

Załącznik 2

AUTOREFERAT

Dr Mariusz Ryszard Szabelski

UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

Katedra Fizyki i Biofizyki

Olsztyn 2015



1. Mariusz Ryszard Szabelski

2. Posiadane stopnie naukowe:

- 1998 magister chemii, studia ukończone z wyróżnieniem (III lokata), Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański.
- 2003 doktor nauk chemicznych w zakresie chemii, rozprawa doktorska pt. „Synteza i badania substratów proteinaz cysteinowych zawierających donor i akceptor energii wzbudzenia elektronowego”, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- 1998 – 2003 słuchacz studium doktoranckiego Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
- 2003 – 2010 adiunkt w Instytucie Fizyki Doświadczalnej, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki, Uniwersytetu Gdańskiego
- 2010 – obecnie adiunkt w Katedrze Fizyki i Biofizyki, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

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.):

A). Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

„Zastosowanie czasowo-rozdzielczej spektroskopii do badań bezpromienistego transferu energii wzbudzenia w znakowanych fluorescencyjnie biomolekułach”.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Mariusz Ryszard Szabelski, „Zastosowanie czasowo-rozdzielczej spektroskopii do badań bezpromienistego transferu energii wzbudzenia w znakowanych fluorescencyjnie biomolekułach”, *Wydawnictwo UWM*, Rozprawy i Monografie, tom 196, 2015 Olsztyn, ISBN 978-83-7299-952-8.

Byłem pomysłodawcą tych badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich doświadczeń, wykonaniu syntez obiektów badawczych, analizie i interpretacji wyników badań, napisaniu monografii. Mój udział procentowy szacuję na 100%.

C) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Zastosowanie zjawiska bezpromienistego transferu energii (FRET z ang. *Förster's Resonance Energy Transfer*) w naukach przyrodniczych od lat dziewięćdziesiątych gwałtownie rośnie, na co wskazuje duży wzrost publikacji z różnych dziedzin. Na poprawną interpretację wyników badań z wykorzystaniem FRET wpływa wiele czynników. Część przyczyn wynika z niewłaściwego podejścia do problemu badawczego np. zły dobór pary donor (D) – akceptor (A), stosowanie do obliczeń nieodpowiedniego średniego czasu życia w stanie wzbudzonym, czy też nieprawidłowe przygotowanie próbek. Są też takie, które wynikają z natury obiektu badawczego i/lub zaprojektowanego eksperymentu a nie z błędów popełnianych przez eksperymentatorów. Należą do nich między innymi nadmiarowe wyznakowanie biomolekuły cząsteczkami donora oraz niekorzystne ustawienie momentów przejść D i A.

Wyniki obliczeń wydajności transferu energii oraz średnich odległości międzychromoforowych są słuszne jedynie w przypadku, gdy stosunek molekuł donora do akceptora dołączonych do biomolekuły wynosi 1:1. Niestety w wielu przypadkach warunek ten nie jest spełniony. Przyczyną jest statystyczne obsadzenie miejsc w biomolekule chromoforami D i A. Podczas dołączania np. do cząsteczki białka fluoroforu możliwa jest reakcja chemiczna znacznika z dowolną dedykowaną grupą funkcyjną w białku. Powoduje to otrzymanie mieszaniny biomolekuł z różnym obsadzeniem przez chromofory. W trakcie procesu oczyszczania usunięcie nieprzereagowanego znacznika z próbki nie stanowi większego problemu natomiast rozdział otrzymanej mieszaniny białek o różnym obsadzeniu chromoforem jest praktycznie niemożliwy. Spowodowane jest to różnicą w wielkości molekuł. Dołączenie małego chromoforu do wielokrotnie większego od niego białka praktycznie nie zmienia właściwości fizyko-chemicznych dużej biomolekuły.

Duży wpływ na poprawność otrzymanych wyników ma również wzajemne ustawienie momentów przejść D i A. Obliczenia odległości R posiadają wewnętrzne ograniczenie

związane z wyznaczaniem właściwej wartości czynnika kąтового κ^2 . Przyjmuje się, że w przypadku układów izotropowych ze swobodną rotacją cząsteczek donora i akceptora wartość κ^2 wynosi 2/3. W rzeczywistości taka sytuacja jest trudna do osiągnięcia podczas eksperymentu i występuje jedynie w przypadku małych chromoforów ulegających szybkiej precesji takich jak kationy metali [1]. Dodatkowo wiele znaczników fluorescencyjnych posiada więcej niż jeden moment przejścia, które mogą być wzbudzone tą samą długością fali. Momenty przejść w molekułach fluorofora zazwyczaj nie są do siebie równoległe a często prostopadłe co prowadzi do uśredniania κ^2 . Niestety nie ma metody pozwalającej w sposób doświadczalny wyznaczyć wartość κ^2 , jednakże możliwe jest oszacowanie przedziału wartości czynnika kąтового na podstawie pomiarów anizotropowych. Dzięki temu można zawęzić zakres prawdopodobnych odległości międzychromoforowych. Ograniczeniem tej metody jest fakt, że można ją stosować jedynie w przypadku, gdy zarówno donor jak i akceptor są fluoroforami.

