



**Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Wydział Chemii**

dr Katarzyna Kurpiewska

**Badania stabilności konformacyjnej wybranych białek i
ich form zmutowanych w warunkach standardowych oraz
wysokiego ciśnienia**

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych w
związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Kraków 2020

Spis treści

1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne- z podaniem podmiotu nadającego stopień, rok ich uzyskania oraz tytuł rozprawy	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych	4
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.	4
4.1. Omówienie celu naukowego przedłożonych publikacji oraz najważniejszych wyników	4
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej. .	21
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.	22
7. Inne aspekty działalności naukowej	26

1. Imię i nazwisko

Imię i nazwisko: **Katarzyna Kurpiewska**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne- z podaniem podmiotu nadającego stopień, rok ich uzyskania oraz tytuł rozprawy

2007 **doktor nauk chemicznych**
nadany przez Uniwersytet Jagielloński

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Wpływ mutacji na stabilność strukturalną RNazy A*”
(wyróżniona praca doktorska)

Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Lewiński

Recenzenci: Prof. dr hab. Irena Roterman-Konieczna (Collegium Medicum UJ)
Prof. dr hab. Grzegorz Bujacz (Politechnika Łódzka)

2003 **magister chemii**
nadany przez Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Tytuł pracy magisterskiej: „*Wpływ beta-karotenu i kwasów tłuszczowych na proliferację i apoptozę komórek czerniaka*”

Promotor: Prof. dr hab. Piotr Laidler (opieka dr Barbara Gil)

Recenzent: Prof. dr hab. Grażyna Stochel

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

Aktualne miejsca zatrudnienia:	Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Chemii, ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków, Zakład Krystalochemii i Krystalofizyki, Zespół Biokrytalografii
	Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera, Polskiej Akademii Nauk, ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków Zespół Biokatalizy Teoretycznej i Eksperymentalnej
Zajmowane stanowiska:	
listopad 2012 – do chwili obecnej	adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński
luty 2017 – do chwili obecnej	adiunkt, Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera, Polskiej Akademii Nauk
październik 2007 – wrzesień 2012	asystent, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński
październik 2003 – wrzesień 2007	doktorant, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

4.1. Omówienie celu naukowego przedłożonych publikacji oraz najważniejszych wyników

Badania stabilności konformacyjnej wybranych białek i ich form zmutowanych w warunkach standardowych oraz wysokiego ciśnienia.

Wprowadzenie

W złożonym procesie biosyntezy białka kluczowym etapem jest uzyskanie przez łańcuch polipeptydowy prawidłowej struktury przestrzennej. Poprawnie sfałdowane białko, charakteryzujące się odpowiednią konformacją ma szansę pełnić wymaganą funkcję biologiczną, zapewniając optymalny przebieg procesów, w które jest zaangażowane [1]. Konformacja białka definiowana jest jako ułożenie w przestrzeni budujących go atomów, których wzajemne położenie określa kształt makromolekuły. Wieloletnie badania wykazały, że białka w większości są wysoce zorganizowanymi strukturami. Jednak powyższe stwierdzenie odnosiło się do wyników prac badawczych prowadzonych jeszcze w latach 90. XX wieku, kiedy to pojawiły się pierwsze doniesienia o odkryciu białek nieposiadających stabilnej struktury drugo- i trzeciorzędowej, które nazwano białkami inherentnie nieustrukturyzowanymi (również nieuporządkowanymi) [2]. Najnowsze analizy bioinformatyczne sugerują, że 25-30% eukariotycznych białek jest w dużej mierze nieuporządkowanych, a ponad połowa posiada długie nieuporządkowane regiony. Brak ściśle określonej struktury trzeciorzędowej stwierdzono do tej pory głównie w białkach zaangażowanych w mechanizmy regulacyjne oraz szlaki przekazywania sygnałów. Zwiększona labilność tych białek ma uzasadnienie w specyfice procesów, w których biorą

udział. Co więcej badania wykazały, że o tendencji do tworzenia nieuporządkowanego fragmentu w danym białku decyduje odmienny skład aminokwasowy białek nieustrukturyzowanych w porównaniu z tym obserwowanym w białkach o stabilnej i określonej strukturze. W obydwu opisanych przypadkach tj. w odniesieniu do białek ustrukturyzowanych jako i nieuporządkowanych podstawowymi siłami napędowymi biorącymi udział w uzyskaniu i utrzymaniu wymaganej konformacji są kontakty występujące wewnątrz cząsteczek, jak i oddziaływania z otoczeniem. Grupowanie i izolowanie reszt hydrofobowych, tworzenie wiązań wodorowych, utworzenie korzystnych kontaktów van der Waalsa i minimalizacja barier sterycznych oraz zmniejszenie entropii łańcucha aminokwasowego to czynniki, które warunkują konformacje białek [3]. Te same siły zapewniają istnienie biologicznych makrocząsteczek w równowadze między stanem sfałdowanym i rozfałdowanym, a stosunek obydwu form określany jest mianem stabilności konformacyjnej.

Kolejnym zagadnieniem łączącym się z konformacją białek są procesy agregacji, czyli formowanie się skupisk łańcuchów polipeptydowych charakteryzujących się zauważalnie większą masą od fizjologicznie występujących makrocząsteczek, powstających w wyniku tworzenia przez pojedyncze cząsteczki nienaturalnych kontaktów wewnątrz- i międzycząsteczkowych [4]. Zjawisko agregacji białek ma ogromne znaczenie ze względu na rolę jaką białkowe agregaty pełnią w wielu poważnych i w większości nieuleczalnych chorobach. Schorzenia spichrzeniowe (około 5000 tego typu chorób), do których zalicza się między innymi kardiomiopatię rozstrzeniową, amyloidozę, mukopolisacharydozę, gangliozydozę, chorobę Fabry'ego, lipidozę, glikogenozę, chorobę Danona, chorobę Pompego czy hemochromatozę [5] są ciężkimi dysfunkcjami, w których zagregowane białka odkładają się w różnych narządach. Odrębną grupę chorób o podobnym podłożu fizjologicznym stanowią choroby neurodegeneracyjne. Związane ze stopniową degeneracją i/lub obumieraniem komórek nerwowych: choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, choroba prionowa, stwardnienie zanikowe boczne, choroba Huntingtona czy ataksja rdzeniowo-mózdkowa stanowią poważne wyzwanie dla współczesnej medycyny [6]. Co więcej agregacja białek jest problemem niezmiernie ważnym w przypadku opracowywania najnowszych metod leczenia z wykorzystaniem białek terapeutycznych [7]. Obok obniżenia efektywności stosowanych preparatów agregacja może wywoływać również niepożądane odpowiedzi immunologiczne u pacjentów. Zatem zrozumienie procesu agregacji białek na poziomie molekularnym i opracowanie metod powstrzymywania/kontrołowania tego zjawiska jest interesującym i niezwykle aktualnym kierunkiem badań szczególnie w walce z chorobami konformacyjnymi oraz ważnym aspektem rozwoju biofarmaceutycznych środków terapeutycznych.

Z perspektywy zarysowanej powyżej roli konformacji białek w prawidłowym funkcjonowaniu organizmów zrozumienie, w jaki sposób zmiana konformacji wpływa na przebieg biologicznych zjawisk i procesów ma zasadnicze znaczenie również dla:

- regulacji aktywności białek,
- zrozumienia oddziaływań białko-ligand, białko-białko,

- racjonalnego projektowania leków w oparciu o informacje strukturalne białkowego celu terapeutycznego,
- modelowania mechanizmów molekularnych.

Kontynuowane od lat badania ujawniły, że stabilność konformacyjna białek jest zagadnieniem wieloaspektowym i wymaga szerszego spojrzenia angażującego analizę wyników badań biochemicznych, biofizycznych oraz strukturalnych, jak również identyfikację czynników wywołujących zmiany w konformacji makromolekuł. Biorąc pod uwagę środowisko w jakim występują białka, źródłem zmian w konformacji białka mogą być parametry fizykochemiczne takie jak pH, stężenie soli, siła jonowa, ciśnienie czy temperatura (czynniki zewnętrzne) oraz mutacje sekwencji aminokwasowej, przyłączenie ligandów czy modyfikacje potranslacyjne (czynniki wewnętrzne). W swoich badaniach skoncentrowałam się na analizie wpływu na konformację białek dwóch spośród wymienionych czynników: mutacji oraz ciśnienia.

Wykorzystanie osiągnięć biologii molekularnej do uzyskiwania zmutowanych form białek stało się możliwe w 70. latach XX wieku, głównie w związku z przełomowymi odkryciami w zakresie analizy i edycji materiały genetycznego. Obecnie metody inżynierii genetycznej pozwalają na zaawansowane modyfikacje, racjonalną i ukierunkowaną mutagenezę, a tym samym na otrzymywanie białek o określonej strukturze pierwszorzędowej. Wykorzystanie wydajnych systemów ekspresji rekombinowanych białek w komórkach pro- i eukariontów pozwala na szybkie i bezpieczne wyprodukowanie białek, które następnie są izolowane i oczyszczane metodami chromatografii [8]. Wprowadzone mutacje mogą mieć wpływ na własności fizykochemiczne białka (fałdowanie, stabilność) jak również na jego funkcje (aktywność, oddziaływanie z innymi białkami). Badanie mających miejsce modyfikacji pozwala w konsekwencji na projektowanie białek o korzystniejszych cechach w porównaniu z ich formami natywnymi. Enzymologia jest tym obszarem nauk biologicznych, która szczególnie intensywnie i skutecznie wykorzystuje mutagenezę do uzyskiwania biokatalizatorów o ściśle określonych cechach [9]. Pomimo ogromnej liczby badań i prób przewidzenia wpływu mutacji na wybrane własności białek nie udało się dotychczas zaproponować jasnych reguł rządzących zależnością strukturalno-funkcjonalną zmutowanych białek, dlatego każdy przypadek analizowany jest indywidualnie i często wymaga wykonania wielu eksperymentów oraz zaangażowania szeregu technik badawczych.

Aby zrozumieć molekularne mechanizmy wrażliwości układów biologicznych na działanie wysokiego ciśnienia, naukowcy opracowali szeroki zakres technik wysokociśnieniowych i wyrafinowanych instrumentów. Zastosowanie ciśnienia jako parametru termodynamicznego w biologii po raz pierwszy miało miejsce pod koniec XIX wieku [10]. W ciągu kolejnych dziesięcioleci badacze skupiali się na zrozumieniu, w jaki sposób ciśnienie wpływa na strukturę oraz funkcję białka i odkryli, że obserwowane zmiany istotnie zależą od wartości ciśnienia jakiemu zostaje poddany badany układ. Odwracalne zmiany obserwowane są pod stosunkowo niskim ciśnieniem i skorelowane są z małą zmianą objętości układu. Ciśnienie poniżej 150-200 MPa (100 MPa = 1 kbar) wpływa na wiązania wodorowe i może prowadzić do zmian konformacji białka, w których można zaobserwować zmniejszenie wewnętrznych wnęk hydrofobowych w cząsteczkach białka. Jeśli ciśnienie przekracza 200 MPa, oddziaływania międzycząsteczkowe i struktura trzeciorzędowa ulegają destabilizacji [11]. Dochodzi do zwiększenia powierzchni cząsteczki, a tym samym do

wzrostu hydratacji w formach monomerycznych białka oraz do powiększenia się przestrzeni pomiędzy monomerami w formach oligomerycznych, co może prowadzić do ich dysocjacji [12]. Przy zastosowaniu wyższych wartości ciśnienia może dojść do rozfałdowania białka i jego denaturacji. Tego typu odpowiedź łańcucha polipeptydowego obserwuje się przy około 500 MPa, ale nie jest to wartość graniczna i w znacznym stopniu zależy od białka. Dla różnych białek zakres ciśnienia, w którym dochodzi do rozfałdowania obejmuje wartości od 100 MPa nawet do 1 GPa [13]. Ponadto, ponieważ udowodniono, że sfałdowany łańcuch polipeptydowy może występować w wielu stanach energetycznych naukowcy zaproponowali szczególne własności ciśnienia do ich zbadania. Wykazano, że wysokie ciśnienie może zostać zastosowane jako parametr pozwalający na kontrolowane 'filtrowanie' energetycznych stanów białka, co umożliwi ich zbadanie [14]. Występowanie wielu stanów energetycznych, a co za tym idzie różnych konformacji białek, warunkuje ich prawidłowe funkcjonowanie i zapewnia skuteczną degradację [15].

