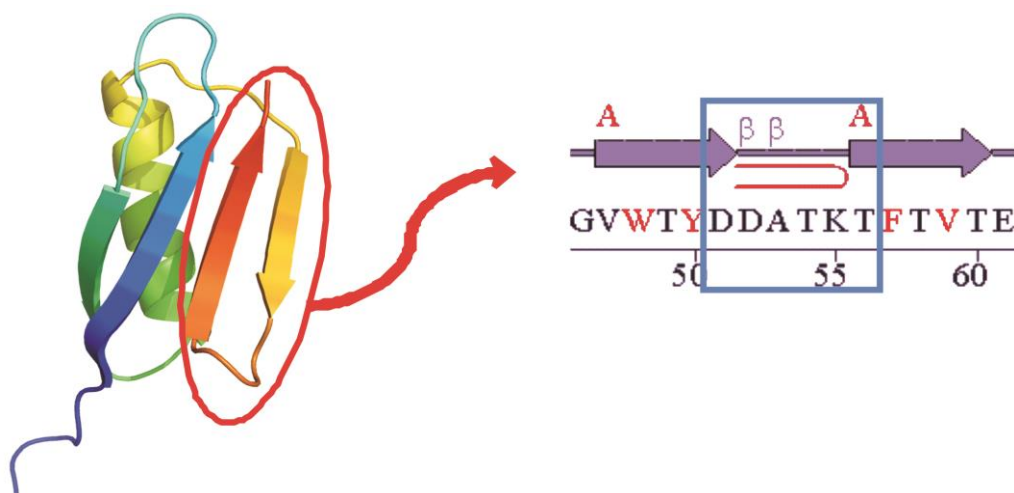


Rysunek 5. Zależność zmiany (a) energii swobodnej Gibbsa (ΔG), (b) entalpii (ΔH), (c) entropii (ΔS) i (d), ciepła właściwego (ΔC_p) dla deprotonowania kolejnych etapów jonizowalnych łańcuchów bocznych obecnych w peptydzie D9 w wodzie. Pionowe linie odnoszą się do błędów wyznaczonych stałych, punkty są punktami eksperymentalnymi, a linie są liniami interpolacji między punktami doświadczalnymi. Zielone, niebieskie, czarne, różowe oraz czerwone linie oraz symbole odpowiadają pierwszemu, drugiemu, trzeciemu, czwartemu oraz piątému etapowi dysocjacji protonów, (rysunek 5 w **H6**).

Jak pokazano, w przypadku obydwu peptydów, zmiana entropii (ΔS°) oraz entalpii (ΔH°) odpowiadającym pierwszym dwóm etapom dysocjacji protonów początkowo wzrasta wraz ze wzrostem temperatury, a następnie zmniejsza się w zakresie temperaturowym od $t = 50$ °C do $t = 60$ °C aż do wartości nawet ujemnych dla D9. Zmiany pojemności cieplnej (ΔC_p°) odpowiadające stopniowej dysocjacji dwóch pierwszych protonów zachowują się podobnie dla dwóch pierwszych stopni deprotonacji, a następnie zmniejszają się monotonicznie w pozostałych przypadkach. Zmiany te są znacznie bardziej widoczne dla

peptydu D9 niż dla D7. Jednak w obydwu przypadkach największe zmiany występują w regionie przejściowym, gdzie prawdopodobnie następuje przejście fazowe w zależności od rosnącej temperatury, odpowiadające regionowi maksimum na krzywej pojemności cieplnej (Rysunki 3 i 4 w **H6**). Wzrost energii swobodnej Gibbsa oraz jednoczesny spadek ΔH° , ΔS° i pojemności cieplnej (ΔC_p°) w pobliżu temperatury odpowiadającej najbardziej znaczącemu przejściu fazowemu wskazuje, że po oddysocjowaniu dwóch pierwszych protonów od układu następuje jego destabilizacja. Wyniki powyższych badań oraz wcześniej przeprowadzonych [13, **H1**, **H2**] potwierdzają hipotezę, że obecność dwóch naładowanych reszt lizyny w sekwencji stabilizuje stan uporządkowania i ma wpływ na jego tendencje do tworzenia zgięcia. Takie stwierdzenie wydaje się przeczyć intuicji, jednak jest ono potwierdzone tym, że łańcuch polilizyny, przy niskich wartościach pH ulega skręceniu w konformację α -helisy, gdzie łańcuchy boczne reszt lizyny są skierowane na zewnątrz stronę rozpuszczalnika, osłaniając od niego szkielet peptydowy [52].

W kolejnym kroku zostały przeprowadzone badania temperaturowe z wykorzystaniem miareczkowania potencjometrycznego fragmentu białka G pochodzącego z bakterii *Streptococcus* wiążącego immunoglobulinę [**H7**]. Do analizy wybrałam następujące układy: peptyd Ac-DDATKT-NH₂ pochodzący oryginalnie z białka G (1IGD 51-56) (dalej zwany jako Dag1) oraz jego pochodne : Ac-DVATKT-NH₂ (Dag2) i Ac-OVATKT-NH₂ (Dag3), w których D, A, T, K, V, i O oznaczały odpowiednio kwas asparaginowy, alaninę, treoninę, lizynę, walinę oraz ornitynę. W badaniach, zostały wprowadzone mutacje punktowe w oryginalnej sekwencji Dag1, gdzie drugi aminokwas w sekwencji kwas asparaginowy (D52) (rysunek 7) został zastąpiony obojętną, hydrofobową resztą waliny (Dag2) lub w którym pierwszy z sekwencji kwas asparaginowy (D51) został zastąpiony resztą ornityny, a drugi aminokwas-również kwas asparaginowy (D52) został zastąpiony obojętną, hydrofobową resztą waliny (Dag3), bądź pierwszy z sekwencji kwas asparaginowy (D51) został zastąpiony resztą ornityny, a drugi aminokwas-również kwas asparaginowy (D52) został zastąpiony obojętną, hydrofobową resztą waliny (Dag4). Zakładałam, że zachowanie zagiętej struktury łańcucha po tych modyfikacjach w peptydzie potwierdziłoby hipotezę wymuszania zgięcia przez obecność flankujących dodatnio naładowanych reszt.