W obu opisanych powyżej sytuacjach tylko część molekuł D w wyznakowanej biomolekułce jest gaszona na drodze bezpromienistego transferu energii. Mierzony sygnał fluorescencji pochodzi wówczas od donora w parze D-A oraz cząsteczek D, które nie transferują energii. W rezultacie, w trakcie analizy danych czasowo-rozdzielczych pojawia się długi komponent odpowiadający udziałowi nietransferującego donora w zaniku emisji, natomiast w wyniku analizy widm emisji niemożliwe jest uzyskanie informacji jaka część promieniowania pochodzi od nietransferującego donora ponieważ podczas pomiarów stacjonarnych rejestrujemy sumaryczny sygnał fluorescencji z próbki.

Dodatkowym ograniczeniem stosowania zjawiska bezpromienistego transferu energii jest dystans na jakim ono zachodzi. W klasycznym ujęciu odległość pomiędzy donorem a akceptorem powinna mieścić się w przedziale od 10 do 100 Å w wyniku czego badania dużych biomolekuł z zastosowaniem FRET są w znacznym stopniu ograniczone. Obecnie pojawia się coraz więcej publikacji, w których przedstawiono wyniki badań transferu energii w układach wielochromoforowych dzięki czemu możliwe było zwiększenie dystansu ponad 10 nm. Cel osiągnięto poprzez zastosowanie układów zawierający nadmiar akceptorów w stosunku do molekuł donora [2, 3]. Jednak wadą takich układów jest to, że transfer energii może zachodzić pomiędzy donorem a dowolnym nadmiarowym akceptorem i analiza danych pomiarowych wymaga stosowania zaawansowanych metod obliczeniowych. Dużo więcej możliwości aplikacyjnych dają układy trójchromoforowe, w których zachodzi dwuetapowy transfer energii. Układy te zawierają trzy różne fluorofory. Pierwszy pełni rolę

klasycznego donora energii (D), drugi jest mediatorem (M), czyli akceptorem energii od donora a następnie przekazuje ją na drodze bezpromienistego transferu dalej do trzeciego fluoroforu, który jest typowym akceptorem (A). Powstaje dzięki temu układ, w którym następuje kaskadowy transfer energii $D \rightarrow M \rightarrow A$. Tego typu triady zostały wykorzystane w badaniach oddziaływań gość-gospodarz z udziałem cyklodekstryn [4], nieinwazyjnej analizie tworzenia kompleksów DNA i ich stabilności [5], oraz do wykrywania specyficznych sekwencji DNA w bardzo niskich stężeniach [6].

Cel badań:

Obecnie nie ma opracowanej metody pozwalającej na korektę wyników na obecność nietransferującego donora w próbce oraz określenie jaki procent molekuł D nie bierze udziału w transferze energii. Brak również badań dotyczących czynników mogących wpłynąć na ilość molekuł nietransferującego D w trakcie eksperymentów. Istnieje również duża potrzeba opracowania nowych sond fluorescencyjnych w oparciu o kaskadowy transfer energii do badań dużych biomolekuł. Użyty układ trójkromoforowy powinien charakteryzować się dużym molowym współczynnikiem absorpcji donora pozwalającym na efektywne wzbudzenie, długożyciowym mediatorem, oraz akceptorem emitującym promieniowanie w zakresie czerwonym. Biorąc powyższe celem prezentowanych badań było:

- opracowanie uniwersalnego narzędzia pozwalającego na podstawie wyników czasowo-rozdzielczych określić ilość nietransferującego donora w próbce oraz wyodrębnić i zanalizować czysty zanik donora biorącego udział w procesie transferu energii;
- wykazać jaki wpływ na ilość nietransferującego D i zmiany konformacyjne łańcucha peptydowego ma ośrodek, długość sekwencji peptydowej, miejsce dołączenia donora oraz tworzenie kompleksów typu „gospodarz-gość”;
- opracowanie metody uwięzienia biomolekuł w układach sztywnych z zachowaniem ich natywnej struktury przestrzennej;
- opracowanie nowej sondy fluorescencyjnej opartej o łańcuch peptydowy i wykazującej kaskadowy bezpromienisty transfer energii pozwalającą na dużą separację długości fal wzbudzenia i obserwacji.