Metody oferujące analizę względnych pozycji atomów w strukturze zostały zdominowane przez krystalografię rentgenowską. Niemniej jednak magnetyczny rezonans jądrowy, rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami i kriomikroskopia elektronowa stanowią niebywale szybko rozwijające się metody przyczyniające się do ogromnego postępu współczesnej biologii strukturalnej. Idea wykorzystania danych strukturalnych do analizy przestrzeni konformacyjnej białek poprzez wyznaczenie struktury tego samego białka w odmiennych warunkach, na przykład w różnej temperaturze, pojawiła się w pracy Fraser'a i współpracowników [16]. Najmłodszą techniką, która także pozwala na tego typu analizy, jest połączenie klasycznej krystalografii białek z możliwością wykonania pomiaru dla kryształu białka poddanego działaniu wysokiego ciśnienia [17]. Zaplanowany w opisanym powyżej sposób eksperyment jest nietypowym podejściem i wyzwaniem. W pomiarach tego typu stosuje się specjalne komory wysokociśnieniowe, w których kluczowym elementem są diamenty (ang. *diamond anvil cell*; *DAC*) [18]. Krystalografia w warunkach wysokiego ciśnienia (ang. *High Pressure Protein Crystallography*; *HPPX*) jest unikalną techniką pozwalającą na uzyskanie informacji strukturalnych o konformacji białka uzyskanej w warunkach podwyższonego ciśnienia [19]. Dzieje się tak, ponieważ kryształy białka charakteryzują się wysoką zawartością wody (20-80%) i posiadając obszary wody pomiędzy cząsteczkami białek pozwalają na przeniesienie nacisku hydrostatycznego na łańcuchy polipeptydowe z jednoczesnym zachowaniem uporządkowania warunkującego zajście zjawiska dyfrakcji. Rozwojowi metod eksperymentalnych towarzyszył również znaczny postęp metod *in silico* umożliwiających zaprojektowanie symulacji analizujących odpowiedź cząsteczek białek na zaburzenie w postaci podwyższonego ciśnienia. Rosnąca moc obliczeniowa centrów bioinformatycznych pozwala obecnie na modelowanie wpływu wysokiego ciśnienia na rozbudowane układy biologiczne [20] stając się źródłem cennych informacji uzupełniających obserwacje eksperymentalne.

Poszukiwanie zależności pomiędzy strukturą przestrzenną a stabilnością konformacyjną białka jest zagadnieniem, którym zajmuję się już od czasu studiów doktoranckich na Wydziale Chemii UJ. Realizowane przeze mnie badania skupiają się na wykorzystaniu rentgenowskiej analizy strukturalnej monokryształów białek do analizy konformacji makrocząsteczek obserwowanych w kryształach. Swoje badania skoncentrowałam na zidentyfikowaniu w wybranych białkach zmian strukturalnych wywołanych zarówno modyfikacją struktury pierwszorzędowej jak również czynnikiem zewnętrznym.

Na podstawie otrzymanych wyników prezentowanych w pracach [H1-H9] wyciągnęłam wnioski dotyczące wpływu wspomnianych czynników na konformacje badanych białek. Badaniami objęłam biomakromolekuły, które wykazują interesujące własności biofizyczne i/lub wykazują tendencję do tworzenia nieprawidłowych konformacji pod wpływem wysokiego ciśnienia. Szczególnie prace dotyczące białek mających zdolność do tworzenia agregatów stanowią obecnie atrakcyjny kierunek badań ze względu na potrzebę opracowania profilaktyki i leczenia schorzeń neurodegeneracyjnych nasilających się u mieszkańców krajów wysokorozwiniętych.

Prezentowane badania strukturalne opisane w pracach H1, H5-H6 dotyczą białek z rodziny rybonukleaz. Białka te zostały wyprodukowane przeze mnie w trakcie staży w Laboratori d'Enginyeria de Proteines, Departament de Biologia, Facultat de Ciencies, Universitat de Girona. Otrzymane preparaty posłużyły do analizy wpływu mutacji na stabilność konformacyjną łańcuchów polipeptydowych badanych białek. Prace te stanowiły wkład naukowców z Wydziału Chemii UJ w międzynarodowy projekt badawczy „*High Pressure Tuning of Chemical and Biochemical Processes*” w ramach COST- European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research, Action D30. Wyniki otrzymane w publikacjach H2-H3 prezentują szereg struktur kompleksów β -laktoglobuliny z ligandami. Wspomniane prace odnoszą się do wykorzystania zdolności wiązania przez β -laktoglobulinę ligandów należących do różnych klas związków, wpływu tego wiązania na strukturę białka oraz identyfikacji ligandów, które wspomagają proces krystalizacji. Powyższe zagadnienia stanowią nieustająco rozwijający się nurt badań ze względu na szczególną rolę β -laktoglobuliny zarówno w przemyśle mleczarskim, jak i w naukach biologicznych. W przypadku szeregu prac dotyczących krystalografii białek w warunkach wysokiego ciśnienia, obok pracy przeglądowej [H4], analizowałam modyfikacje konformacji cząsteczek białek wywołane wpływem wysokiego ciśnienia w oparciu o dane strukturalne [H6-H9]. Wykonanie tych unikalnych eksperymentów ujawniło, że konformacje wysokociśnieniowe wybranych białek są odmienne od konformacji obserwowanych w warunkach ciśnienia atmosferycznego, a badane białka poddane działaniu wysokiego ciśnienia wykazują inne zachowanie na przykład w procesie adsorpcji [H7].

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań strukturalnych, przedstawione w cyklu publikacji [H1-H9], stanowią podstawę osiągnięcia habilitacyjnego. Poniższy opis zawiera przegląd przeprowadzonych badań i najważniejszych wniosków wyciągniętych na podstawie analiz uzyskanych rezultatów.

Cel badań

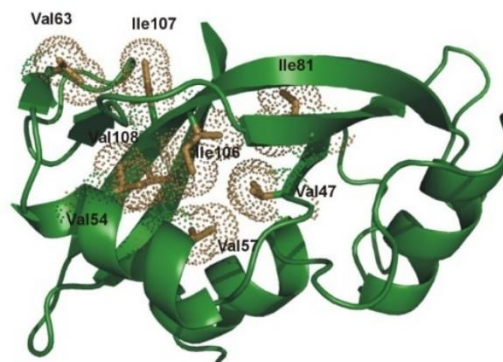
Celem prowadzonych przeze mnie badań jest **identyfikacja molekularnych podstaw warunkujących stabilność konformacyjną wybranych białek w oparciu o analizie struktur krystalicznych wyznaczonych dla ich form natywnych i zmodyfikowanych z zastosowaniem pomiarów standardowych oraz wysokociśnieniowych.** Uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie aplikacyjne jako wskazówki w procesach stosowanych w przemyśle spożywczym np. w optymalizacji procesu paskalizacji oraz w medycynie w aspekcie opracowywania nowych strategii leczenia chorób molekularnych czy zapobiegania agregacji białkowych preparatów terapeutycznych. Prezentowane badania strukturalne są prowadzone wielowątkowo, z uwzględnieniem białek o różnych funkcjach biologicznych i odmiennej budowie.

Omówienie najważniejszych wyników

W swoich badaniach zajęłam się wyjaśnieniem wpływu mutacji i/lub ciśnienia na stabilność konformacyjną wybranych białek. Obiektem moich badań były białka globularne różniące się pod względem funkcji (enzymy, białko transportujące, białko regulacyjne), wielkości, stanu oligomeryczności oraz procentowej zawartości α -helis i β -arkuszy. W ten sposób dokonany wybór badanych białek pozwolił na uzyskanie interesujących wyników, zdyswersyfikowanych zarówno pod względem strukturalnym jak i biologicznym.

Strukturalne badania wpływu mutacji na konformację białek z rodziny rybonukleaz

Publikacje stanowiące zestaw prac badawczych skoncentrowanych na analizie wpływu mutacji na stabilność konformacyjną makromolekuł obejmują badania białek należących do rodziny rybonukleaz: wołowej trzustkowej rybonukleazy A (RNazy A) [H1] oraz onkonazy z *Rana pipiens* [H5]. Rybonukleaza A jest enzymem, którego główną funkcją jest rozkładanie wiązań fosfodiesterowych w kwasach rybonukleinowych [21]. Zaprojektowane zmutowane formy RNazy A wprowadzały resztę alaniny w pozycjach aminokwasów określonych jako kluczowe w procesie inicjacji ładowania badanego białka (ang. *chain folding initiation site*) [22], w pozycjach V47, V54, V57, I81, I106 oraz V108 (Rys. 1). Dla wymienionych enzymów wyznaczono stabilność ciśnieniową $p_{1/2}$, która okazała się być znacząco niższa od wartości wyznaczonej dla formy natywnej oraz różnice w entalpii swobodnej $\Delta\Delta G_T$ (Tabela 1). W celu wyjaśnienia wspomnianych różnic wyznaczyłam strukturę natywnej formy RNazy A (struktura referencyjna) oraz sześć struktur zmutowanych form RNazy A. Rozdzielczości wyznaczonych struktur i ich identyfikatory w bazie Protein Data Bank podano w tabeli 1.

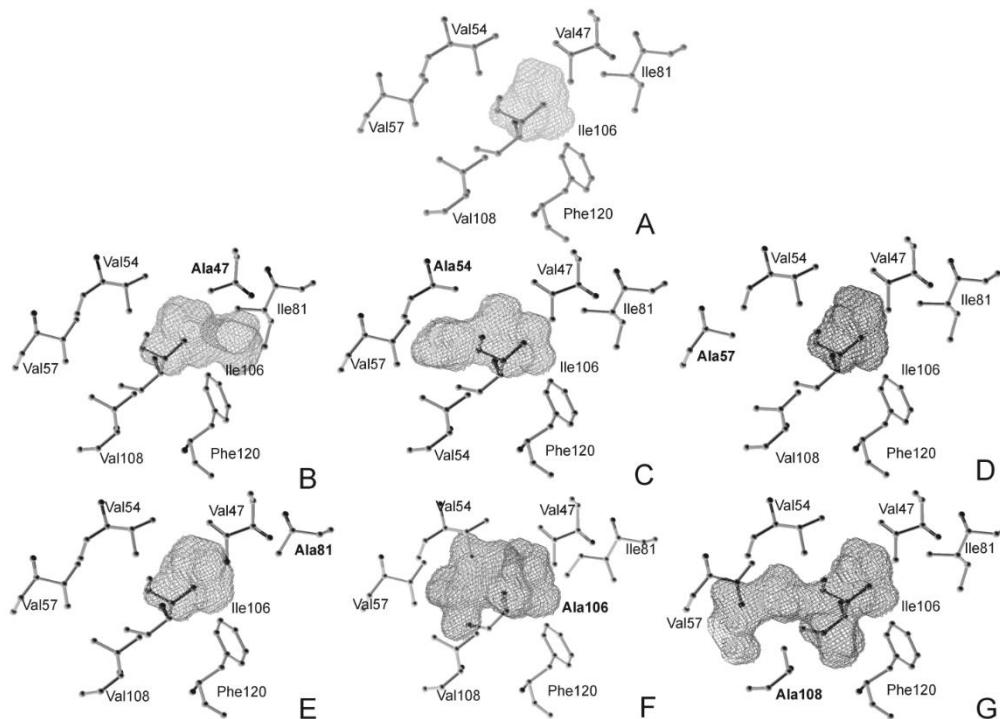


Rys. 1. Część cząsteczki RNazy A z zaznaczonymi miejscami wprowadzonych pojedynczych mutacji.

Tabela 1. Struktury RNazy A i jej zmutowanych form opisanych w pracy H1.