Rysunek 7. Struktura białka G wyznaczona na podstawie pomiarów NMR [42] (wiążącego forminę, pochodzącego z bakterii *Streptococcus*) z zaznaczoną domeną B3; zaznaczony w ramce został fragment 1IGD(51-56) (Dag1); fragment Dag1 oraz jego pochodne (Dag2, Dag3) zostały poddane badaniu. (Rysunek 1 in **H7**).

Wyniki uzyskane na podstawie pomiarów spektroskopowych CD (rysunek 3a-3c w **H7**), pokazały dla wszystkich trzech peptydów dobrze zdefiniowany punkt izozbestyczny na krzywych zależności eliptyczności od temperatury. Fakt ten sugerował, że w zależności od temperatury ustala się równowaga pomiędzy formami konformacji zwiniętej oraz rozwiniętej. Minimalna wartość eliptyczności molowej przy $\lambda \approx 195$ oraz maksymalna przy długości fal $\lambda \approx 215$ wskazała na występowanie w roztworze dla tych układów form rozciągniętych oraz konformacji P_{II} (lub statystycznego kłębką). Intensywność pasma przy długości $\lambda \approx 195$ nm (odpowiadającej konformacji zagiętej) maleje wraz z temperaturą, a pasma przy długości fal $\lambda \approx 215$ nm (odpowiadające konformacji poliproliny II lub kłębkowi statystycznemu) zwiększały się wraz z temperaturą, która jest zgodna z kolei z procesem rozwijania konformacji. W celu ustalenia temperatury mięknięcia oraz funkcji termodynamicznych przejścia ze stanu zwiniętego do rozwiniętego przeanalizowałam zależność temperaturową widm CD dla dwóch długości fal $\lambda = 195$ nm oraz $\lambda = 215$ nm (rysunki 4a-4c w **H7**). Zakładając model dwustanowy, eliptyczność molowa (przy jednej z dwóch długości fali) może być wyrażona równaniem (1):

$$[\theta] = [\theta]_F x_F + [\theta]_U x_U = [\theta]_F x_F + [\theta]_U (1 - x_F) \quad (1)$$

gdzie $[\theta]_F$ $[\theta]_U$ to wartości eliptyczności molowych odpowiednio stanu zwiniętego (zagięcie) oraz rozwiniętego (polyprolina II) natomiast, x_F oraz x_U frakcje molowe stanu zwiniętego (*folded*) oraz rozwiniętego (*unfolded*) przy założeniu, że: $x_F + x_U = 1$.

Współczynnik formy zwiniętej i rozwiniętej może być wyrażona za pomocą stałej równowagi przejścia fazowego za pomocą poniższego wzoru (równanie 2):

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}\right) = \frac{x_F}{1-x_F}$$

(2)

gdzie ΔH i ΔS wyrażają odpowiednio zmiany entalpii i entropii procesu zwijania, R oznacza stałą gazową natomiast T , to temperatura absolutna.

Zatem, współczynnik formy zwiniętej można wyrazić za pomocą równania 3:

$$x_F = \frac{K}{K+1} = \frac{\exp\left(-\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}\right)}{\exp\left(-\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}\right) + 1} \quad (3)$$

Podstawiając x_F z równania (3) do równania (1), wyznaczyć można wzór (4).

$$[\theta] = [\theta]_U + ([\theta]_F - [\theta]_U) \frac{\exp\left(-\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}\right)}{\exp\left(-\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}\right) + 1} \quad (4)$$

Ponieważ w temperaturze mięknięcia $x_F = x_U = \frac{1}{2}$, to temperatura przejścia fazowego

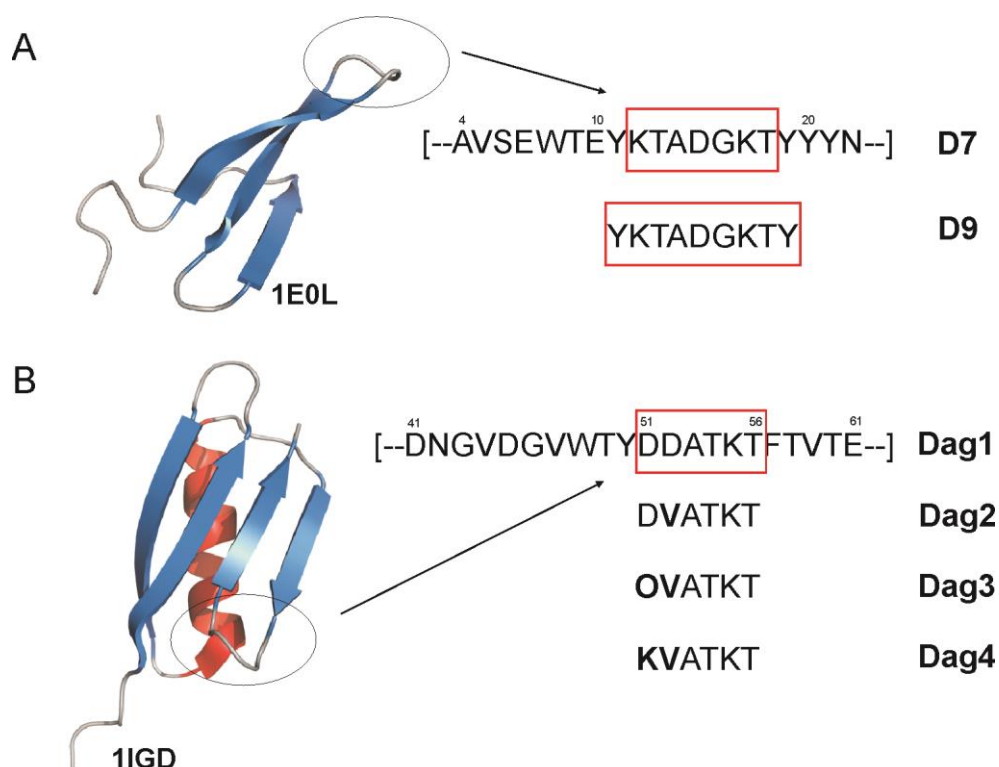
może być wyrażona następującym równaniem (5):

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S} \quad (5)$$

Wartości funkcji ΔH , ΔS oraz T_m wyznaczone przez dopasowanie równania (4) dla $[\theta]_{198\text{nm}}$ oraz $[\theta]_{215\text{ nm}}$, w połączeniu z T_m wyznaczoną na podstawie badań kalorymetrycznych DSC zostały zamieszczone w tabeli 3 w pracy **H7**.