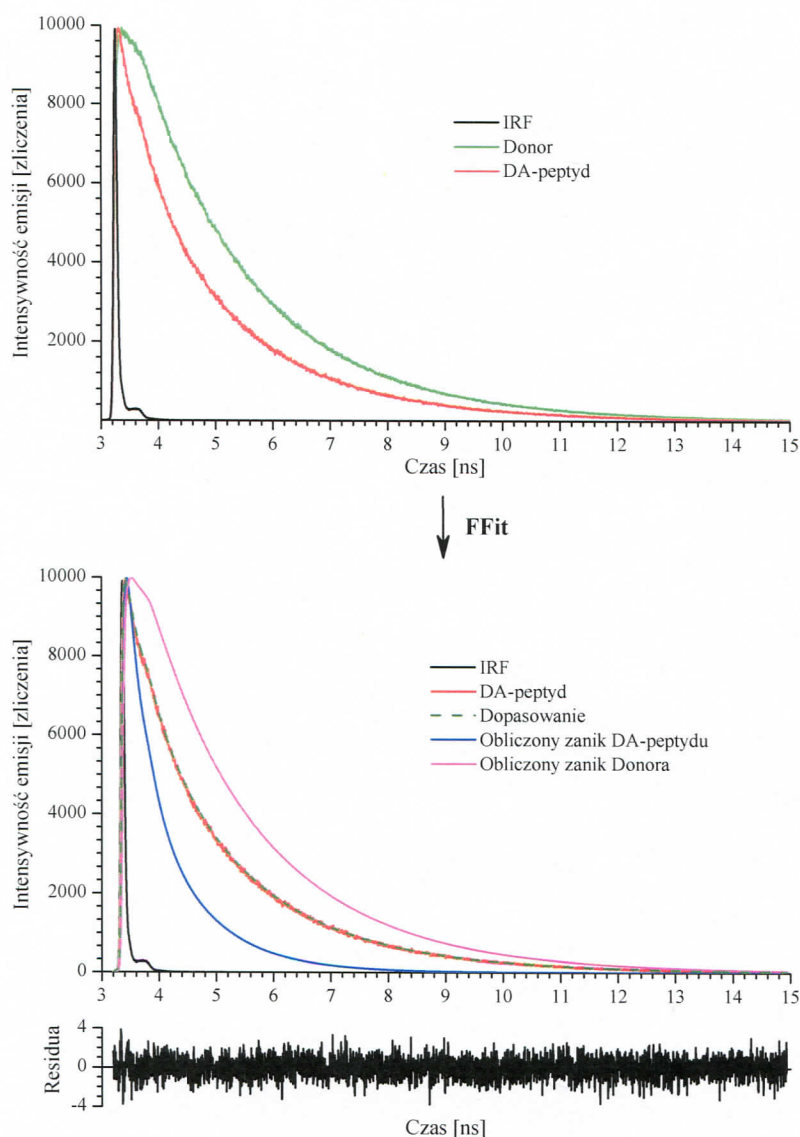
Prezentacja przykładowych wyników badań:

Zanik fluorescencji wyznakowanej parą D-A biomolekuły można w ogólny sposób opisać za pomocą zależności:

$$f(t) = uf_{DA}(t) + (1 - u)f_{FD}(t)$$

gdzie $f_{DA}(t)$ jest zanikiem fluorescencji donora transferującego w parze D-A, $f_{FD}(t)$ zanikiem fluorescencji donora, natomiast u udziałem transferującego donora w zmierzonym zaniku fluorescencji. Sygnał fluorescencji od nietransferujących molekuł D, oznaczony jako $f_{FD}(t)$, może pochodzić zarówno od wolnych molekuł donora znajdujących się w roztworze, nadmiarowego wyznakowania biomolekuły, ale również od cząsteczek znajdujących się w parze D-A, lecz nie biorących udziału w transferze energii do akceptora np. z powodu niewłaściwego wzajemnego ustawienia momentów przejść D i A. Powyższe równanie oraz zmodyfikowana metoda MCMC (z ang. *Markov Chain Monte Carlo*) nazywana DE-MC (ang. *Differential Evolution Markov Chain*) zostały wykorzystane w opracowanym po raz pierwszy programie FFit działającym w środowisku Windows. Metoda DE-MC zaproponowana przez Ter Braak-a w 2006 roku [7] w celu poruszania się w przestrzeni parametrów tworzy populację łańcuchów, z których każdy zawiera wektor parametrów modelowych. Dzięki temu wykorzystuje istniejącą już informację o rozkładzie parametrów. DE-MC wywodzi się z algorytmów genetycznych i tak jak one próbuje przestrzeń parametrów przechodząc od punktu do punktu. Do poprawnego funkcjonowania wymaga niewielką liczbę parametrów przez co jest wygodna w użyciu.