	WT	V47A	V54A	V57A	I81A	I106A	V108A
PDB ID	3DH5	3DH6	3DI7	3DI8	3DI9	3DIB	3DIC
Rozdzielczość (Å)	1.51	1.52	1.48	1.50	1.80	1.40	1.52
$p_{1/2}$ (MPa)	500	87	190	160	161	40	56
$\Delta\Delta G_T$ (kJmol ⁻¹)	-	10.79	11.93	12.50	15.90	17.57	18.29

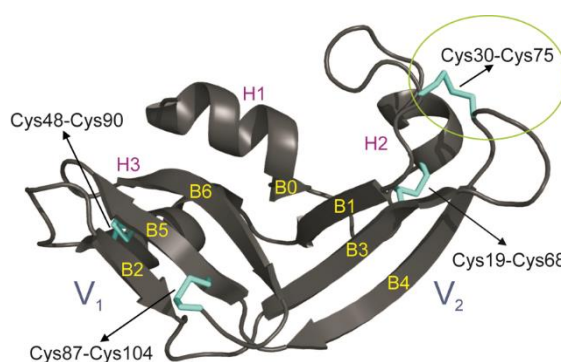
Przeprowadzona szczegółowa analiza różnic w strukturach zmutowanych form badanego enzymu ujawniła, że subtelne zmiany dotyczą całej cząsteczki RNazy A, jednak do najwyraźniejszych zmian dochodzi w obrębie głównej wnęki hydrofobowej (Rys. 2). Jej objętość w formie natywnej RNazy A wynosi 30.8 Å³ i jest ponad trzykrotnie mniejsza od objętości wyznaczonej dla formy I108A osiągającej wartość 104.3 Å³. Ponadto, porównałam również inne parametry strukturalne, w tym liczbę wiązań wodorowych, objętość i powierzchnię cząsteczki, całkowitą powierzchnię dostępną dla rozpuszczalnika, całkowitą powierzchnię hydrofobową oraz liczbę kontaktów w odległości mniejszej niż 6 Å³ w celu



Rys. 2. Zmiany w objętości głównej wnęki hydrofobowej w wyznaczonych strukturach: forma natywna (A), V47A (B), V54A (C), V57A (D), I81A (E), I106A (F), and V108A (G).

analizy zmian w upakowaniu cząsteczek. W oparciu o uzyskane dane wykazałam, że stabilność ciśnieniowa i temperaturowa zmutowanych form RNazy A w większości przypadków skorelowana była ze zmianą konformacji badanego białka oraz wielkością obszaru w obrębie głównej wnęki hydrofobowej. Wyniki zamieszczone w publikacji **H1** stanowiły doskonałą podstawę do podjęcia dalszych prac badawczych z zastosowaniem drugiego czynnika zanurzającego konformację jakim było ciśnienie. Tym samym opisane eksperymenty dla RNazy A wykonane przez mnie w warunkach standardowych pozwoliły na wybranie odpowiedniego układu do doświadczeń z wykorzystaniem nowatorskiego podejścia w badaniach rentgenograficznych makromolekuł tj. krystalografii w warunkach wysokiego ciśnienia, które zostaną opisane na dalszych stronach autoreferatu.

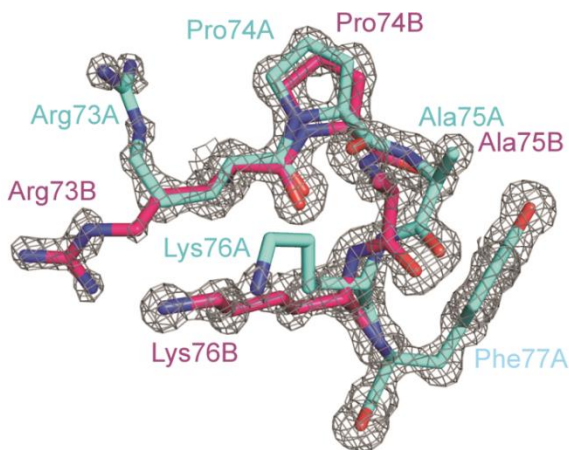
Drugim białkiem badanym w aspekcie wpływu mutacji na konformację makrocząsteczek była onkonaza (z *Rana pipiens*), nazywana również białkiem P-30, należąca do rodziny rybonukleaz i wykazująca właściwości przeciwnowotworowe [23]. Cząsteczka onkonazy stabilizowana jest przez cztery mostki dwusiarczkowe: Cys19-Cys68, Cys30-Cys75, Cys48-Cys90 oraz Cys87-Cys104. W przypadku tego małego białka o łańcuchu aminokwasowym zbudowanym ze 104 reszt (Rys. 3), mutacji poddano jeden z mostków, a dokładniej mostek Cys30-Cys75. Białko z usuniętym mostkiem



Rys. 3. Cząsteczka onkonazy z zaznaczonymi mostkami dwusiarczkowymi i miejscem mutacji.

dwusiarczkowym w podanej pozycji (C30A/C75A) naśladuje stan pośredni zidentyfikowany w ścieżce fałdowania onkonazy [24]. Co więcej, usunięcie mostka Cys30-Cys75 doprowadziło do obniżenia stabilności termicznej onkonazy. Podobnie jak w pracy dotyczącej rybonukleazy A wyznaczenie struktury zmutowanej formy onkonazy C30A/C75A miało na celu wyjaśnienie na poziomie strukturalnym zmian wywołanych przez wprowadzoną modyfikację.

Otrzymane kryształy onkonazy C30A/C75A, dla których pomiar wykonano z wykorzystaniem dyfraktometru monokrystalicznego Wydziałowej Pracowni Rentgenografii WCh UJ, pozwoliły na rozwiązanie i udokładnienie struktury z rozdzielczością atomową



Rys. 4. Alternatywna konformacja fragmentu Arg73-Tyr77 pętli Val70-Tyr77 w cząsteczce onkonazy C30A/C75A (kolor niebieski- konformacja A, kolor różowy- konformacja B).

1.12 Å (PDB ID 3U01) opisaną w publikacji **H5. Utrata jednego mostka dwusiarczkowego okazała się nie mieć wpływu na zachowanie ogólnej konformacji białka**, dla której odchylenia standardowe średnich pozycji atomów w porównaniu ze strukturą natywną wynosiło 0.31 Å (dla atomów łańcucha głównego).

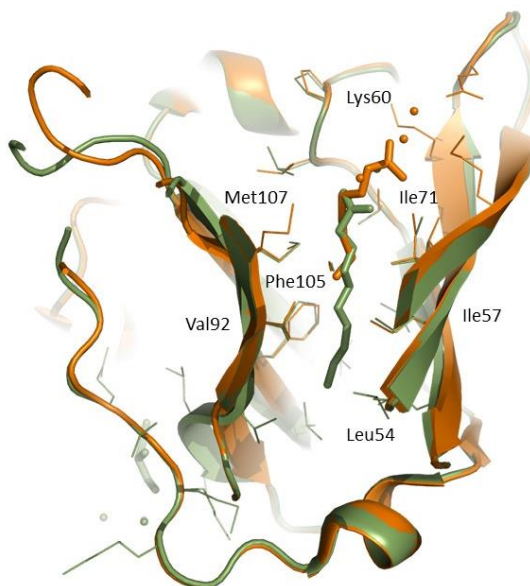
Największe zmiany zaobserwowano w rejonie pętli Val70-Tyr77, dla której fragmentu Arg73-Phe77 w strukturze krystalicznej zidentyfikowano alternatywną konformację przedstawioną na rysunku 4. Dodatkowe informacje przyniosło porównanie struktur metodą macierzy różnic odległości (ang. *difference distance matrix*). Analiza

takiej macierzy wykonanej dla struktury natywnej formy onkonazy i badanej formy zmutowanej ujawniła zmiany w konformacji białka pozbawionego wiązania dwusiarczkowego, które mogą mieć znaczenie dla oddziaływania onkonazy z innymi białkami. Subtelnej rearanżacji fragmentów cząsteczki zmutowanej onkonazy towarzyszył wzrost zarówno objętości cząsteczki o około 4.2% (z 2114 Å³ do 2204 Å³) jak i powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika o ponad 5% (z 5923 Å² do 6215 Å²) w porównaniu z wartościami wyznaczonymi dla formy natywnej. Świadczy to o wartościowej obserwacji, dotyczącej badanego układu. Mianowicie, pomimo zachowania ogólnej budowy przestrzennej, brak mostka dwusiarczkowego w pozycji Cys30-Cys75 doprowadził do uzyskania konformacji o mniejszym upakowaniu. Luźniejsza forma łańcucha polipeptydowego jest pierwszym etapem obserwowanym w procesie denaturacji białka, który pomaga zrozumieć zjawisko przeciwne jakim jest fałdowanie. Na tej podstawie oraz w oparciu o wyniki badań w roztworze, uzyskana przez mniejszą strukturę onkonazy C30A/C75A, reprezentującą odmienną od natywnej konformację, stanowi przykład zastosowania badań krystalograficznych jako narzędzia wspomagającego wysiłki mające na celu wyjaśnienie procesów nabywania i utrzymywania przez białko określonej konformacji.

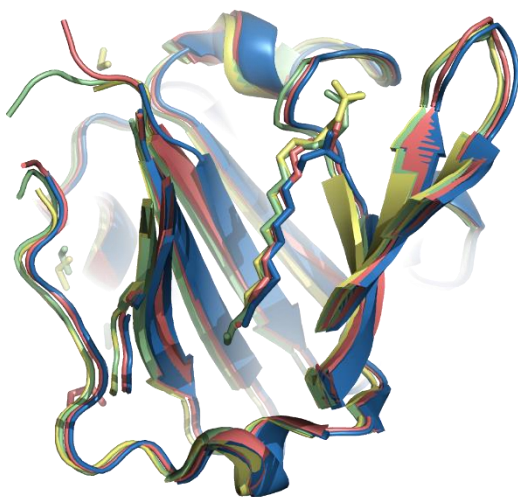
Badania strukturalne β-laktoglobuliny jako układu modelowego w eksperymentach krystalograficznych prowadzonych w warunkach wysokiego ciśnienia

Stanowiąca składnik serwatki wołowa β-laktoglobulina (BLG) jest globularnym białkiem z charakterystycznym kształtem miejsca wiążącego tworzonego przez β-baryłkę [25].

Sugeruje się, że biologiczną funkcją β -laktoglobuliny jest transport Ze względu na prostą izolację i trwałość BLG wykorzystywana jest w badaniach biologicznych, biochemicznych i biofizycznych jako białko modelowe w pionierskich eksperymentach. W ramach przeprowadzonych eksperymentów krystalizacyjnych w obecności ligandów udało się otrzymać struktury BLG z naturalnie występującymi w mleku nasyconymi kwasami tłuszczowymi: kwasem kaprylowym (kwas oktanowy, C8:0) oraz kwasem kaprynowym (kwas dekanowy, C10:0) o identyfikatorach PDB ID odpowiednio 3NQ9 i 3NQ3 [H3]. Uzyskano struktury krystaliczne z rozdzielczością 1.9 Å, które pozwoliły na analizę sposobu przyłączenia liganda w miejscu wiążącym. Wbrew literaturowym doniesieniom o obecności kilku miejsc wiążących BLG, wszystkie badane ligandy związały się z białkiem wypełniając wnękę wiążącą w stosunku 1:1. Części karboksylowe kwasów zidentyfikowane zostały przy powierzchni miejsca wiążącego, natomiast łańcuchy alifatyczny w jej wnętrzu (Rys. 5). C8:0 jak i C10:0 związały się z BLG dużo słabiej (pozorne stałe asocjacji wyniosły odpowiednio $10.8 \pm 1.7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ oraz $6.0 \pm 0.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$) w porównaniu z podawanymi w literaturze stałymi dla dłuższych kwasów tłuszczowych (dla kwasu palmitynowego $2.27 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) [26]. Przyłączenie liganda nie wpłynęło na zmiany w ogólnej konformacji białka, różnice w badanych strukturach głównie dotyczyły położenia samego liganda wewnątrz miejsca wiążącego (Rys. 5). Ponadto, w otrzymanych strukturach ligandy zidentyfikowane w miejscu wiążącym udokładniono z niepełnym obsadzeniem, 0.6 dla C8:0 i 0.7 dla C10:0 co pozostawało w korelacji z wyznaczonymi stałymi asocjacji.



Rys. 5. Położenie liganda w głównej wnękę wiążącej (kolor pomarańczowy- BLG-C8:0, kolor zielony- BLG-C10:0).

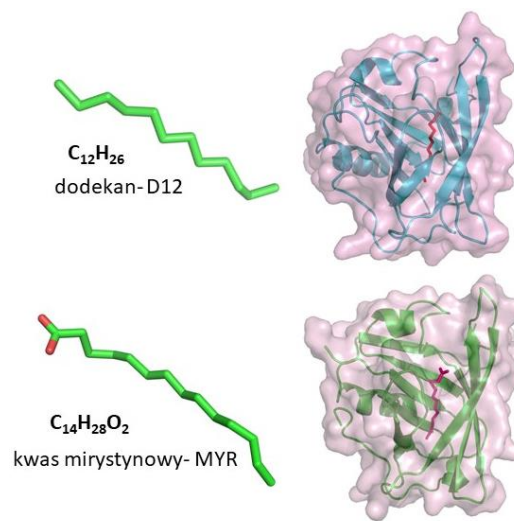


Rys. 6. Położenie liganda w głównej wnękę wiążącej (niebieski- BLG-C12:0, czerwony- BLG-C14:0, żółty- BLG-C16:0 i zielony- BLG-C18:0).