Pomiary CD wykazały, że wszystkie badane peptydy posiadały dobrze zdefiniowany punkt izobestyczny, co sugerowało, że w zależności od temperatury ustalana jest równowaga pomiędzy natywnym oraz zdenaturowanym stanem. Wyniki CD zasugerowały ponadto, że wprowadzenie modyfikacji w sekwencji Dag1 spowodowało wzrost lokalnych stanów konformacyjnych poliproliny II w peptydach Dag2 i Dag3 (zwiększenie wysokości maksimum przy 215 nm) i równocześnie zmniejszenie skłonności do tworzenia się konformacji zagiętej. Następnie, badania przeprowadzone przy zastosowaniu techniki DSC wykazały, że struktury o zmodyfikowanych sekwencjach fragmentu domeny B3 białka G są mniej stabilne termicznie niż peptyd o sekwencji oryginalnej Dag1. Wyniki zatem wskazały na większą elastyczność struktury zmodyfikowanych związków. Peptyd Dag3 okazał się mieć najmniej określoną konformację. Ustalone wartości pK_a dla peptydu Dag1 potwierdziły wcześniejsze badania NMR [53], w których w niskiej temperaturze (20°C) obserwowano tworzenie się wiązania wodorowego pomiędzy Asp2 i Lys5. Wartości pK_a dla układu Dag2 wykazały natomiast, że obecne w sekwencji grupy zdolne do jonizacji, znajdują się blisko siebie, ale odległość między nimi jest niewystarczająca, aby tworzyć wiązanie wodorowe. Dla Dag3 pK_{a1} (Lys5) nie różniła się bardzo od wartości pK_{a2} (Orn1), co oznaczało, że grupa (Orn1) znajduje się w polu elektrostatycznym o podobnym charakterze co jej odpowiednik w peptydzie czyli Lys5. Zaobserwowana różnica pomiędzy wartościami pK_a jest jednak większa niż wartość $\log_{10}4$ (ok. 0,60), czyli większa od wartości charakterystycznej dla kwasów dwufunkcyjnych posiadających oddalone od siebie grupy karboksylowe co oznacza, że odległość pomiędzy bocznymi łańcuchami grup jonizowalnych rośnie i sekwencja Dag3 ma mniejszą tendencję w porównaniu z Dag1 do tworzenia się konformacji zagiętej. Analiza danych termodynamicznych badanych peptydów pokazała przybliżoną wartość temperatury, w której najprawdopodobniej występują dla badanych układów najbardziej znaczące zmiany konformacyjne (przejściowe fazowe). W celu dokonania pełnej analizy preferencji konformacyjnych badanych układów D7, D9, Dag1, Dag2, Dag3 (patrz rysunek 8) dla

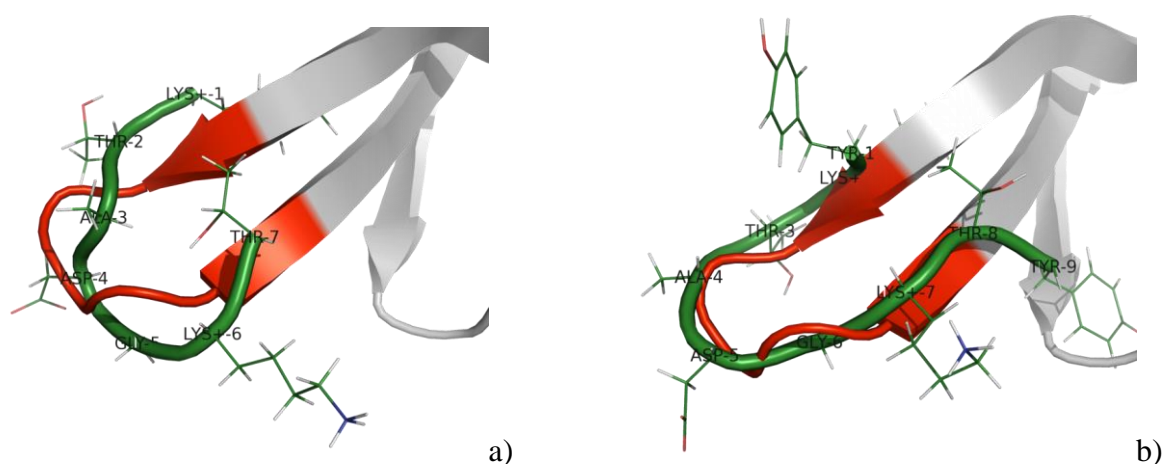
których wstępne wyniki zostały opublikowane w dwóch opisanych powyżej publikacjach **H6** i **H7** wykonałam badania przy zastosowaniu spektroskopii NMR oraz symulacji dynamiki molekularnej (MD), a następnie uzyskane dane umieściłam w publikacji **H8**. Dodatkowo w pracy **H8**, zostały zamieszczone wyniki jeszcze dla jednego dodatkowego wariantu sekwencji Dag1, w którym pierwsza reszta kwasu asparaginowego zastąpiona została inną dodatnio naładowaną resztą (Lys) dając w rezultacie układ o następującej sekwencji Ac-KVATKT-NH2 (Dag4) (patrz rysunek 8).