Dzięki zastosowaniu programu FFit możliwe jest wygenerowanie zaniku transferującego donora w próbkach zawierającej zanieczyszczenie wolnym donorem oraz takich, w których ze względu na niewłaściwe wzajemne ustawienie momentów przejść emisji donora i absorpcji akceptora transfer energii nie zachodzi pomiędzy wszystkimi parami D i A. Do wykonania obliczeń z użyciem programu FFit potrzebne są jedynie dwa zaniki fluorescencji: zanik zmierzony dla biomolekuły wyznakowanej parą D-A oraz zanik donora energii. Ogólna zasada rozbioru uzyskanych danych eksperymentalnych na składowe została przedstawiona na rysunku 1. Residua pokazane na rysunku dotyczą całego procesu rozbioru zaniku na poszczególne składowe i dopasowania krzywej teoretycznej. W celu łatwiejszego zobrazowania różnic wszystkie zaniki zostały znormalizowane do 10 000 zliczeń.



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie zasady działania programu FFit.

Prawidłowe działanie programu FFit zostało sprawdzone w trakcie analizy czasowo-rozdzielczych wyników uzyskanych dla ściśle zdefiniowanego układu eksperymentalnego. Do badań zastosowano peptyd Box(naft(OMe))-Lys-Phe-Gly-Gly-Ala-Ala-Tyr(NO₂) (Box(naft(OMe))-pep6aa), w którym donorem jest Box(naft(OMe)) (3-[2-(1-(4'-metoksy)naftylo)benzoksazol-5-ylo]alanina) natomiast Tyr(NO₂) (3-nitro-L-tyrozyna) jest akceptorem. Sekwencja aminokwasowa (Lys-Phe-Gly-Gly-Ala-Ala) jest dobrze rozpoznawana przez proteazy cysteinowe i wykazuje wysoką specyficzność do papainy [8, 9]. Przyrządzono dwie serie roztworów w wodzie i w 90% glicerynie zawierających stałe całkowite stężenie donora energii natomiast w poszczególnych roztworach stosunki molowe DA-peptydu do wolnego donora były różne. Należy podkreślić, że właściwości spektralne Box(naft(OMe)) nie ulegają zmianie po dołączeniu do peptydu. Poprawność otrzymanych

wyników została potwierdzona w trakcie dwóch analiz globalnych przeprowadzonych dla obu serii pomiarowych.

Kilka peptydów różniących się długością sekwencji aminokwasowej, donorem w parze D-A i miejscem jego dołączenia do sekwencji peptydowej zostało użytych do badań wpływu ośrodka na ilość nietransferującego donora. Poniżej (Tabela 1), jako przykład, przedstawiono wyniki analizy z użyciem programu FFit zaników fluorescencji otrzymane dla peptydu Box(naft(OMe))-pep6aa.

Tabela 1. Rezultaty obliczeń u , wydajności transferu energii oraz średnich odległości międzychromoforowych dla poszczególnych populacji peptydu Box(naft(OMe))-pep6aa w wodzie, nasyconym roztworze β -CD i 90% glicerynie.

τ_i FFit	H ₂ O			β -CD _{aq}			90% gliceryna		
	α_{τ_i}	$E_T^{\tau_i}$	R [Å]	α_{τ_i}	$E_T^{\tau_i}$	R [Å]	α_{τ_i}	$E_T^{\tau_i}$	R [Å]
τ_1	0.7679	0.995	12.5	0.3084	0.990	14.8	0.6609	0.989	15.2
τ_2	0.1589	0.928	19.7	0.3660	0.926	20.9	0.1187	0.896	22.5
τ_3	0.0732	0.756	25.0	0.3256	0.725	27.1	0.2204	0.649	29.1
$\langle \tau \rangle$	-	0.967	17,2	-	0.880	22.9	-	0.903	22,2
u	0.954			0.919			0.900		