Dalsza strukturalna charakterystyka wpływu przyłączonego liganda na konformację cząsteczki β -laktoglobuliny dotyczyła kompleksów otrzymanych z nasyconymi kwasami tłuszczowymi o dłuższych łańcuchach: kwasem laurynowym (dodekanowy, C12:0), kwasem mirystynowym (tetradekanowy, C14:0), kwasem palmitynowym (heksadekanowy, C16:0) oraz kwasem stearynowym (oktadekanowy, C18:0) (H4). Otrzymane struktury zdeponowane zostały w bazie Protein Data Bank o identyfikatorach PDB ID odpowiednio: 3UEU, 3UEV, 3UEW, 3UEX (Rys. 6). W wyniku przeprowadzonych badań otrzymano struktury krystaliczne powyższych układów z rozdzielczością 2.1 Å (BLG-C12), 1.9 Å (BLG-C14), 2.0 Å (BLG-C16)

oraz 2.1 Å (BLG-C18). Porównanie otrzymanych struktur ujawniło, że pozycja grupy karboksylowej ściśle zależy od długości łańcucha alifatycznego. Podobnie jak w opisanych powyżej strukturach BLG z C8:0 i C10:0, część karboksylowa ligandów ulokowała się u wejścia do wnęki hydrofobowej, a łańcuchy alifatyczne w jej wnętrzu. Szczegółowa analiza danych strukturalnych wykazała, że sposób w jaki ligand jest wiązany przez BLG uwarunkowany jest przez długości łańcucha alifatycznego nasyconego kwasu. W przypadku kwasów tłuszczowych o łańcuchu alifatycznym zbudowanym z co najmniej 10 atomów węgla dominują interakcje hydrofobowe nad interakcjami polarnymi, a ligandy przyjmują pozycję głęboko osadzoną we wnęcie wiążącej. Odwrotną sytuację obserwuje się dla krótszych kwasów tłuszczowych. W zależności od długości łańcucha aminokwasowego zmieniał się również współczynnik obsadzenia ligandów, który wynosił 1 dla struktur BLG z C16:0 i C18:0, natomiast 0.7 dla C16:0 i 0.75 dla C14:0. Obserwacje te można skorelować z wyznaczonymi wartościami stałych asocjacji. Dla układu BLG-C16:0 ($K_a=20.43\pm 4.38\cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$) uzyskano znacząco wyższą wartość od stałych wyznaczonych dla BLG-C14:0 ($K_a=7.78\pm 1.60\cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$) czy BLG-C12:0 ($K_a=1.72\pm 0.15\cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$).

W rezultacie licznych eksperymentów krystalograficznych identyfikujących najkorzystniejsze warunki krystalizacji β -laktoglobuliny z szeregiem ligandów przedstawionych w pracach [H3-H4] dokonano wyboru układów białko-ligand (Rys. 7) optymalnych do przeprowadzenia badań wysokociśnieniowych. Ze względu na ściśle określone rozmiary komory wysokociśnieniowej uzyskanie odpowiedniej jakości i wielkości kryształów jest bowiem niezwykle istotnym etapem. Nie bez znaczenia był również fakt, iż w zadanych warunkach krystalizacyjnych BLG formowało w sposób powtarzalny kryształy o symetrii układu trygonalnego (P3₂21). Wysoka symetria kryształów jest pożądana ze względu na ograniczenia wynikające z budowy komory, które zostaną opisane poniżej.

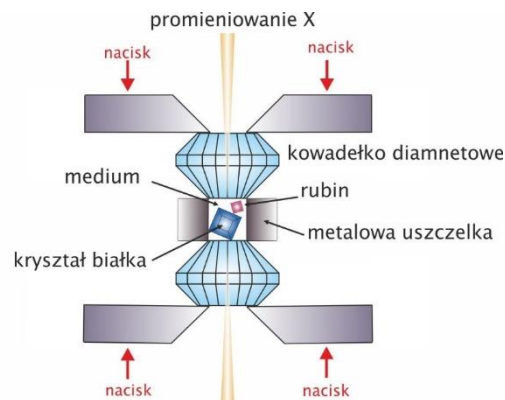


Rys. 7. Układy BLG-ligand wybrane do badań krystalograficznych w warunkach wysokiego ciśnienia.

Strukturalne badania białek w warunkach wysokiego ciśnienia

Ze względu na pionierski charakter badań dotyczących wyznaczania struktury białek, których kryształy poddawane są działaniu wysokiego ciśnienia w początkowej fazie prac skoncentrowałam się na opanowaniu techniki wykonywania takich pomiarów oraz przygotowaniu procedur w oparciu o wyniki wstępnych eksperymentów. Swoje doświadczenie w tej materii wraz z przeglądem doniesień naukowych dotyczących krystalografii białek w wysokim ciśnieniu przedstawiłam w publikacji przeglądowej [H2]. W opracowaniu tym znalazły się również pierwsze wyniki eksperymentów przeprowadzonych dla rybonukleazy A. Zakończony sukcesem eksperyment pomiaru dyfrakcji kryształu makrocząsteczki umieszczonego wewnątrz komory wysokociśnieniowej wymaga pokonania szeregu etapów, które niosą ze sobą różnorodne trudności. Stosowana w

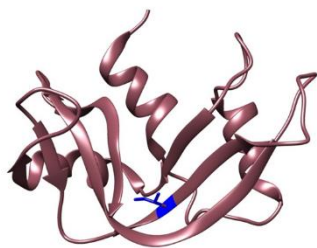
pomiarami komora typu Merrill-Bassett pozwala na wygenerowanie wysokiego ciśnienia we wnętrzu metalowej uszczelki, którą umieszcza się pomiędzy dwoma kowadełkami diamentowymi (Rys. 8). Skręcanie trzech śrub wywołuje nacisk powierzchni diamentów na medium hydrostatyczne wypełniające metalową uszczelkę i wygenerowanie ciśnienia w przestrzeni wypełnionej przez to medium, a tym samym w próbkach umieszczonych wewnątrz komory. Istotnym etapem w opisywanych pomiarach jest wyznaczenie ciśnienia panującego w komorze. Do tego celu zastosowałam pomiar przesunięcia linii widmowej fluorescencji rubinu, opracowany i opisany przez Piermarini'ego [27]. Kolejnymi etapami wymagającymi zastosowania odmiennego podejścia w porównaniu do standardowych pomiarów dyfrakcji jest immobilizacja kryształu wewnątrz komory, w otworze o średnicy 0.3-0.4 mm i wycentrowanie kryształu w komorze zamontowanej na goniostacie. Rejestracja danych pomiarowych oraz ich przetworzenie to ostatnie etapy eksperymentu, które także wymagają zastosowania dodatkowych ograniczeń (kąąt otwarcia komory wynosi +/- 30°) i specjalnych procedur obróbki danych (dodatkowe silne refleksy, cień od krawędzi komory).



Rys. 8. Schemat budowy diamentowej komory wysokociśnieniowej.

Szczególnie cennymi wskazówkami we wspomnianych pracach były doświadczenia naukowców z grupy prof. dr hab. Andrzeja Katrusiaka z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, którzy w ramach współpracy brali udział w początkowych eksperymentach. Wymienione modyfikacje pomiarów standardowych pozwalające na wykonanie pomiarów w warunkach wysokiego ciśnienia zostały przez mnie wprowadzone w trakcie wykonywania licznych wstępnych eksperymentów, które zakończone powodzeniem pozwoliły na zastosowanie metody HPPX w kolejnych pracach badawczych.

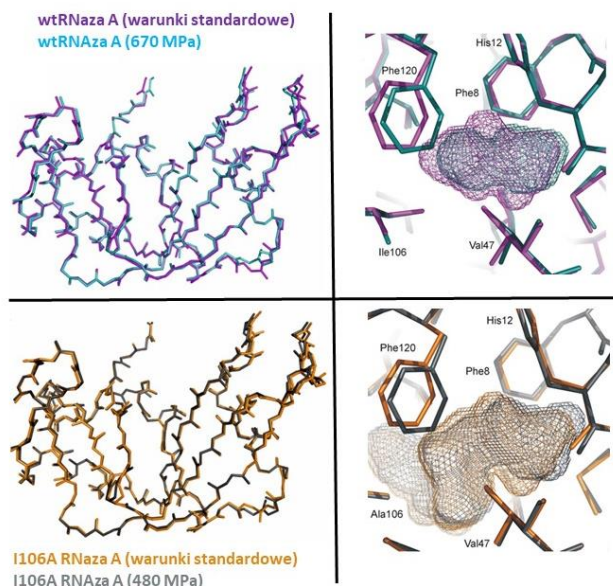
Jak już wspomniano, pierwszymi kryształami białka poddanymi działaniu wysokiego ciśnienia, dla których przeprowadziłam pomiary dyfrakcji rentgenowskiej była rybonukleaza A [H6]. Poszukując związku konformacji ze stabilnością białka do badań wybrałam formę natywną enzymu (najstabilniejszą) i jego wariant charakteryzujący się



Rys. 9. Cząsteczka RNazy A z zaznaczonym miejscem mutacji w formie I106A.

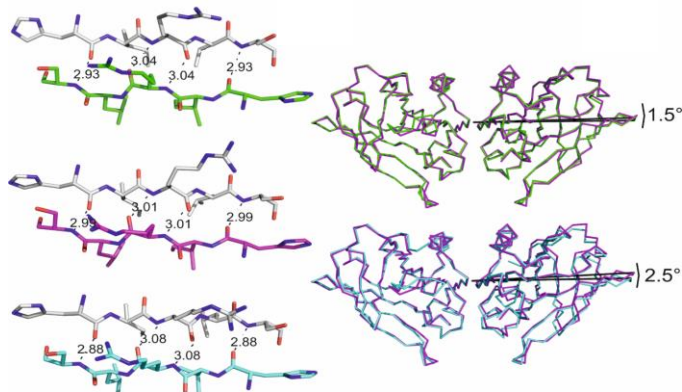
najniższą stabilnością ciśnieniową (I106A). Kryształy RNazy A oraz jej formy I106A otrzymałam w warunkach ciśnienia atmosferycznego (0.1 MPa), umieściłam w komorze i poddałam działaniu wysokiego ciśnienia. Po kompresji kryształy RNazy A zachowały swoją symetrię opisaną przez grupę przestrzenną P₃21. Wyznaczono strukturę RNazy A pod ciśnieniem 670 MPa (PDB ID 3I7W) oraz formy I106A pod ciśnieniem 480 MPa (PDB ID 3I7Y), obydwie z rozdzielczością 2.35 Å. Dane strukturalne pozwoliły na wyznaczenie ścisłości kryształów RNazy A, otrzymano wartość $\kappa=0.039 \text{ GPa}^{-1}$ dla formy natywnej oraz $\kappa=0.036 \text{ GPa}^{-1}$ dla formy I106A. Uzyskane struktury pozwoliły szczegółową na analizę parametrów strukturalnych takich jak liczba wiązań wodorowych, objętość zajmowana przez różne rodzaje struktury drugorzędowej, powierzchnia cząsteczki, powierzchnia dostępna/niedostępna dla rozpuszczalnika czy upakowanie wyrażone jako liczba kontaktów L (<4 Å) podzielona przez objętość V.

W strukturze natywnej formy RNazy A podwyższone ciśnienie wpłynęło na zmniejszenie objętości o 1.1%, powierzchni, powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika, powierzchni niedostępnej dla rozpuszczalnika cząsteczki o odpowiednio 5.1%, 6.7% oraz 5.1%. Globalne zmiany w konformacji białka okazały się być szczególnie ważne w odniesieniu do kieszeni hydrofobowej RNazy A. Na skutek działania wysokiego ciśnienia doszło do zmian w jej kształcie i objętości (Rys. 10). W natywnej strukturze RNazy A z objętości 30.8 Å³ zmniejszyła się do 20.1 Å³, natomiast w strukturze I106A z 81.8 Å³ do 70.6 Å³. Przeprowadzone badania potwierdziły potencjał krystalografii wysokociśnieniowej białek jako metody umożliwiającej analizę konformacji w cząsteczce białka. Ruchy łańcuchów bocznych i rearanżacje całej cząsteczki związane są z elastycznością biomakromolekuł, często niezbędnej do ich prawidłowego funkcjonowania. Dodatkowo badania ściśliwości białek i makrocząsteczek pozwalają na zrozumienie mechanicznych aspektów ich aktywności biologicznej i wnoszą interesujący wkład w tworzenie rozwiązań z zakresu przełączników molekularnych.