Rysunek 8. (A) Struktura białka FBP28 z domeną WW wyznaczona na podstawie pomiarów NMR [51], (kod PDB: 1E0L); fragmenty białka FBP28 poddane badaniu, zostały umieszczone w ramkach FBP28 (12-18) D7 oraz FBP28 (11-19) D9. (B) Struktura białka G wyznaczona na podstawie pomiarów NMR [42] (wiążącego forminę, pochodzącego z bakterii *Streptococcus*) z zaznaczoną domeną B3; zaznaczony w ramce został fragment 1IGD(51-56) (Dag1) oraz jego pochodne (Dag2, Dag3) zostały poddane badaniu. (Rysunek 1 in **H7**). (Rysunek 1 w **H8**)

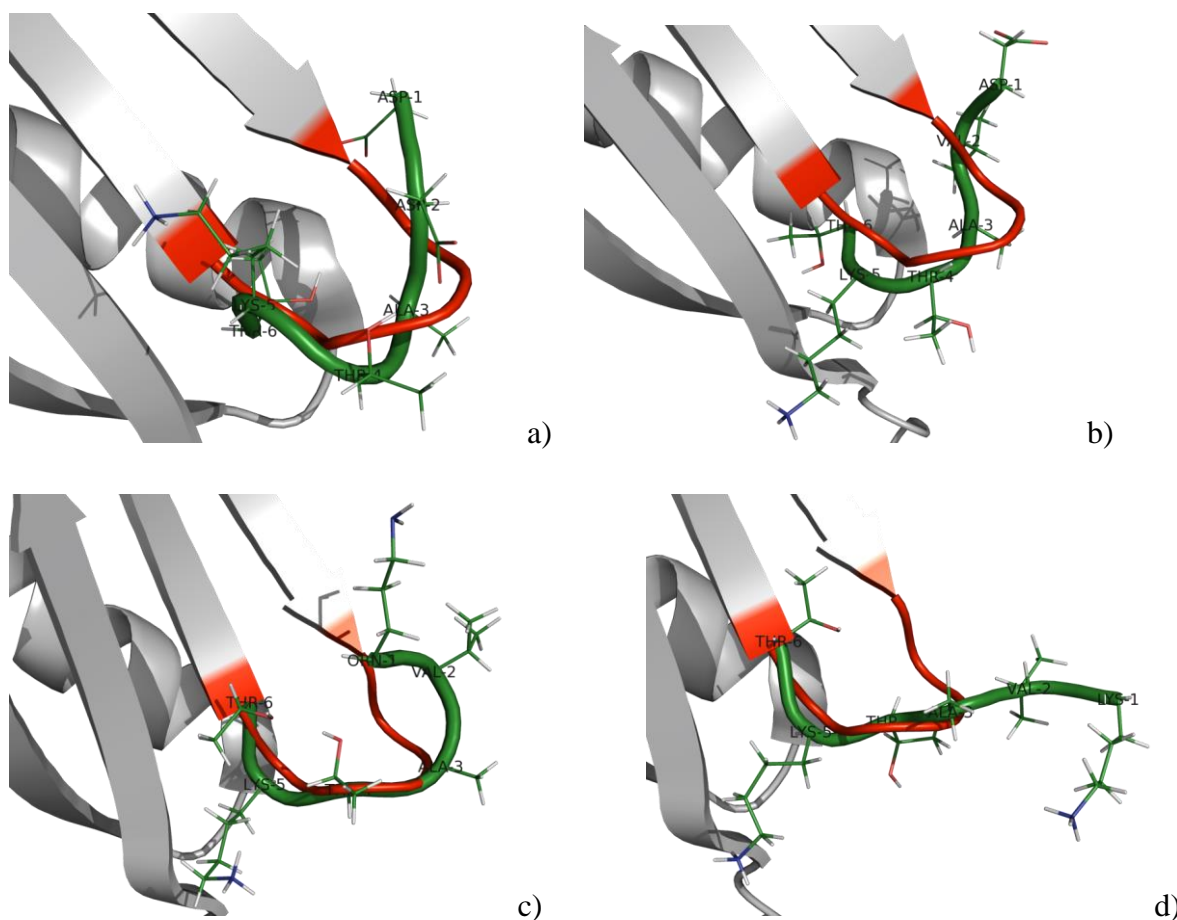
Stwierdzono, że obydwa fragmenty FBP28 przyjmują postać konformacji o tendencji do zaginania. Jednakże, struktura bardziej stabilna jest określona dla dłuższej sekwencji (D9). Peptyd D7 jest zagięty w centralnej części sekwencji, natomiast jest bardziej elastyczny na

końcach, w porównaniu z D9, prawdopodobnie ze względu na brak w D7 dwóch reszt tyrozynowych obecnych na dwóch końcach łańcucha peptydowego D9, co z pewnością ma wpływ na stabilność jego struktury. Należy jednak podkreślić, że żadne hydrofobowe oddziaływania pomiędzy końcowymi resztami tyrozyn w D9 nie zostały zaobserwowane. To sugeruje, że obecność pary jednoimiennie naładowanych reszt lizyn na obydwu końcach zagięcia może wpływać na stabilizację zagięcia łańcucha tworząc naładowany "płaszcz" wokół cząsteczki.



Rysunek 9. Dopasowanie strukturalne pomiędzy najbardziej reprezentatywnymi konformacjami peptydów (a), D7, (b) D9 z odpowiednim fragmentem białka FBP28 WW (rysunek 4 w **H8**).

Sześć-aminokwasowy fragment białka G (Dag1) oraz jego pochodne mają tendencję do zaginania się w centralnej części sekwencji. Jednakże, peptydy Dag3 oraz Dag4 mają tę tendencję dużo gorszą w porównaniu z Dag1 i Dag2. Zatem, łańcuchy boczne przeciwnie naładowane w Dag1 i Dag2 wpływają w dużym stopniu na utrzymywanie zagiętej struktury ponieważ w strukturach tych występuje dużo wyższe prawdopodobieństwo wytworzenia się mostków solnych w porównaniu z sekwencjami Dag3 i Dag4, gdzie jednoimiennie naładowane reszty aminokwasowe wymuszają wydłużanie tych konformacji.

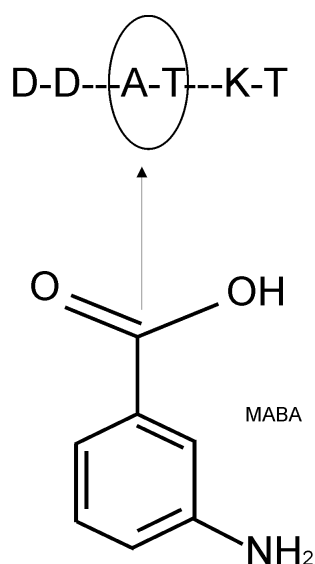


Rysunek 10. Dopasowanie strukturalne pomiędzy najbardziej reprezentatywnymi konformacjami peptydów (a), Dag1, (b) Dag2, (c) Dag3 i (d) Dag4 z odpowiednim fragmentem białka IIGD (rysunek 4 w **H8**).