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że wraz ze wzrostem lepkości ośrodka liczba molekuł donora, które biorą udział w procesie bezpromienistego transferu energii (u) maleje. Wzrost lepkości powoduje dwa efekty. Pierwszy to ograniczenie rotacji i zmian konformacyjnych w obrębie znaczników a drugi znaczne spowolnienie dynamiki zmian konformacyjnych łańcucha peptydowego, w skutek czego w większym stopniu niż np. w wodzie utrudnione jest osiągnięcie izotropowego rozkładu momentów przejść D i A. Wykazano również, że podobny skutek powoduje dokowanie się biomolekuły do wnętrza cząsteczki gospodarza. W tej części badań wykorzystano cyklodekstryny (CD), które ze względu na swoje właściwości stosowane są jako modelowe związki w wielu badaniach oddziaływań biomolekuł. Widoczny jest wyraźny wpływ kompleksowania i zwiększenia lepkości medium na obliczone odległości międzychromoforowe. We wszystkich trzech roztworach zanik transferującego donora opisywała funkcja trójwykładnicza, można więc

przyjąć, że peptyd przyjmuje trzy główne konformacje. Oczywiście mamy do czynienia z rozkładem odległości a uzyskane wartości czasów życia posłużyły jedynie do obliczenia trzech średnich wartości odległości międzychromoforowych (R) odpowiadających głównym populacjom peptydu o określonych konformacjach. Zaprezentowane wyniki wyraźnie wskazują na wpływ procesu dokowania peptydu do wnętrza cyklodekstryny oraz zwiększenia lepkości medium na średnie odległości międzychromoforowe uzyskane dla poszczególnych populacji konformacyjnych. W wodzie peptyd przyjmuje konformacje wynikające z jego sekwencji, dynamika zmian jest największa oraz brak jest dodatkowych czynników powodujących zawadę przestrzenną. W związku z tym w wodzie odległość międzychromoforowa jest najmniejsza a transfer energii największy. Pojawienie się w roztworze molekuł cyklodekstryny i możliwość tworzenia kompleksów typu „gość-gospodarz” powoduje wzrost wartości R dla wszystkich osiągniętych konformacji ze względu na zawadę steryczną. Natomiast drastyczne zwiększenie lepkości ośrodka utrudnia zmiany konformacyjne przez co odległości pomiędzy donorem a akceptorem są największe. Odległość pomiędzy chromoforami dla liniowej konformacji wyznakowanego peptydu D-Lys-Phe-Gly-Gly-Ala-Ala-A wynosi $27 \pm 3 \text{ \AA}$ [9] co oznacza, że w każdym z badanych roztworów występowała pewna populacja peptydu o praktycznie liniowej konformacji. Udział tej konformacji w stężonym roztworze β -CD był największy i wynosił ponad 32% w przeciwieństwie do roztworu wodnego, w którym jej udział stanowił jedynie 7%. Średnia odległość międzychromoforowa wyznaczona dla najkrócej żyjącej populacji peptydów świadczy iż łańcuch peptydowy jest mocno wygięty, a odległość pomiędzy donorem a akceptorem wynosi jedynie połowę R dla konformacji liniowej. Ze względu na brak przeszkód sterycznych w wodzie i 90% glicerynie najbardziej wygięta konformacja jest dominująca. Powstanie kompleksu z β -CD powoduje oddalenie się końców peptydu i drastyczny spadek udziału najbardziej gaszonego donora w zaniku fluorescencji. Ta sytuacja ma wpływ na wartości średnich czasów życia ważonych po amplitudach $\langle \tau \rangle$ i w konsekwencji na średnie odległości pomiędzy D i A obliczone na ich podstawie.

Projektując badania z udziałem syntetycznych peptydów zawierających donor i akceptor energii w większości przypadków sekwencja peptydowa jest zaczerpnięta z białek specyficznym oddziaływujących z obiektem biologicznym będącym przedmiotem naszego zainteresowania. W takiej sytuacji oprócz doboru pary D-A należy podjąć decyzję, jak długi powinien być łańcuch peptydowy, oraz w którym miejscu peptydu zostaną dołączone chromofory. Odpowiedź nie jest prosta ponieważ z jednej strony otrzymany obiekt powinien

charakteryzować się odpowiednimi właściwościami biologicznymi z drugiej jednak strony istotnym jest aby jego synteza była łatwa oraz nie generowała zbyt dużych kosztów. Niestety często zapominamy, że długość sekwencji peptydowej, rodzaj użytych znaczników z pary D-A oraz miejsce ich przyłączenia do peptydu mogą drastycznie zmieniać właściwości biologiczne otrzymanego obiektu. Do badań wpływu skracania sekwencji peptydowej i miejsca dołączenia donora energii użyto cztery peptydy o różnej długości sekwencji aminokwasowej. Na podstawie wyników uzyskanych z pomiarów czasowo-rozdzielczych stwierdzono dla wszystkich badanych peptydów obecność długożyciowego komponentu. Pojawiający się sygnał od nietransferującego donora wynikał z braku izotropowego rozkładu momentów przejść pomiędzy D i A. Zastosowanie programu FFit umożliwiło wyliczenie ilości donora energii biorącego udział w transferze energii. Uzyskane wartości u zastosowano do korekty wyników a następnie obliczono wydajności transferu energii i średnie odległości międzychromoforowe. Należy zaznaczyć, że w przypadku pomiarów czasów życia z zastosowaniem źródła światła o dosyć szerokim pulsie wzbudzającym w porównaniu do laserów, jedynie program FFit pozwala na wyliczenie ilości nietransferującego donora a następnie korektę wyników stacjonarnych korzystając ze zmodyfikowanego wzoru [10]:

$$E_T = \left(1 - \frac{I_{DA}}{I_D}\right) \frac{1}{u}$$

W wyniku analizy otrzymanych rezultatów stwierdzono wyraźny wpływ ilości aminokwasów znajdujących się pomiędzy D i A na wydajność transferu energii. Największy transfer, a co za tym idzie najmniejszy dystans pomiędzy chromoforami, wykazuje peptyd o najkrótszej sekwencji, w którym donor i akceptor są oddzielone jedynie dwoma aminokwasami. Peptyd ten posiada mały udział nietransferującego donora w zaniku fluorescencji co sugeruje na dużą łatwość osiągania rozkładu izotropowego momentów przejść emisji donora i absorpcji akceptora. Do badań użyto dwa peptydy posiadające w swej budowie cztery reszty aminokwasowe pomiędzy D i A, przy czym pełna sekwencja aminokwasowa jednego z nich była dłuższa o jeden aminokwas a donor energii był wbudowany w łańcuch peptydowy a nie jak w pozostałych przypadkach doczepiony na N-końcu. Dłuższy peptyd wykazuje bardziej rozciągniętą konformację łańcucha peptydowego w przeciwieństwie do cztero-aminokwasowego peptydu w przypadku, którego dystans pomiędzy donorem i akceptorem energii był nieco mniejszy w wyniku przyjęcia przez peptyd wygiętej konformacji. W obu przypadkach udział nietransferującego donora w zaniku fluorescencji był praktycznie taki sam co może świadczyć, że większy wpływ na ograniczenie

rotacji fluoroforu, będącego syntetycznym aminokwasem, będzie miała przyjmowana konformacja łańcucha peptydowego wynikająca z sekwencji peptydowej i ilości aminokwasów niż samo miejsce ulokowania donora w wyznakowanym peptydzie. Najdłuższy z badanych peptydów posiadał taką samą sekwencję jak omawiany już wcześniej Box(naft(OMe))-pep6aa. Peptydy te różnią się jedynie zastosowaną pochodną benzoksazolo-5-L-alaniny a dokładnie podstawnikiem w pozycji 2. Ta, jakby się wydawało, niewielka zmiana w obrębie fluoroforu powoduje, że oba badane peptydy wykazują różne właściwości. Badany peptyd charakteryzował się większym zarówno transferem energii jak i udziałem donora w nim partycypującego a średnia odległość pomiędzy D i A jest mniejsza prawie o 5 Å niż to obserwowano w przypadku Box(naft(OMe))-pep6aa. Świadczy to o dużo łatwiejszym przyjmowaniu przez peptyd konformacji znacznie odbiegającej od liniowej. Jak widać samo zastosowanie takiego a nie innego znacznika fluorescencyjnego może prowadzić do znaczących zmian konformacyjnych łańcucha peptydowego co drastycznie może wpływać na właściwości biologiczne badanego obiektu.

Biologiczna funkcja biopolimerów jest bezpośrednio powiązana z ich natywną strukturą przestrzenną. Badania wykorzystujące zjawisko transferu energii dostarczają wiele ważnych informacji dotyczących konformacji biomolekuł w większości prowadzone są w roztworach, w których mamy do czynienia z sporą dynamiką zmian konformacyjnych, która zależy od wielu czynników takich jak temperatura, pH, lepkość ośrodka i innych. Alternatywą może być prosta w wykonaniu i tania metoda po raz pierwszy zaproponowana przez habilitanta (Szabelski i in. 2007) pozwalająca na zahamowanie dynamiki zmian konformacyjnych a przynajmniej drastyczne ich ograniczenie. Polega ona na zastosowaniu matrycy polimerowej pozwalającej na „zamrożenie” natywnej konformacji peptydu. Do tego celu wykorzystano wysoko cząsteczkowy alkohol poliwinylowy (PVA), który w środowisku wodnym ulega polimeryzacji. Związek ten w postaci spolimeryzowanej charakteryzuje się wysoką zawartością wody, posiada właściwości półkryształiczne [11] a dzięki obecności grup OH i możliwości tworzenia wiązań wodorowych [12] stosowany jest w materiałach medycznych i jest kompatybilny z tkankami ludzkimi [13].