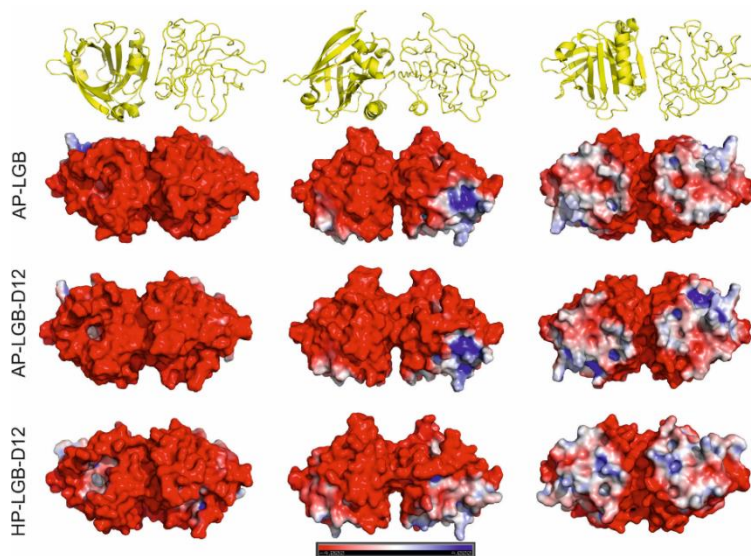


Rys. 10. Zmiany w konformacji RNazy A pod wpływem wysokiego ciśnienia w przebiegu głównego łańcucha aminokwasowego i obrębie wnęki hydrofobowej.

Uzyskanie wartościowych wyników eksperymentów wysokociśnieniowych dla RNazy A [H6] zaowocowało kontynuacją tego kierunku badań. Biorąc pod uwagę szereg specyficznych uwarunkowań krystalografii w warunkach wysokiego ciśnienia oraz wykorzystując informacje uzyskane w ramach prac H3 i H4 do kolejnych eksperymentów wybrano wołową β-laktoglobulinę, białko o odmiennej od RNazy A budowie przestrzennej i funkcji biologicznej. Ciśnieniu rzędu 430 MPa poddałam kryształy β-laktoglobuliny z przyłączonym dodekanem [H7]. Zarówno strukturę referencyjną (kryształ BLG-D12 umieszczony w komorze, ale bez podwyższonego ciśnienia, PDB ID 5I06) jak i wysokociśnieniową strukturę BLG-D12 (PDB ID 5I07) wyznaczyłam z rozdzielczością 2.65 Å. Kompresja nie wpłynęła na zmianę symetrii kryształów białka, których symetrię opisuje grupa przestrzenna P3₂21. W otrzymanej wysokociśnieniowej strukturze doszło do szeregu zmian w porównaniu ze strukturą referencyjną wyznaczoną w warunkach ciśnienia atmosferycznego.



Rys. 11. Zmiany w obrębie powierzchni oddziaływania tworzącej dimery i ich wzajemnym ułożeniu wywołane wysokim ciśnieniem (zielony- BLG forma apo, różowy- referencyjna BLG-D12, niebieski- wysokociśnieniowa BLG-D12).

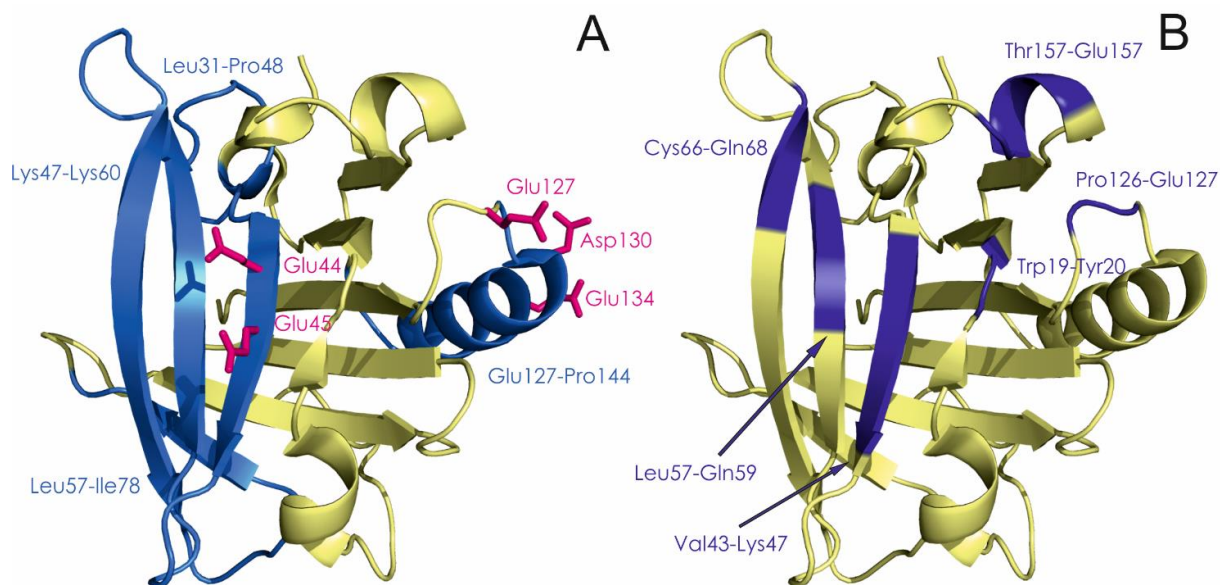


Rys. 12. Zmiany w powierzchni potencjału elektrostatycznego w cząsteczkach: BLG-apo, BLG-D12 w ciśnieniu atmosferycznym i BLG-D12 wyznaczonej w wysokim ciśnieniu.

Wyznaczony promień hydrodynamiczny dla białka poddanego kompresji zmienił się z 6.6 ± 0.8 nm na 6.8 ± 0.7 nm, punkt izoelektryczny z 4.9 na 5.2 i masa zaadsorbowanego białka natywnego wyniosła 69 ng cm^{-2} i 97 ng cm^{-2} . Obserwowane zmiany w podanych parametrach przeanalizowałam w kontekście zmodyfikowanej ciśnieniem struktury, a zwłaszcza zmian rozkładu potencjału elektrostatycznego na powierzchni cząsteczki (Rys. 11). Wyniki analizy strukturalnej pozwoliły na skorelowanie wysokociśnieniowej konfirmacji BLG-D12 z procesem adsorpcji tego białka na sensorze wykonanym ze złota i zaproponowanie dwóch modeli przebiegu tego procesu dla białka natywnego i poddanego działaniu wysokiego ciśnienia. Opublikowane w ramach pracy **H7** uzyskane rezultaty po raz pierwszy umożliwiły identyfikację i szczegółową dyskusję zachodzących na poziomie molekularnym zmian w cząsteczce białka wywołanych ciśnieniem w odniesieniu do oddziaływań z powierzchnią sensora i procesu adsorpcji.

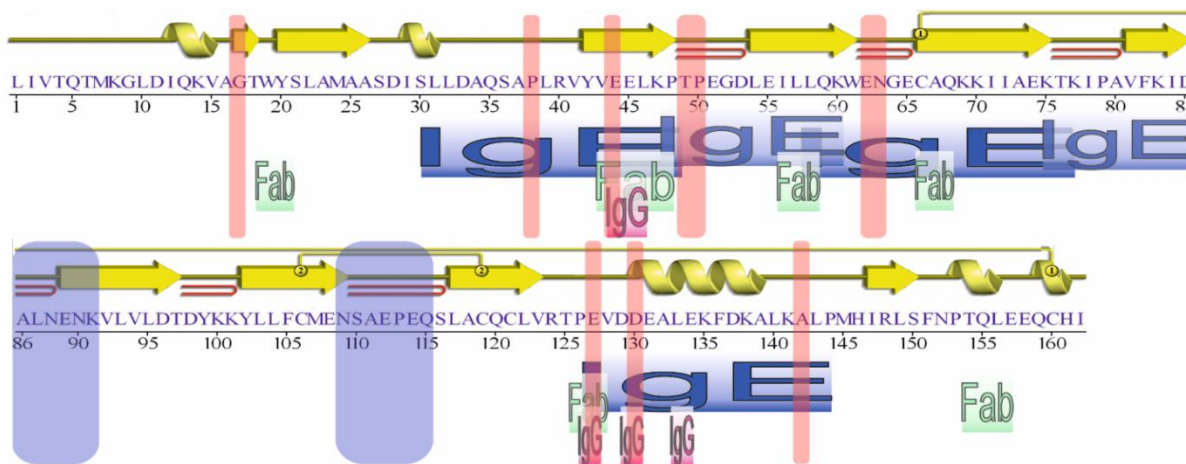
W kolejnej pracy prezentującej wyniki eksperymentów HPPX skoncentrowałam się na badaniach β -laktoglobuliny w połączeniu z ligandem występującym fizjologicznie, z kwasem mirystynowym [**H8**]. BLG jako białko mleka krowiego należy do grupy alergenów pokarmowych [28]. Motywacją do podjęcia opisanych poniżej eksperymentów była próba wyjaśnienia związku wysokociśnieniowej konformacji BLG z obserwowanym spadkiem alergenności po podaniu jej działaniu wysokiego ciśnienia [29]. Dane dobrej jakości udało się otrzymać dla kryształu BLG (w kompleksie z kwasem mirystynowym) poddanego działaniu ciśnienia rzędu 550 MPa. Rozdzielczość struktury zdeponowanej w PDB z identyfikatorem 5LKF wynosi 2.5 \AA . Wykonano również pomiar dla struktury referencyjnej (PDB ID 5LKE). Podobnie jak w poprzednich eksperymentach, pod wpływem ciśnienia nie doszło do zmiany symetrii badanych kryształów ($P3_221$). Konformację β -laktoglobuliny w kompleksie z kwasem mirystynowym (BLG-MYR) przeanalizowałam pod kątem zmian w obszarach zidentyfikowanych jako epitopy β -laktoglobuliny funkcjonalne (Rys. 13A) i konformacyjne (Rys. 13B) [30].

Do najważniejszych należały: zmiany w obrębie kontaktów warunkujących utworzenie przez cząsteczki BLG dimeru (Rys. 11), konformacji cząsteczki liganda wewnątrz miejsca wiążącego oraz zmiany wielkości wnęki wiążącej. 633 \AA^3 w ciśnieniu atmosferycznym do 793 \AA^3 w strukturze wysokociśnieniowej. Dla białka poddanego działaniu ciśnienia zostały również wykonane pomiary dynamicznego rozpraszania światła, mobilności elektroforetycznej oraz adsorpcji przy pomocy mikrowagi kwarcowej.



Rys. 13. Epitopy BLG: (A) funkcjonalne epitopy zidentyfikowane w oparciu o analizę interakcji z przeciwciałami IgE (niebieski) i IgG (różowy); (B) epitopy strukturalne tworzące kontakty z atomami przeciwciała Fab-IgE (fioletowy).

Wysokie ciśnienie wpłynęło na pozycję części karboksylowej kwasu mirystynowego oraz na wielkość i kształt kieszeni wiążącej. W celu identyfikacji fragmentów cząsteczki β -laktoglobuliny wrażliwych na działanie wysokiego ciśnienia obliczyłam macierze różnic odległości dla atomów węgla budujących łańcuch główny. W cząsteczce BLG poddanej działaniu wysokiego ciśnienia przesunięciu uległy pojedyncze aminokwasy Leu1, Gly17, Pro38, Glu44, Glu127 i Asp130, a także większe fragmenty Thr49-Pro50, Glu62-Asn63, Asp85-Lys91, Asn109-Gln114 i Leu140-Ala142.

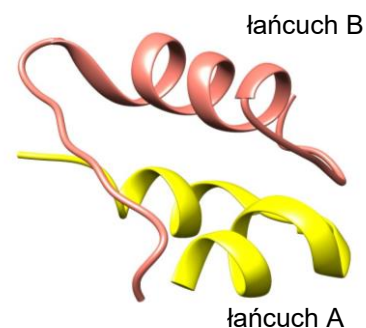


Rys. 14. Obszary największych zmian konformacyjnych (czerwone i niebieskie) wraz z zaznaczeniem epitopów BLG.