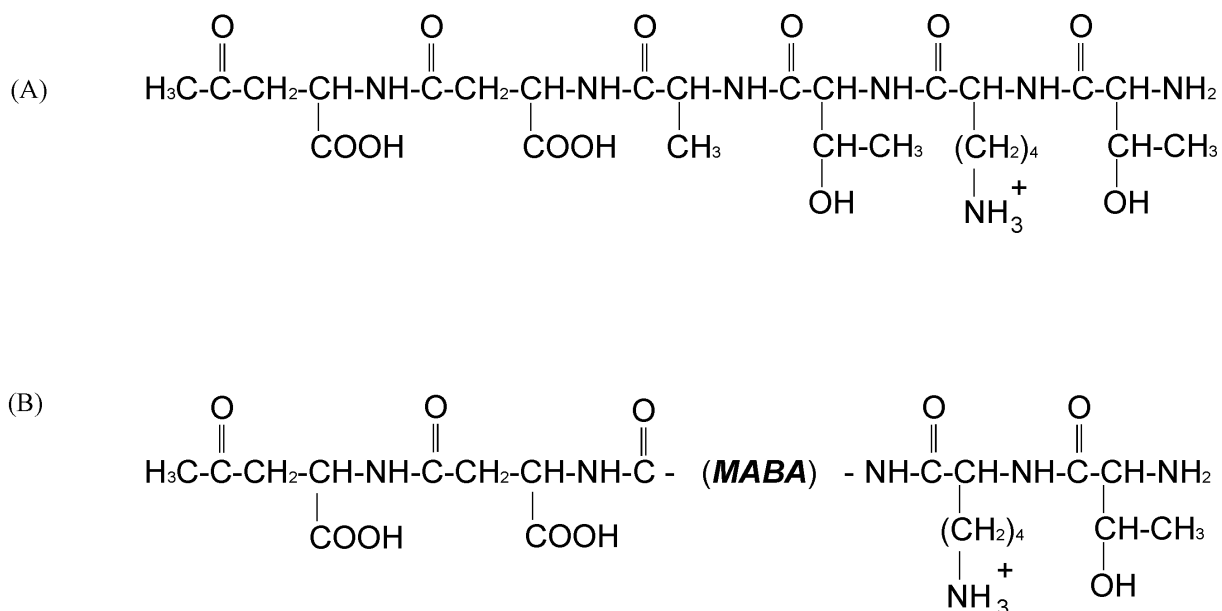
Należy zauważyć, że te dwie naładowane dodatnio reszty, są oddzielone od siebie trzema resztami w peptydach Dag3 i Dag4 oraz czterema w przypadku D7 i D9. Ten fakt może być powodem dlaczego obecność dwóch dodatnio naładowanych reszt zakłóca zagięcie łańcucha w Dag3 i Dag4, natomiast wydaje się stabilizować go w układach D7 i D9. W przypadku, gdy krótsze odcinki separują reszty naładowane w sekwencji peptydowej, obecność mostków solnych zdaje się stabilizować utrzymywanie zagiętej struktury, co zaobserwowano w poprzednich badaniach np. dla układu Dag1 [53]. Mechanizm formowania się struktury zagiętej badano również dla innych przypadków [**H5**,53-58]. Stwierdzono, że oddziaływania hydrofobowe zarówno wynikające z lokalnych oddziaływań jak i powstające dzięki budowie łańcucha głównego prowadzą do wytworzenia struktury zagiętej przez łańcuch polipeptydowy. Formowanie się struktury drugorzędowej typu β rozpoczyna się od wytworzenia zagięcia a następnie postępuje tzw. „dopinanie” (*zippering*) [55-57]. W

publikacji **H8** zasugerowałam, że obok oddziaływań hydrofobowych, osłanianie niepolarnego fragment łańcucha od rozpuszczalnika może mieć wpływ na proces tzw. “zippingu”.

Jak przedstawiono powyżej, pomiary potencjometryczne prowadzone w różnych temperaturach mogą pomóc przy wyznaczaniu profilu konformacyjnego stabilności peptydu oraz umożliwiają określenie funkcji termodynamicznych procesu przyłączenia lub oddysocjowywania protonów z łańcuchów bocznych peptydów, co pozwala w dalszym kroku na charakteryzację i określenie rodzaju oddziaływań istotnych dla tworzenia się najbardziej stabilnej struktury. Ponieważ peptydy są związkami zwykle bardzo elastycznymi, dla których wyniki badań miareczkowania potencjometrycznego mogą być przeszacowane, dlatego zdecydowałam się poddać badaniu układ mniej ruchliwy, sekwencję analogiczną do Dag1 (peptydu pochodzącego z białka G wiążącego immunoglobulinę o sekwencji Ac-Asp-Asp-Ala-Thr-Lys-Thr-NH₂, diskutowanego powyżej) [**H9**]. W celu zmniejszenia ruchliwości peptydu Dag1 i zwiększenia sztywności układu aminokwasy w centralnym fragmencie Dag1 (Ala3 i Thr4) zostały zastąpione przez związek chemiczny MABA (kwas metaaminobenzoowy), który odegrał rolę β-mimetyku (nowo powstały peptyd w dalszej części pracy jest oznaczony przez Dag1_M) (patrz rysunek 11).



Rysunek 11. Wzór strukturalny tzw. beta mimetyku, kwasu metaaminobenzoowego (MABA) z zaznaczeniem miejsca w peptydzie Dag1 gdzie zostały wprowadzone zmiany w sekwencji czyli zamiana dwóch reszt aminokwasowych cząsteczką MABA (Rysunek 1b w **H9**).



Schemat 1. Wzory strukturalne peptydów poddanych badaniu: (A) Dag1, (B) Dag1_M, (schemat 1 w **H9**).