Do badań użyto szereg peptydów, między innymi wcześniej prezentowany peptyd Box(naft(OMe))-pep6aa, które umieszczono w niewyciągniętych oraz sześciokrotnie wyciągniętych matrycach alkoholu poliwinylowego. Wyniki pomiarów czasów życia fluorescencji badanych próbek były analizowane z użyciem programu FFit. Porównując wyniki analiz dla wyciąganych i niewyciąganych folii PVA zauważono, że rozciąganie

matrycy powoduje zmiany konformacji łańcucha peptydowego oraz udziałów w zaniku fluorescencji poszczególnych form. Wskazuje to na statystyczne ułożenie molekuł peptydu w niewyciągniętej matrycy, a w trakcie jej rozciągania obserwowane są dwa rodzaje zmian konformacyjnych. Cząsteczki peptydu ułożone wzdłuż osi rozciągania przyjmują bardziej liniową konformację natomiast łańcuch peptydowy molekuł położonych bardziej prostopadle do kierunku rozciągania ulega wygięciu stąd obserwowane wydłużenie czasów życia oraz zmiana wartości α_i . W szczególności tę tezę potwierdza zmniejszenie ilości najbardziej liniowej konformacji peptydu. Podobnie jak poprzednio obliczono średnie odległości międzychromoforowe dla poszczególnych populacji peptydu Box(naft(OMe))-pep6aa o podobnej konformacji i przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Wydajności transferu energii oraz średnie odległości międzychromoforowe obliczone dla poszczególnych populacji peptydu Box(naft(OMe))-pep6aa w niewyciągniętej ($R_S = 1$) i sześciokrotnie wyciągniętej ($R_S = 6$) matrycy PVA.

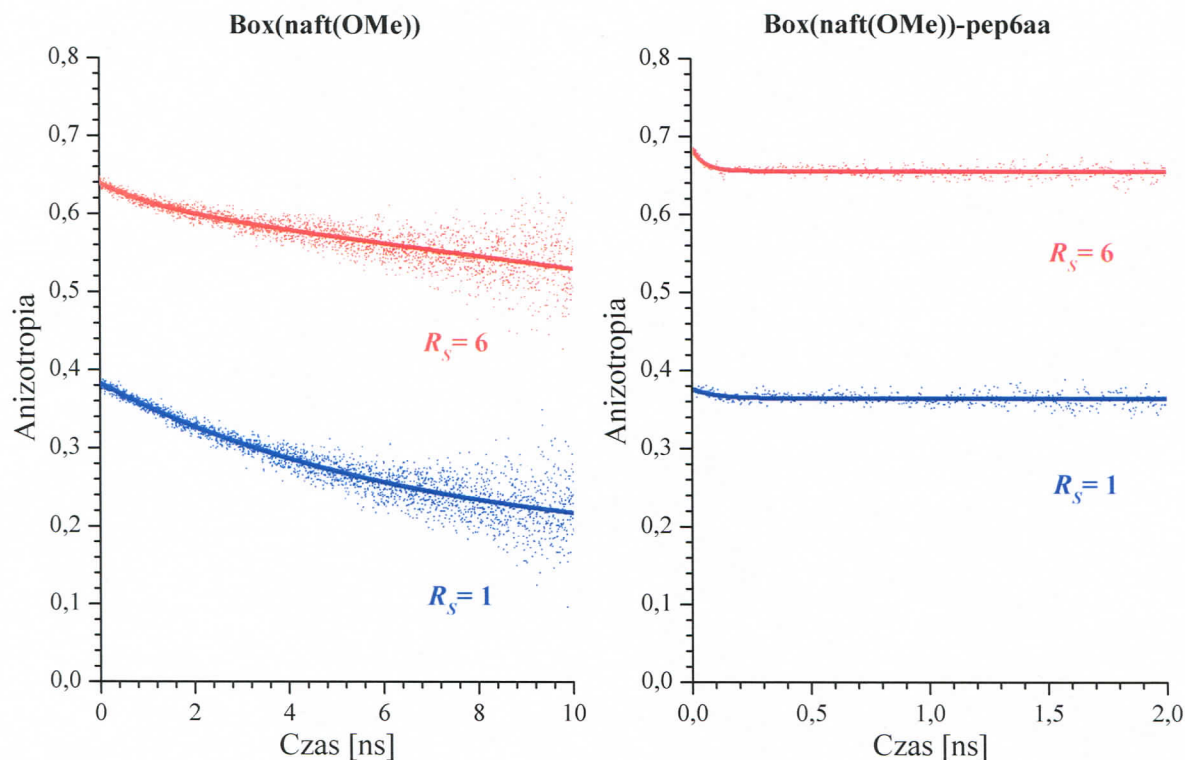
τ_i FFit	$R_S = 1$			$R_S = 6$		
	α_{τ_i}	$E_T^{\tau_i}$	R [Å]	α_{τ_i}	$E_T^{\tau_i}$	R [Å]
τ_1	0.1877	0.976	14.7	0.2948	0.964	15.8
τ_2	0.3929	0.899	19.0	0.3859	0.857	20.3
τ_3	0.4194	0.583	25.8	0.3192	0.513	27.1
$\langle \tau \rangle$	-	0.781	22.1	-	0.778	22.2
u	0.851			0.905		