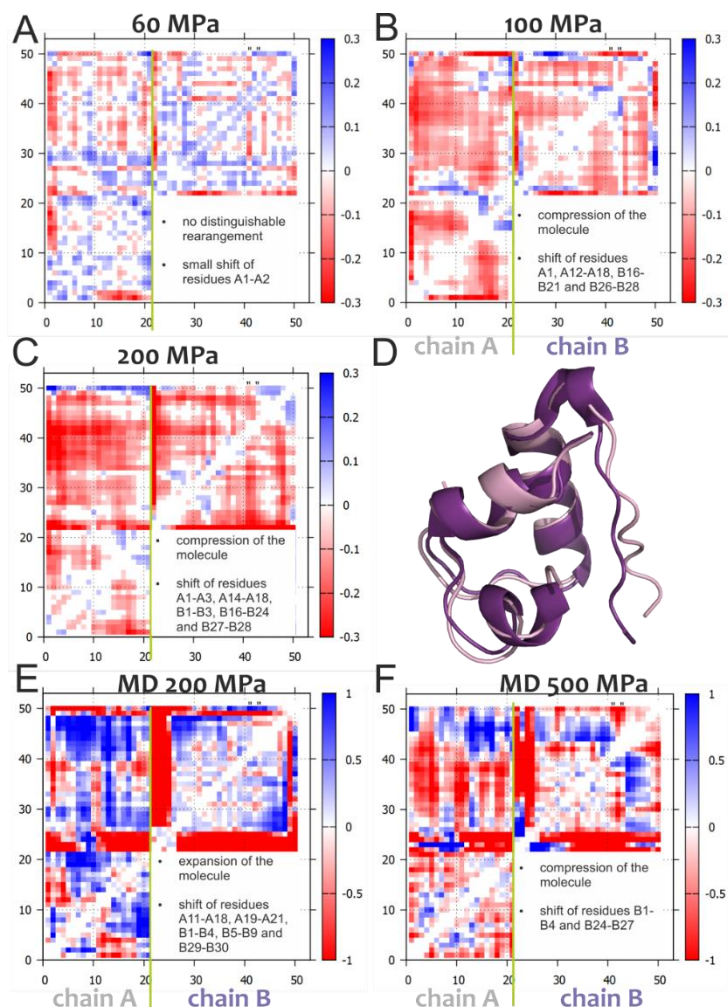
W wyniku porównania obszarów cząsteczki, które uległy przesunięciu w strukturze wysokociśnieniowej z pozycją epitopów po raz pierwszy udało się strukturalnie potwierdzić wpływ wysokiego ciśnienia na fragmenty odpowiedzialne za aktywność alergenną β -laktoglobuliny (Rys. 14). Uzyskane wyniki stanowią godny uwagi wkład w badania białek

będących składnikiem żywności. Alergenne białka poddane działaniu wysokiego ciśnienia mogą bowiem tracić zdolność do wywoływania reakcji ze strony układu immunologicznego bez istotnej zmiany struktury.

W ramach ostatniej publikacji należącej do prezentowanego cyklu podjęłam próbę wykorzystania krystalografii w warunkach wysokiego ciśnienia do zbadania konformacji wołowej insuliny [H9]. Białko to stanowi szczególnie ciekawy obiekt badań ze względu na udowodnioną predyspozycję do przyjmowania nieprawidłowych konformacji i tworzenia agregatów pod wpływem podwyższonego ciśnienia [31,32]. Jak już wspomniano zjawiska agregacji i fibrylacji białek mają ogromne znaczenie w procesach prowadzących do schorzeń spichrzeniowych i zaburzeń neurodegeneracyjnych. W publikacji poświęconej badaniom wpływu wysokiego ciśnienia na zmiany konformacji insuliny (Rys. 15) obok eksperymentów krystalograficznych wykorzystano również metody komputerowe uzyskując pełniejszy obraz odpowiedzi cząsteczki insuliny na podwyższone ciśnienie. W części strukturalnej wyznaczyłam struktury



Rys. 15. Struktura insuliny: łańcuch A (21 aminokwasów) oraz łańcuch B (30 aminokwasów).



insuliny dla kryształów umieszczonych w komorze w ciśnieniu atmosferycznym (PDB ID 6QQ7, rozdzielczość 1.65 Å) oraz poddanych działaniu 60 MPa (PDB ID 6QQG, rozdzielczość 2.15 Å), ciśnieniu równemu 100 MPa (PDB ID 6QRH, rozdzielczość 2.15 Å) oraz 200 MPa (PDB ID 6QRH, rozdzielczość 2.10 Å). Kryształy przed i po poddaniu ich działaniu wysokiego ciśnienia wykazywały tę samą symetrię (grupa przestrzenna I213). Porównanie różnic w położeniu Ca pozwoliło na identyfikację obszarów białka, które uległy przesunięciu względem pozycji obserwowanej w strukturze referencyjnej (Rys. 16).

Rys. 16. Macierze różnic odległości obliczone względem struktury referencyjnej dla: (A) 60 MPa; (B) 100 MPa oraz (C) 200 MPa; (D) nałożenie struktur referencyjnej i wyznaczonej w 200 MPa (fioletowa, różowa). Macierze różnic odległości obliczone względem struktury referencyjnej dla modeli uzyskanych w ciśnieniu (E) 200 MPa i (F) 500 MPa.

Wyraźne zmiany w wysokociśnieniowych strukturach insuliny skorelowane z ‘kurczeniem się’ cząsteczki zaobserwowałam dla łańcucha B i dotyczyły one aminokwasów B1-B4, B7-B9, B12-B18 oraz B25-B29 (Rys. 16A i 16B). Ciśnienie spowodowało subtelniejsze zmiany w obrębie łańcucha A, które głównie dotyczyły aminokwasów A11-A15. Obok części eksperymentalnej prezentowana praca zawiera również wyniki modelowania molekularnego insuliny w warunkach podwyższonego ciśnienia (200 MPa i 500 MPa). W modelu obliczonym dla układu pod ciśnieniem 200 MPa zaobserwowano zarówno fragmenty, które się od siebie przysunęły (pozycje A5-A12 względem A15-A20 oraz B6-B10 względem B25-B30) jak i wyraźne odsunięcie się N-końcowego fragmentu łańcucha B (B1-B4). Przy zastosowaniu ciśnienia rzędu 500 MPa cała cząsteczka uległa kompresji, łańcuchy A i B przysunęły się do siebie. *Rola N-końcowego fragmentu w procesie agregacji insuliny była postulowana w literaturze [33], a dzięki przeprowadzonym przez mnie badaniom hipoteza ta została potwierdzona strukturalnie. Połączenie obserwacji otrzymanych w wyniku badań eksperymentalnych i teoretycznych umożliwiło na uzyskanie pełniejszego obrazu zmian w konformacji insuliny wywołanych wysokim ciśnieniem.*

Podsumowanie:

Prowadzone przeze mnie badania strukturalne i ich wyniki opisane w cyklu publikacyjnym **H1-H9** pozwoliły na strukturalną charakterystykę zmian w konformacji wybranych białek wywołanych czynnikiem wewnętrznym (mutacją) i/lub czynnikiem zewnętrznym (ciśnieniem).

Najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań:

1. Scharakteryzowano strukturalnie szereg zmutowanych form wołowej rybonukleazy A (RNazy A) w tym V47A, V54A, V57A, I81A, I106A i V108A oraz zmutowanej formy onkonazy (*Rana pipiens*) z usuniętym mostkiem dwusiarczkowego w pozycji C30A/C75A. Wykonane eksperymenty pozwoliły na zidentyfikowanie fragmentów cząsteczek białka zaburzanych na skutek wprowadzonych zmian w sekwencji aminokwasowej. Wykazano również kluczowe znaczenie wielkości kieszeni hydrofobowej w zachowaniu stabilności cząsteczki RNazy A [**H1**]. Natomiast uzyskane z rozdzielczością atomową dane krystalograficzne dla zmutowanej onkonazy wykazały, że brak ważnego kowalencyjnego wiązania usztywniającego strukturę cząsteczki onkonazy nie wpłynął znacząco na zaburzenie konformacji badanego białka [**H5**].
2. Opracowano protokoły i wykonano szereg eksperymentów dla kryształów modelowych białek mających na celu opracowanie metodyki prowadzenia pomiarów dyfrakcji rentgenowskiej z wykorzystaniem dyfraktometru monokrystalicznego dla kryształów makrocząsteczek umieszczonych w diamentowej komorze wysokociśnieniowej. Wyniki tych prac wraz z zestawieniem doniesień literaturowych dotyczących krystalografii białek w wysokim ciśnieniu opisano w publikacji przeglądowej [**H2**]. Dla zmutowanej formy RNazy A (I106A) charakteryzującej się znacznie obniżoną stabilnością w porównaniu do formy natywnej enzymu wykonano badania strukturalne w warunkach wysokiego ciśnienia, które pozwoliły na określenie fragmentów cząsteczki szczególnie wrażliwych na działanie ciśnienia [**H6**].
3. W oparciu o wyniki wstępnych eksperymentów zidentyfikowano układy β -laktoglobulina/ligand zapewniające optymalne warunki wykonania pomiarów

wysokociśnieniowych [H3-H4]. Wykazano, że wysokie ciśnienie znacząco wpływa na przebieg procesu adsorpcji BLG w kompleksie z dodekanem. Po raz pierwszy wyjaśniono zaobserwowane zmiany w adsorpcji (dla białka natywnego i poddanego działaniu ciśnienia) poprzez analizę modyfikacji ciśnieniowej cząsteczki białka na poziomie molekularnym [H7]. W wyniku unikalnych badań wysokociśnieniowych zidentyfikowano wpływ wysokiego ciśnienia na konformację epitopów obecnych w cząsteczce BLG. Wykazano ścisły związek zmian alergenicności β -laktoglobuliny poddawanej działaniu wysokiego ciśnienia z modyfikacją cząsteczki białka zaobserwowaną w strukturze krystalicznej wyznaczonej w warunkach podwyższonego ciśnienia [H8].

4. Przeprowadzono analizę konformacji wołowej insuliny obserwowaną w warunkach wysokiego ciśnienia w aspekcie badania nieprawidłowych konformacji białka prowadzących do niekorzystnych procesów agregacji. W badaniach strukturalnych i symulacjach komputerowych ujawniono rejony cząsteczki insuliny predysponowane do inicjowania agregacji [H9].

Bibliografia:

- [1] Gromiha MM. Protein Stability. Protein Bioinforma., Elsevier; 2010, p. 209–45. <https://doi.org/10.1016/b978-8-1312-2297-3.50006-0>.
- [2] Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 1999;293:321–31. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3110>.
- [3] Nölting B, Salimi N, Guth U. Protein folding forces. *J Theor Biol* 2008;251:331–47. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.11.020>.
- [4] Valastyan JS, Lindquist S. Mechanisms of protein-folding diseases at a glance. *DMM Dis Model Mech* 2014;7:9–14. <https://doi.org/10.1242/dmm.013474>.
- [5] Parenti G, Andria G, Ballabio A. Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy. *Annu Rev Med* 2015;66:471–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-122313-085916>.
- [6] Gandhi J, Antonelli AC, Afridi A, Vatsia S, Joshi G, Romanov V, et al. Protein misfolding and aggregation in neurodegenerative diseases: A review of pathogenesis, novel detection strategies, and potential therapeutics. *Rev Neurosci* 2019;30:339–58. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0035>.
- [7] Roberts CJ. Therapeutic protein aggregation: Mechanisms, design, and control. *Trends Biotechnol* 2014;32:372–80. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.05.005>.
- [8] Wientjes F. Recombinant proteins. *Br J Hosp Med* 1997;57:229. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385015-7.00010-7>.
- [9] Cobb RE, Chao R, Zhao H. Directed evolution: Past, present, and future. *AIChe J* 2013;59:1432–40. <https://doi.org/10.1002/aic.13995>.
- [10] Pradillon F, Gaill F. Pressure and life: some biological strategies. *Life Extrem. Environ.*, Springer Netherlands; 2007, p. 341–55. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6285-8_21.
- [11] Heremans K, Smeller L. Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochim Biophys Acta* 1998;1386:353–70.
- [12] Kharakoz DP. Protein Compressibility, Dynamics, and Pressure. *Biophys J* 2000;79:511–25. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76313-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76313-2).
- [13] Silva JL, Oliveira AC, Vieira TCRG, De Oliveira GAP, Suarez MC, Foguel D. High-Pressure Chemical Biology and Biotechnology 2014. <https://doi.org/10.1021/cr400204z>.
- [14] Marchal S, Torrent J, Masson P, Kornblatt JM, Tortora P, Fusi P, et al. The powerful high pressure tool for protein conformational studies. *Brazilian J Med Biol Res* 2005;38:1175–83. <https://doi.org/S0100-879X2005000800004>.
- [15] Ramanathan A, Savol AJ, Langmead CJ, Agarwal PK, Chennubhotla CS. Discovering conformational sub-states relevant to protein function. *PLoS One* 2011;6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015827>.
- [16] Fraser JS, Van Den Bedem H, Samelson AJ, Lang PT, Holton JM, Echols N, et al. Accessing protein conformational ensembles using room-temperature X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:16247–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111325108>.
- [17] Collins MD, Kim CU, Gruner SM. High-pressure protein crystallography and NMR to explore protein conformations. *Annu Rev Biophys* 2011;40:81–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155304>.
- [18] Bassett WA. Diamond anvil cell, 50th birthday. *High Press Res* 2009;29:163–86. <https://doi.org/10.1080/08957950802597239>.
- [19] Nicholson J, Körber F. High pressure applications in structural molecular biology. *Cell* 2006;66:1–15.
- [20] Paci E. High pressure simulations of biomolecules. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* 2002. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00343-0).
- [21] Kanwar SS, Mishra P, Meena KR, Gupta S, Kumar R. Ribonucleases and their Applications. *J Adv Biotechnol Bioeng* 2016;4:17–26.
- [22] Torrent J, Connelly JP, Coll MG, Ribó M, Lange R, Vilanova M. Pressure versus Heat-Induced Unfolding of Ribonuclease A: The Case of Hydrophobic Interactions within a Chain-Folding Initiation Site †. *Biochemistry* 1999;38:15952–61. <https://doi.org/10.1021/bi991460b>.
- [23] Sun M, Tang H, Gao Y, Dai X, Yuan Y, Zhang C, et al. Constitutive expression and anticancer potency of a novel immunotoxin onconase-DV3. *Oncol Rep* 2016;35:1987–94. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4570>.
- [24] Notomista E, Catanzano F, Graziano G, Piaz FD, Barone G, D'Alessio G, et al. Onconase: An Unusually Stable Protein †. *Biochemistry* 2000;39:8711–8. <https://doi.org/10.1021/bi000415x>.
- [25] Sawyer L. β -Lactoglobulin. vol. 1. Springer Science+Business Media New York; 2013. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6>.