Należy podkreślić, że wszystkie kwasy aminobenzoesowe złożone są ze sztywnego pierścienia benzenowego posiadającego w podstawniku grupę aminową i grupą karboksylową. W swoich badaniach zdecydowałam się zastosować kwas meta-aminobenzoesowy (MABA) jako β -peptydomimetyk [**H9**], ponieważ w jego analogu kwasie orto-aminobenzoesowym, odległość pomiędzy grupą aminową i grupą karboksylową jest zbyt mała do wytworzenia i utrzymania struktury zagiętej β . Wprowadzenie natomiast w centralnej części sekwencji peptydowej kwasu para-aminobenzoesowego mogłoby spowodować rozchodzenie się końców łańcucha znajdujących się po obydwu stronach kwasu w przeciwnych kierunkach. W kwasie meta-aminobenzoesowym, odległość pomiędzy grupą aminową a karboksylową jest wystarczająco duża, aby zapobiec nakładaniu się sterycznemu między przyłączanymi łańcuchami i na tyle mały, aby ograniczyć ich swobodę konformacyjną. Należy zauważyć, że podobny związek [58] z powodzeniem został zastosowany w przeszłości jako β -peptydomimetyk. Związek ten zawierał w swoim składzie grupę cykloheksylową, a nie pierścień benzenowy, ale taki odczynnik był trudny do otrzymania. Zatem zdecydowałam

się użyć MABA, który okazał się związkiem tańszym i łatwiejszym do uzyskania. Związek MABA jest bardzo podobny w swojej budowie do aminokwasu cukrowego (SAA 3) [59], który jest stosowany jako β -peptydomimetyk oraz, jak zostało wspomniane, bardziej dostępnym.

Wykonałam miareczkowanie potencjometryczne w różnych temperaturach dla obydwu peptydów Dag1 i Dag1_M, w celu określenia wartości pK_a grup jonizowalnych obecnych w sekwencjach: Asp1, Asp2, Lys5. Te doświadczenia pozwoliły mi uzyskać informacje na temat sąsiedztwa tych jonizowalnych grup. Wyniki pokazały, że naładowane reszty obecne w Dag1 i Dag1_M (Asp1, Asp2 i Lys5) znajdują się w podobnym środowisku. Mogłam zatem stwierdzić, że kształt dominującej konformacji Dag1 i Dag1_M jaki układ osiąga w roztworze jest podobny i obydwie z nich mają tendencję do tworzenia struktury zagiętej. Dodatkowo, wyniki DSC dowiodły, że peptyd Das1 jest mniej stabilny termicznie w porównaniu z Dag1_M, co jednocześnie pokazało, że zmiana kształtu konformacji peptydu Dag1_M zależy w małym stopniu od temperatury.

Powyższe obserwacje pozostają w dobrej zgodności z wynikami pomiarów spektroskopowych CD (brak punktu izobestycznego). W pracy [H3] z cyklu habilitacyjnego wykazałam, że w roztworze wodnym, peptyd Dag1 organizuje się w strukturę podobną jaką przyjmuje się w białku natywnym G. Porównanie właściwości kwasowo-zasadowych peptydów Dag1 i Dag1_M, które przedstawiono w publikacji **H9** prowadzi do wniosku, że potencjometryczne badania przeprowadzone w różnych temperaturach, prawdopodobnie dowolnych krótkich peptydów wyizolowanych z białek (z dobrze zdefiniowaną strukturą trójwymiarową), mogą być tańszym i szybszym sposobem na wstępne oszacowanie preferencji konformacyjnych tych peptydów w pierwszym etapie związania się białka, niż metoda NMR. Dzięki zaproponowanemu podejściu jesteśmy w stanie określić lokalne środowisko grup zdolnych do przyjmowania lub też odszczepiania protonów w badanym peptydzie, a następnie na tej podstawie oszacować preferencje konformacyjne tego peptydu.

Podsumowanie:

W literaturze można znaleźć wiele informacji na temat badań kinetyki i termodynamiki powstawania struktur α -helikalnych w białkach. Przykładowo wiele badań wykazało, że zastąpienie wewnętrznych reszt aminokwasowych tworzących lokalnie struktury α -helikalne resztami alaniny ma znaczny wpływ na stabilność α -helikalną całego układu. Doprowadziło to do udanej konstrukcji w roztworze wodnym helikalnych monomerycznych peptydów charakteryzujących się wysoką zawartością reszt alaninowych oraz wytworzonymi wewnątrz kilkoma mostkami solnymi [33], a także prostych sekwencji peptydowych o wysokiej zawartości alaniny z kilkoma resztami lizyny, dzięki którym następuje wzrost rozpuszczalności tak zaprojektowanych układów [34]. O ile wiedza na temat mechanizmu powstawania i stabilności dla struktur α -helikalnych jest dość duża to podobna wiedza dotycząca struktur typu β -kartki na razie nie jest znana, a stanowi nieodzowny element niezbędny do zrozumienia bardziej skomplikowanego procesu, a mianowicie fałdowania białek.

Badania nad mechanizmem powstawania struktur typu β kartki (β -spinki) mają niezwykle **praktyczny aspekt**. Peptydy tworzące samorzutnie w roztworach β -spinki bardzo często ulegają procesowi agregacji, tworząc fibryle amyloidowe co wiąże się bezpośrednio z chorobami Alzheimera, Parkinsona, Creutzfelda – Jacoba i wieloma innymi chorobami neurodegeneracyjnymi. W konsekwencji, badania nad tworzeniem się układów charakteryzujących się drugorzędową strukturą typu β (struktur zagiętych) ze skłonnością do agregacji stanowią wielkie wyzwanie dla naukowców.

Jak zostało wspomniane powyżej, mechanizmów zwijania się białek do struktury natywnej jest wiele. Wszystkie te drogi, prowadzą poprzez nie jeden ale kilka etapów, do struktury natywnej. Jednym z najbardziej istotnych etapów jest etap zapoczątkowujący proces zwijania (tworzenie się pierwszych oddziaływań), który warunkuje drogę reakcji składających się na dalszy mechanizm tworzenia się ostatecznej struktury.