- [26] Frapin D, Dufour E, Haertle T. Probing the fatty acid binding site of β -lactoglobulins. *J Protein Chem* 1993;12:443–9. <https://doi.org/10.1007/BF01025044>.
- [27] Piermarini GJ, Block S, Barnett JD, Forman RA. Calibration of the pressure dependence of the R1 ruby fluorescence line to 195 kbar. *J Appl Phys* 1975;46:2774–80. <https://doi.org/10.1063/1.321957>.
- [28] Villa C, Costa J, Beatriz M, Oliveira PP, Mafra I. Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review n.d. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12318>.
- [29] Kleber N, Maier S, Hinrichs J. Antigenic response of bovine β -lactoglobulin influenced by ultra-high pressure treatment and temperature. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2007;8:39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.05.001>.
- [30] Järvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. IgE and IgG binding epitopes on α -lactalbumin and β -lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;126:111–8. <https://doi.org/10.1159/000049501>.
- [31] Jansen R, Dzwolak W, Winter R. Amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates probed by high resolution atomic force microscopy. *Biophys J* 2005;88:1344–53. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048843>.
- [32] Dirix C, Meersman F, Smeller L, Heremans K. Unfolding and fibrillogenesis of insulin: Temperature, pressure and chemistry. *High Press Res* 2002;22:733–6. <https://doi.org/10.1080/08957950212452>.
- [33] Jiménez JL, Nettleton EJ, Bouchard M, Robinson C V, Dobson CM, Saibil HR. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:9196–201. <https://doi.org/10.1073/pnas.142459399>.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Od lutego 2017 pracuję na stanowisku adiunkta (1/2 etatu) w Zespole Biokatalizy Teoretycznej i Eksperymentalnej Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk. Zespół badawczy kierowany jest przez Prof. dr hab. Tomasza Borowskiego i realizuje obecnie grant SONATA-BIS pod tytułem “*Oksygenazy zależne od 2-oksoglutaranu w biosyntezie alkaloidów o aktywności farmakologicznej - struktury, mechanizmy reakcji i racjonalne przeprojektowywanie enzymów*” finansowany przez Narodowe Centrum Nauki. Wspomniany projekt obejmuje między innymi badania strukturalne enzymów należących do rodziny oksygenaz zależnych od 2-oksoglutaranu. Zgodnie z moim kwalifikacjami dołączyłam do zespołu jako osoba odpowiedzialna za tę część projektu. W ramach swoich obowiązków przeprowadzam eksperymenty krystalizacyjne, pomiary dyfrakcji dla monokryształów białek (zarówno z wykorzystaniem dyfraktometru jak i źródeł synchrotronowych) oraz dalszych etapów prowadzących do wyznaczenia struktur badanych enzymów z odpowiednimi substratami/produktami katalizowanych reakcji. Biorę również udział w charakteryzowaniu badanych układów z zastosowaniem różnorodnych metod fizykochemicznych mających na celu wyznaczenie parametrów opisujących badane procesy biokatalizacyjne, w tym z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej, termoforezy mikroskalowej, różnicowej kalorymetrii skaningowej oraz dynamicznego rozpraszania światła. Część eksperymentów wykonuję w BIOCEV, Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University, Vestec (Czechy) w ramach nawiązanej przez mnie współpracy z naukowcami z tego nowoczesnego ośrodka badawczego. W wyniku zainicjowanej przez mnie współpracy z Małopolskim Centrum Biotechnologii etap krystalizacji- kluczowy w przypadku poszukiwania warunków krystalizacji dla nowo badanych białek- realizowany jest także z zastosowaniem robotów krystalizacyjnych. W rezultacie prowadzonych w zespole badań jestem współautorem publikacji **P28** prezentującej strukturę 6-O-demetylazy tebainy (z *Papaver somniferum*) oraz kilku prezentacji konferencyjnych. Kolejna publikacja zawierająca wyniki najnowszych osiągnięć dotyczących 6- β -hydroksylazę hioscyjminy (z *Datura mentel*) została przygotowana i wysłana do czasopisma *Journal of Molecular Biology* (w trakcie recenzji). Prace badawcze realizowane w ramach projektu grantowego stanowią również treść przygotowywanej rozprawy doktorskiej Pani Ewy Kot, dla której pełnię rolę promotora pomocniczego.

Jako pracownik IKiFP wykazuję się również aktywnością organizacyjną prowadziłam szkolenia z wykorzystania narzędzi ułatwiających zarządzanie literaturą naukową (Mandelely), biorę udział w festiwalach nauki i dniach otwartych instytutu.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Prowadziłam/prowadzę następujące zajęcia realizowane na Wydziale Chemii UJ:

WYKŁADY

1. Farmakoproteomika – **zajęcia autorskie, zaprojektowane i koordynowane przez habilitantkę**, prowadzone w roku akademickim 2018/2019 (*WCh UJ, kierunek Chemia Medyczna, studia II stopnia*); **prowadzenie 7.5 h/rok**
2. Biomedyczne zastosowania enzymów – **zajęcia autorskie, zaprojektowane i koordynowane przez habilitantkę**, prowadzone w roku akademickim 2018/2019 (*WCh UJ, kierunek Chemia Medyczna, studia II stopnia*); **prowadzenie 15 h/rok**

KONWERSATORIA/SEMINARIA

1. Podstawy chemii biologicznej (nazwa kursu w 2009/2010 Podstawy chemii bionieorganicznej i strukturalnej) - **zajęcia autorskie, w części zaprojektowane i koordynowane przez habilitantkę**, prowadzone od roku akademickiego 2009/2010 (*WCh UJ, kierunek Chemia, studia I stopnia*)
2. Farmakoproteomika - **zajęcia autorskie, w części zaprojektowane przez habilitantkę**, prowadzone w latach od roku akademickiego 2018/2019 (*WCh UJ, kierunek Chemia, studia II stopnia*)
3. Krystalografia - prowadzone od roku akademickiego 2008/2009 (*WCh UJ, kierunek Chemia, studia I stopnia*)
4. Krystalochemia białek - prowadzone od roku akademickiego 2008/2009 (*WCh UJ, kierunek Chemia, studia I stopnia*)
5. Seminarium specjalizacyjne z chemii biologicznej- prowadzone od roku akademickiego 2009/2010 (*WCh UJ, kierunek Chemia, studia II stopnia*)

LABORATORIA/PACOWNIE

1. Warsztaty - struktura i funkcja biomateriałów – **zajęcia w części zaprojektowane przez habilitantkę**, prowadzone od roku akademickiego 2008/2009 (*WCh UJ, kierunek Zaawansowane Materiały i Nanotechnologia, studia II stopnia*)
2. Chemia biologiczna – **zajęcia autorskie, w części zaprojektowane i koordynowane przez habilitantkę**, prowadzone w latach od 2010/2011 (*WCh UJ, kierunek Chemia, studia I stopnia*)
3. Chemia analityczna - prowadzone od roku akademickiego 2011/2012 do 2017/2018 (*WCh UJ, kierunek Chemia, studia II stopnia*)

4. Chemia analityczna z elementami bioanalizy – prowadzone od roku akademickiego 2016/2017 (*WCh UJ, kierunek Chemia, studia II stopnia*)
5. Forensic chemistry- prowadzone od roku akademickiego 2015/2016 do 2018/2019 (*WCh UJ, kierunek Advanced spectroscopy, studia II stopnia*)
6. Chemia ogólna i nieorganiczna dla I roku biochemii – **w części zaprojektowane przez habilitantkę**, prowadzone od roku akademickiego 2012/2013 (*WCh UJ, kierunek Biochemia, studia II stopnia*)
7. Pracownia specjalizacyjna panelu Chemia biologiczna- prowadzone od roku akademickiego 2010/2011 (*WCh UJ, kierunek Chemia Medyczna, studia II stopnia*)
8. Podstawy chemii medycznej – **zajęcia autorskie, w części zaprojektowane i koordynowane przez habilitantkę**, prowadzone od roku akademickiego 2017/2018 (*WCh UJ, kierunek Chemia Medyczna, studia I stopnia*)
9. Rentgenografia strukturalna makrocząsteczek – **zajęcia autorskie, w części zaprojektowane przez habilitantkę**, prowadzone od roku akademickiego 2017/2018 (*WCh UJ, kierunek Chemia Medyczna, studia I stopnia*)

Podczas swojej pracy naukowej byłam/jestem opiekunem lub promotorem/promotorem pomocniczym szeregu prac dyplomowych:

Aktualnie realizowane PRACE DOKTORSKIE (w charakterze promotora pomocniczego)

1. Ewa Kot, „Dioksygenazy zależne od α -ketoglutaranu zaangażowane w szlak biosyntezy alkaloidów benzyloizochinolinowych - badania podstawowe”, IKiFP PAN, promotor: prof. dr hab. Tomasz Borowski 2014- obecnie.

Aktualnie realizowane PRACE DOKTORSKIE (w charakterze członka Thesis Advisory Committee)

1. Zuzanna Pakosz, „Characterization of the unusual Apicoplast gyrase”, MCB UJ, promotor: prof. Jonathan Heddle 2018- obecnie.

PRACE MAGISTERSKIE w charakterze promotora

1. Aleksandra Krzeczowska, „Badania krystalograficzne białek w warunkach wysokiego ciśnienia”, 2019.
2. Martyna Jucha, „Ciśnieniowa stabilność taumatyny w badaniach strukturalnych”, 2018.
3. Anna Michońska, „Badania krystalograficzne białek w warunkach wysokiego ciśnienia” 2017.
4. Patrycja Hałajko, „Badania strukturalne oddziaływania białek z metalami i kompleksami metali”, 2016.
5. Arkadiusz Szura, „Analiza strukturalna potencjalnych miejsc wiązania kompleksów rutenu w wybranych białkach”, 2016.
6. Agata Bolanowska, „Wpływ wysokiego ciśnienia na konformację cząsteczki rybonukleazy A”, 2015.

7. Beata Mrugała, „*Oddziaływanie kompleksów rutenu z cząsteczkami biologicznymi*”, 2015.
8. Krystian Niemiec, „*Badanie aktywności przeciwnowotworowej tiosemi-karbazonowych pochodnych kompleksów rutenu*”, 2014.
9. Katarzyna Nazimek, „*Badanie oddziaływania acetylocholinesterazy z organizmu Electrophorus electricus z wybranymi inhibitorami*”, 2013.

PRACE LICENCJACKIE w charakterze promotora

1. Aleksandra Krzeczowska, „*Optimization of crystallization conditions for bovine pancreatic trypsin*”, 2017.
2. Zuzanna Drozd, „*Krystalizacja onkonazy z kompleksem rutenu*”, 2015.
3. Patrycja Hałajko, „*Optymalizacja warunków krystalizacji wołowej laktoferyny*”, 2014.
4. Katarzyna Rudnik, „*Krystalizacja inhibitorów acetylocholinesterazy*”, 2014.
5. Weronika Bednarczyk, „*Najnowsze osiągnięcia w dziedzinie inhibicji acetylocholinesteraz w aspekcie leczenia choroby Alzheimerera*”, 2013.
6. Agata Bolanowska, „*Wysokociśnieniowe, strukturalne badania substancji farmakologicznych*”, 2013.

PRACE MAGISTERSKIE w charakterze opiekuna naukowego

1. Joanna Loch, „*Wpływ mutacji na stabilność struktury białek z rodziny rybonukleaz*”, promotor: prof. dr hab. K. Lewiński, 2007.
2. Magdalena Pietrasiak, „*Badanie strukturalne białek w warunkach wysokiego ciśnienia*”, promotor: prof. dr hab. K. Lewiński, 2008.
3. Artur Biela, „*Badania strukturalne nad ciśnieniową stabilnością β -laktoglobuliny*”, promotor: prof. dr hab. K. Lewiński, 2009.
4. Anna Zapał, „*Badania wysokociśnieniowej struktury insuliny*”, promotor: prof. dr hab. K. Lewiński, 2011.
5. Klaudia Garbacz, „*Wysokociśnieniowe badania struktury β -laktoglobuliny*”, promotor: prof. dr hab. K. Lewiński, 2012.