Głównym celem moich badań było wyjaśnienie czy obecność dodatnio naładowanych reszt po obu stronach fragmentu sekwencji peptydowej wymusza zwrot tego fragmentu łańcucha. **Taki mechanizm powstawania zwrotów nie został dotąd zaproponowany. Na podstawie**

uzyskanych przez mnie wyników został poznany kolejny rodzaj oddziaływań (oprócz stwierdzonych już oddziaływań hydrofobowych, lokalnych i mostków solnych) kluczowych dla inicjowania zwijania łańcucha (pierwszy etap nukleacji).

Literatura:

1. Soto C., Castano E.M., Kumar R. A. Beavis R. C. Frangione B., *Neurosci. Lett.*, **1995**, 200, 105-108.
2. Benito A., Laurents D. V., Ribo M., Vilanova M., *Curr. Prot. Pept. Sci.*, **2008**, 9,370-393.
3. Anfinsen C.B., *Science*, **1973**, 181,223-230.
4. Levinthal C., *J.Chem. Phys.*, **1968**, 65, 44-45.
5. Tanford C., Kawahare K., Lapanje S., *J. Biol. Chem.*, **1966**, 241, 1921.
6. Flory, P. J., *Statistical mechanics of chain molecules*. Wiley, New York, **1969**.
7. Tiffany M. L., Krimm S., *Biopolymers*, **1973**, 12, 575.
8. Kohn, J. E., Millett, I. S., Jacob, J., Zagrovic, B., Dillon, T. M., Cingel, N., Dothager, R. S., Seifert, S., Thiyagarajan, P., Sosnick, T. R., Hasan, M. Z., Pande, V. S., Ruczinski, I., Doniach, S., Plaxco, K. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA***2004**, 101, 12491.
9. Shi, Z., Olson, C. A., Rose, G. D., Baldwin, R. L., Kallenbach, N. R., *Proc. Nat. Amer. Soc.*, **2002**, 99, 9190.
10. Fink A. L., *Current Opinion in Structural Biology*, **2005**, 15, 35–41.
11. Dill K. A, *Biochemistry*, **1990**, 29, 7133-7555.
12. Yon, J. M. *J. Cell. Mol. Med.*, **2002**, 6, 307-327.
13. Makowska J., Rodziewicz-Motowidło S., Bagińska K., Vila J.A., Liwo A., Chmurzyński L., Scheraga H.A., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **2006**, 103, 1744-1749.
14. Matheson R. P., Scheraga H. A., *Macromolecules*, **1978**, 11, 819-829.
15. Muñoz V., Henry E. R., Hofrichter J., Eaton W. A., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1998**, 5872-5879.
16. Dinner A. R., Lazaridis T., Karplus M. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1999**, 96, 9068-9073.
17. Quijada, J.; Lopez, G.; Versace, R.; Ramirez, L.; Tasayco, M. L. *BiophysChem***2007**, 129, 242–250.
18. Laskowski, M., Jr.; Scheraga, H. A. *J Am Chem Soc***1954**, 76, 6305–6319.
19. Kostrowicki, J.; Liwo, A. *ComputChem***1987**, 11, 195–210.
20. Kostrowicki, J.; Liwo, A. *Talanta***1990**, 37, 645–650.
21. Makowska, J.; Rodziewicz-Motowidło, S.; Bagińska, K.; Makowski, M.; Vila, J.A.; Liwo, A.; Chmurzynski, L.; Scheraga, H. A. *Biophys J* **2007**, 92, 2904–2917.
22. Klotz, I.M.: Protein interactions. In: Neurath, H., Bailey, K. (eds.) *The Proteins*, vol 1, part B, 748–753. Academic Press, New York (**1953**)

23. M.S. Searle, D.H. Williams, L.C. Packman, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 999–1006.
24. P.S. Kim, R.L. Baldwin, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, 59, 631–660
25. J.E. Brown, W.A. Klee, *Biochemistry* **1971**, 10, 470–476.
26. D.N. Silverman, D. Kotelchuck, G.T. Taylor, H.A. Scheraga, *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, 150, 757–766.
27. M.A. Jimnez, J. Herranz, J.L. Nieto, M. Rico, J. Santoro, *FEBS Lett.* 221 (1987) 320–324.
28. M.A. Jimnez, M. Rico, J. Herranz, J. Santoro, J.L. Nieto, *Eur. J. Biochem.* 175(1988) 101–109.
29. H.J. Dyson, G. Merutka, J.P. Waltho, R.A. Lerner, P.E. Wright, *J. Mol. Biol.* 22 (1992) 795–817
30. Y. Kuroda, *Biochemistry* 32 (1993) 1219–1224.
31. V. Munoz, L. Serrano, M.A. Jimnez, M. Rico, *J. Mol. Biol.* 4 (1995) 648–669.
32. F.J. Blanco, L. Serrano, *Eur. J. Biochem.* 230 (1995) 634–649.
33. S.H. Park, W. Shalongo, E. Stellwagen, *Biochemistry* 32 (1993) 7048–7053.
34. S. Marqusee, V.H. Robbins, R.L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 5286–5290.
35. Cox JPL, Evans PA, Packman LC, Williams DH, Woolfson DN. *J Mol Biol* 1993;234:483–49
36. Blanco FJ, Jimnez MA, Herranz J, Rico M, Santoro J, Nieto J. *J Am ChemSoc* 1993;115:5887–5888.
37. Blanco FJ, Rivas G, Serrano L. *Nat StructBiol* 1994;1:584–590.
38. Searle MS, Zerella R, Williams DH, Packman LC. *Protein Eng* 1996;9:559–565.
39. Doig AJ, Errington N, Iqbalsyah TM. In: Buchner J, Kiefhaber T, editors. *Protein folding handbook*. Part I. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2005. pp 247–313.
40. Alexander P, Fahnestock S, Lee T, Orban J, Bryan P. *Biochemistry* 1992;31:3597–3603.
41. Tashiro M, Montelione GT. *CurrOpinStructBiol* 1995;5:471–481.
42. Derrick JP, Wigley DB. *J MolBiol* 1994;243:906–918.
43. Alexander P, Orban J, Bryan P. *Biochemistry* 1992;31:7243–7248.
44. Viguera AR, Martinez JC, Filimonov VV, Mateo PL, Serrano L. *Biochemistry* 1994;33:2142–2150.
45. Honda S, Kobayashi N, Munekata E, Uedaira H. *Biochemistry* 1999;38:1203–1213.
46. Ding K, Louis JM, Gronenborn AM. *J Mol Biol* 2004;335:1299–1307.
47. Skwierawska A, Oldziej S, Liwo A, Scheraga HA. *Biopolymers* 2009;91:37–51.
48. Munoz V, Thompson PA, *Nature* 1997;390:196–199.
49. Ngyuyen, H.; Jager, M.; Moretto, A.; Gruebele, M.; Kelley, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 3948–3953.
50. Sharpe, T.; Jonsson, A.; Rutheford, T. J.; Daggett, V.; Fersht, A. R. *Protein Sci.* 2007, 16, 2233–2239.
51. Macias, M. J.; Gervais, V.; Civera, C.; Oschnikat, H. *Nat. Struct. Biol.* 2000, 7, 375–379.
52. Miyazawa, T. ; *Poly- α -Amino Acids. Protein Models for Conformational Studies* (Fasman, G.D., ed.), Marcel Dekker, New York, **1967**, 69-103.
53. A. Skwierawska, W. Żmudzińska, S. Oldziej, A. Liwo, H. A. Scheraga *Proteins: Struct. Func. Bioinfo.* **2009**, 76, 637-654.
54. Lewandowska A, Oldziej S, Liwo A, Scheraga HA *Biopolymers* **2010**, 93, 469-480.
55. Lindorff-Larsen K, Piana S, Dror RO, Shaw DE How fast-folding proteins Fold? *Science* **2011**, 334, 517-520.