PRACE LICENCJACKIE w charakterze opiekuna naukowego

1. Wioleta Moskwa, „*Optymalizacja warunków krystalizacji onkonazy z Rana pipiens*” 2011.
2. Iwona Leśniak „*Badania wysokociśnieniowe białek w kryształach*” 2011.
3. Agnieszka Rojewska, „*Krystalizacja onkonazy z Rana pipiens z wybranymi składnikami błony komórkowej*” 2012.

OPIEKA NAD PROJEKTAMI STUDENTÓW SMP i PRAKTYKANTAMI

1. Paweł Pakulski - projekt badawczy: „*Dobranie odpowiednich warunków krystalizacji onkonazy metodą wiszącej kropli*” 2014.
2. Natalia Szmciarz - praktyki zawodowe 2014.

3. Kai Mrowiec - projekt badawczy: "Optymalizacja krystalizacji wariantów β -laktoglobuliny" 2017-2018.

PRACA W KOMISJACH KONKURSOWYCH

1. członek komitetu naukowego w ramach Horyzontów Nauki, V 2016
2. członek komisji konkursowej, Małopolski Konkurs Chemiczny, etap rejonowy, I 2011
3. członek komisji konkursowej, Małopolski Konkurs Chemiczny, etap rejonowy, I 2010

WSPÓŁPRACA PRZY REALIZACJI PRAC BADAWCZYCH

1. Marta Kubańska - praca magisterska 2018 (eksperymenty krystalizacyjne)
2. Klaudyna Śpiewak- praca doktorska 2012-2016 (eksperymenty krystalizacyjne transferyny, laktoferyny)
3. Ewa Wrona - praca magisterska 2015 (pomiarzy dyfraktometryczne zw. organicznych)
4. Gabriela Mazur- praca doktorska 2013 (pomiarzy dyfraktometryczne pochodnych kobalaminy)
5. Olga Mazuryk- praca doktorska 2011 (oczyszczanie białek)
6. Grzegorz Majka- praca doktorska 2011 (oczyszczanie białek)
7. Wojciech Schonemann- praca magisterska 2009 (krystalizacja zw. organicznych)
8. Mateusz Sikora- praca magisterska 2008 (badania wysokociśnieniowe)
9. Maria Oszejca (Myśliwy)- praca magisterska 2008 (badania wysokociśnieniowe)
10. Arkadiusz Sikora- praca magisterska 2008 (badania wysokociśnieniowe)

RECENZENT PRAC LICENCJACKICH i MAGISTERSKICH

1. Przemysław Gajda-Morszewski "Oddziaływanie polipirydylowych kompleksów rutenu z albuminą - opracowanie metodyki otrzymywania adduktów i ich charakterystyka fizykochemiczna", dr hab. M. Brindell, 2019.
2. Agnieszka Bodurka "Wpływ procesu zamykania laktoferyny nasyconej jonami metali w ceramiczno-polimerowych kapsułkach na dysocjację jonów metali z białka", dr hab. M. Brindell, 2019.
3. Kamil Kubicki, "Synteza i badania fizykochemiczne i fotochemiczne polipirydylowych kompleksów rutenu do zastosowań w terapii fotodynamicznej", dr hab. M. Brindell, 2018.
4. Iwona Fleszar "Synteza i analiza strukturalna kwaśnej soli (E)-cyjano(hydroksyimino)octanu etylu z 1,6-diaminoheksanem", dr W. Nitek, 2016
5. Magdalena Matysiewicz "Synteza i badania strukturalne kwaśniej soli (E)-cyjano(hydroksyimino)octanu etylu z trietyloaminą", dr W. Nitek, 2016
6. Agata Machnicka, "Synteza i badania polipirydylowych kompleksów rutenu(II) do zastosowań w terapii fotodynamicznej tkanek niedotlenionych", dr hab. M. Brindell, 2016.
7. Michał Jagodziński "Poszukiwanie inhibitorów specyficznych protez dla ubikwityny o potencjalnych właściwościach antynowotworowych", prof. dr hab. T. Holak, 2014.

Oprócz wypełniania obowiązków związanych ze stanowiskiem adiunkta oraz działalności naukowej byłam zaangażowana w dodatkowe prace związane z kształceniem studentów i młodej kadry.

Działalność dydaktyczna i popularyzatorska

1. 2010 – prezentacja Pracowni Dyfrakcji Rentgenowskiej na Wydziale Chemii UJ podczas Małopolskiej Nocy Naukowców z wykładem omawiającym zagadnienia dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego i aplikacji tego zjawiska w krytalografii
2. 2011 – opieka nad studentami Naukowego Koła Chemików w ramach pokazów Weekend Naukowców (WCh UJ)
3. 2017 – przygotowanie i udział w pokazach w ramach XVII Festiwalu Nauki (IKiFP PAN)
4. 2017 – wygłoszenie wykładu popularno-naukowego „Komunikacja kolorami i fizykochemiczna tajemnica kameleonów” w ramach Dnia Otwartego w IKiFP PAN

7. Inne aspekty działalności naukowej

Nagrody uzyskane za działalność naukową

- 07.2019 Nagroda IKiFP PAN za najlepszą publikację o charakterze popularno-naukowym w roku 2018 (E. Kot, **K. Kurpiewska**, M. Szaleniec „Czy można ujarzmić ewolucję czyli słów kilka o ukierunkowanej ewolucji” *Wszechświat Pismo Przyrodnicze*, 119 (2018) 221-227
- 05.2019 Nagroda indywidualna “Women in Science”, stypendium Instruct-ERIC, Structural Biology Conference 2019, Alcalá de Henare, Madrid, Hiszpania
- 12.2018 Nagroda IUCr Journal Prize w konkursie na najlepszy plakat konferencyjny **K. Kurpiewska**, “Lights and shadows of high pressure protein crystallography” Diamond-CCP4 Data Collection and Structure Solution Workshop, Diamond Light Source, Oxfordshire, UK
- 07.2016 Nagroda w konkursie na najlepszy plakat konferencyjny P. Hałajko, **K. Kurpiewska**, “Coordinated - in the main roles: lysozyme and ruthenium” 2016 Session of Students Research at Faculty of Chemistry Jagiellonian University, Kraków, Polska
- 07.2009 Druga nagroda w konkursie na najlepszy plakat konferencyjny J. Loch, **K. Kurpiewska**, K. Lewiński “Crystal structures of beta-lactoglobulin complexes with biologically important compounds” 20th International School on Physics and Chemistry of Condensed Matter, Structural Investigation of Functional Material, Białowieża, Polska

- 06.2009 Dwie pierwsze nagrody w konkursie na najlepszy plakat konferencyjny (Amara and FQS Poland Sp. z o.o. FUJITSU)
A. Biela, **K. Kurpiewska**, J. Loch, K. Lewiński "High pressure studies of beta-lactoglobulin", The First Session of Students Research at Faculty of Chemistry Jagiellonian University, Kraków, Polska
- 09.2007 Praca doktorska wyróżniona **K. Kurpiewska** "Wpływ mutacji na stabilność konformacyjną RNazy A", Wydział Chemii UJ, Kraków, Polska
- 05.2007 Pierwsza nagroda Polskiego Towarzystwa Chemicznego za prezentację
J. Loch, **K. Kurpiewska**, K. Lewiński "The influence of mutation on structural stability of ribonuclease family proteins", Second Session of Students Research at Faculty of Chemistry Jagiellonian University, Kraków, Polska
- 09.2006 Druga nagroda w konkursie na najlepszy plakat konferencyjny
K. Kurpiewska, K. Dziubek, A. Katrusiak, J. Font P., M. Ribó M. Vilanova, K. Lewiński "Crystallographic investigation of structural stability of RNase A at high pressure", 3rd Central European Conference Chemistry Towards Biology, Kraków, Polska
- 09.2003 stypendium naukowe Rektora UJ, Kraków, Poland
- 09.2001 stypendium naukowe Rektora UJ, Kraków, Poland

Naukowa współpraca międzynarodowa i krajowa

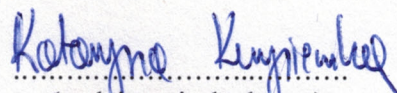
1. prof. A. Dömling, Drug Design Group, Uniwersytet w Groningen, Holandia
2. prof. M. Vilanova i dr M. Ribo, Laboratori d'Enginyeria de Proteines, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona, Hiszpania
3. dr T. Charnavets, dr J. Pavlíček, Centre of Molecular Structure, Institute of Biotechnology AS CR, BIOCEV, Czechy
4. dr H. Mikolajek, dr B. Williams, Diamond Light Source, Wielka Brytania
5. dr M.S. Weiss, Macromolecular Crystallography Group, Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie, Niemcy
6. prof. dr hab. A. Katrusiak, dr K. Dziubek, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
7. dr A. Jabłońska-Wawrzycka, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
8. dr hab. Maria Rapała-Kozik, dr O. Bocheńska, Zakład Biochemii Porównawczej i Bioanalizy, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ
9. prof. dr hab. Barbara Malawska, dr hab. Marek Bajda, Katedra Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny UJ
10. dr P. Grudnik, dr A. Biela, dr S. Świątek, dr M. Madej, Małopolskie Centrum Biotechnologii

11. prof. dr hab. T. Borowski, prof. dr hab. B. Jachimska i dr A. Miłaczewska, Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk
12. dr A. Kozakiewicz, Katedra Chemii Biomedycznej i Polimerów, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
13. dr S. Zelek-Pogudz, Katedra Mineralogii, Petrografii i Geochemii, Wydział Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska, Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie
14. dr inż. M. Olbrycht, Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej (CI), Politechnika Rzeszowska

Działalność organizacyjna ściśle związana z działalnością naukową

- Koordynowałam prace związane z projektowaniem części pomieszczeń Zakładu Krystalochemii i Krystalofizyki (ZKiK) w nowym budynku Wydziału Chemii na Kampusie UJ. Przygotowywałam i weryfikowałam dokumentację Zespołu Biokrystalografii, ZKiK do Specyfikacji Istotnych Warunków Zamówienia.
- Brałam udział w projekcie UE POKL.04.01.02-00-097/09 pt. „Zwiększenie liczby wysoko wykwalifikowanych absolwentów kierunków ścisłych Uniwersytetu Jagiellońskiego” (01.08.2009-30.09.2012).
- Byłam odpowiedzialna za zakup aparatury w ramach projektu pt. „Badanie układów w skali atomowej: nauki ścisłe dla innowacyjnej gospodarki (ATOMIN)” POIG.02.01.00-12-023/08 Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, działanie 2.1. „Rozwój ośrodków o wysokim potencjale badawczym” do pracowni Laboratorium Syntezy i Badań Związków Bioaktywnych i Biomateriałów.
- Zaprojektowałam i nadzorowałam utworzenie pracowni ekspresji i produkcji białek w ramach projektu pt. „Badanie układów w skali atomowej: nauki ścisłe dla innowacyjnej gospodarki (ATOMIN)” POIG.02.01.00-12-023/08 Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, działanie 2.1. „Rozwój ośrodków o wysokim potencjale badawczym” do pracowni Laboratorium Syntezy i Badań Związków Bioaktywnych i Biomateriałów.
- Pełniłam funkcję opiekuna Wydziałowej Pracowni Badań Dyfrakcyjnych oraz Laboratorium Syntezy i Badań Związków Bioaktywnych i Biomateriałów (kontakt z serwisem, obsługa zamówień części zamiennych, sporządzanie raportów z wykorzystania aparatury do projektu ATOMIN).
- Brałam udział w zakupie wyposażenia pracowni naukowych w ramach projektu POIS 13.1 „Rozbudowa i modernizacja infrastruktury dydaktycznej na kierunkach przyrodniczych i ścisłych UJ”.
- Pełniłam funkcję Bid-Manager w ramach udziału Wydziału Chemii w LifeKIC Consortium. Byłam odpowiedzialna za korespondencję, dokumentację oraz udział w telekonferencjach (2014).
- Byłam członkiem zespołu kierowanym przez dr hab. Renatę Wiotechę-Posłuszny odpowiedzialnym za aktualizację informacji zamieszczanych na stronach wydziałowego serwisu www (2014-2015).

- Brałam aktywny udział w przygotowaniu projektu „Wyposażenie pracowni specjalizacyjnej dla Chemii Medycznej” w ramach Rektorskiego Funduszu Rozwoju Dydaktyki „*Ars docendi*” (2018).
- Od roku 2016 do chwili obecnej jestem członkiem Rady Wydziału Chemii UJ.


.....
(podpis wnioskodawcy)