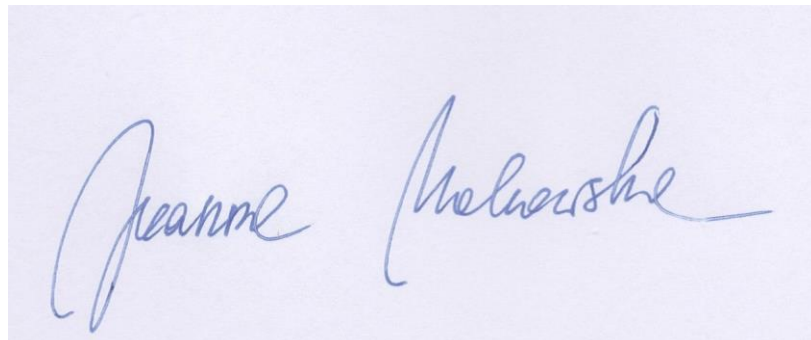
56. Kurova P, Simone AD, Otyepka M, Best RB Force-field dependence of Chignolin folding and misfolding: comparison with experiment and redesign. *Biophysical Journal* **2012**, 102, 1897-1906.
57. Enemark S, Rajagopalan R, Turn-directed folding dynamics of β -hairpin-forming *de novo* decapeptide chignolin. *Phys Chem Chem Phys* **2012**, 14, 12442-12450.
58. Chung Y. J.; Christianson L. A.; Stanger H. E.; Powell D. R.; Gellman S. H.; *JACS* **1998**, 120,10555-10556.
59. von Roedern E. G.; Lohof E.; Hessler G.; Hoffmann M.; Kessler H.; *JACS* **1996**, 118, 101656-10167.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

W skład mojego dorobku naukowego wchodzi: 40 publikacji z *listy filadelfijskiej* (w tym 9 stanowi osiągnięcie naukowe), 2 publikacje w czasopismach spoza *listy filadelfijskiej*, 4 rozdziały w książkach, 7 streszczeń konferencyjnych, 10 publikacji w materiałach zjazdowych oraz 49 prezentacji na konferencjach krajowych i zagranicznych oraz 1 wygłoszony referat podczas konferencji, których jestem współautorem. Moje zainteresowania naukowe dotyczą: analizy konformacyjnej peptydów prowadzonej za pomocą obliczeń teoretycznych na podstawie badań eksperymentalnych, właściwości kwasowo-zasadowych peptydów, badań równowag kwasowo-zasadowych, metody temperaturowego miareczkowania potencjometrycznego, pomiarów mikrokalorymetrycznych DSC. Lista publikacji, opis mojego udziału w każdej z tych prac, index Hirscha, sumaryczny impact factor, liczba cytowań oraz liczba recenzowanych przeze mnie prac zawarte zostały w dokumencie pt. „*Dorobek naukowy*”.

Niedawno rozpoczęłam badania nad tworzeniem się oddziaływań pomiędzy jonami miedzi (II) a fragmentami peptydowymi wyizolowanymi z małych białek o znanej strukturze trzeciorzędowej w celu oceny roli konformacji peptydów w przebiegu reakcji kompleksowania. Wykorzystałam w tym celu metodę ITC (izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne) [J. Makowska, D. Wyrzykowski, P. Hirniak, D. Uber, L. Chmurzyński “Investigations of copper(II) complexation by fragments of the FBP28 protein using isothermal titration (ITC) and differential scanning calorimetry (DSC)” *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2015** (IF = 2,206) 121, 1, 263-268] oraz w niektórych przypadkach metody fluorescencyjne [J. Makowska, K. Żamojć, D. Wyrzykowski, D. Uber, M. Wierzbička, W. Wiczek, Lech Chmurzyński “Binding of Cu(II) ions to peptides studied by fluorescence spectroscopy and isothermal titration calorimetry” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2016** (IF = 2,360) 153, 451-456]. Badania pokazały, że powinowactwo fragmentów peptydowych pochodzących z wybranego białka do jonów Cu (II) jest bardzo zależne od preferencji konformacyjnych. W przyszłości mam zamiar rozwinąć badania w tym kierunku. W pierwszej kolejności zamierzam zbadać wpływ jonów metali na

stabilność termodynamiczną i kinetyczną procesu zwijania się małych białek (pomiar DSC, spektroskopia NMR) jednocześnie wykonując badania nad stabilnością wybranych peptydów, w zależności od pH i innych czynników zewnętrznych.

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored background. The signature reads "Jeanne Melrose" in a cursive script. The first name "Jeanne" is written with a large, looping initial 'J'. The last name "Melrose" is written with a long, sweeping horizontal stroke at the end.