Porównując dane zaprezentowane powyżej z wcześniejszymi rezultatami z tabeli 1 można stwierdzić, że średnie odległości międzychromoforowe w matrycy alkoholu poliwinylowego obliczone dla poszczególnych populacji peptydu Box(naft(OMe))-pep6aa są praktycznie takie same jak dla wodnych roztworów. Wyniki z matrycy niewyciągniętej dobrze pasują do tych otrzymanych w czystej wodzie natomiast z sześciokrotnie rozciągniętej do rezultatów uzyskanych w nasyconym wodnym roztworze cyklodekstryny. W obu przypadkach jedynie odległości międzychromoforowe uzyskane dla najbardziej wygiętej konformacji są nieznacznie większe w PVA niż to było obserwowane w roztworach wodnych. Te niewielkie różnice najprawdopodobniej są spowodowane niepewnością pomiarów

czasowo-rozdzielczych, które w przypadku frontального wzbudzenia cienkich filmów nie należą do najłatwiejszych ze względu na silne rozpraszanie światła wzbudzającego. Oczywiście w trakcie badań stosowany był odpowiedni filtr typu *cutoff* pomimo to w residuach można było zaobserwować niewielkie zaburzenie występujące tuż przed właściwym zanikiem (na początku narastania intensywności) pochodzący od rozproszenia i należało uwzględnić ten czynnik podczas obliczeń. Włączenie w programie opcji pozwalającej na wprowadzenie poprawki na światło rozproszone w większości przypadków nieznacznie zwiększa obliczone wartości dla krótkożyłowych komponentów, których czas życia jest porównywalny z FWHM pulsu wzbudzającego. Dodatkowym czynnikiem może być sam proces żelowania alkoholu poliwinylowego lecz w tym przypadku taki wniosek wydaje się bezzasadny ponieważ wtedy zmiany objęły by wszystkie populacje peptydu o określonych konformacjach a tego tu nie zaobserwowano.

Na podstawie pomiarów zaników anizotropii w czasie można uzyskać ważne informacje na temat mobilności i dynamiki zmian fluoroforów. Dołączenie znacznika fluorescencyjnego do biomolekuły powoduje, że dynamika znacznika jest ściśle zależna od ruchów i zmian konformacyjnych biomolekuły, do której został dołączony. W takim przypadku pomiar zaniku anizotropii dostarcza informacje o strukturze przestrzennej, zmianach konformacyjnych i giętkości biomolekuły [14]. Pomiar anizotropowy następczają jednak spore trudności. Większość aktywnych biologicznie molekuł wymaga stosowania środowiska wodnego, w którym dynamika zmian jest bardzo szybka co często uniemożliwia wykonanie pomiarów zaników anizotropii. Wielu badaczy próbuje spowolnić dynamikę zmian poprzez użycie rozpuszczalników o dużym współczynniku lepkości jak np. glicerynę czy glikole. Ta metoda jest jednak dyskusyjna ze względu na możliwość zaburzenia lub całkowitą utratę natywnych cech biomolekuły. Dobrym rozwiązaniem tego problemu mogą być pomiary anizotropowe w matrycach z alkoholu poliwinylowego. Jak to wykazano we wcześniejszym fragmencie ze względu na właściwości alkoholu poliwinylowego peptydy umieszczone w matrycach PVA wykazują takie same właściwości jak w roztworach wodnych. Potwierdzają to również publikacje opisujące zastosowanie hydrożelów alkoholu poliwinylowego do dostarczania drogą doustną leków białkowych i peptydowych bez utraty ich właściwości [15, 16]. W związku z powyższym, niewyciągnięte oraz osiowo sześciokrotnie wyciągnięte matryce PVA z umieszczonymi w nich peptydami zostały wykorzystane do pomiarów zaników anizotropii w czasie. Otrzymane wartości anizotropii początkowej r_0 odpowiadały wynikom stacjonarnych pomiarów anizotropii. Na rysunku

poniżej (Rys. 2) przedstawiono przykładowe zaniki anizotropii wolnego donora i peptydu Box(naft(OMe))-pep6aa umieszczonych w niewyciągniętych ($R_S = 1$) i sześciokrotnie wyciągniętych ($R_S = 6$) foliach PVA.



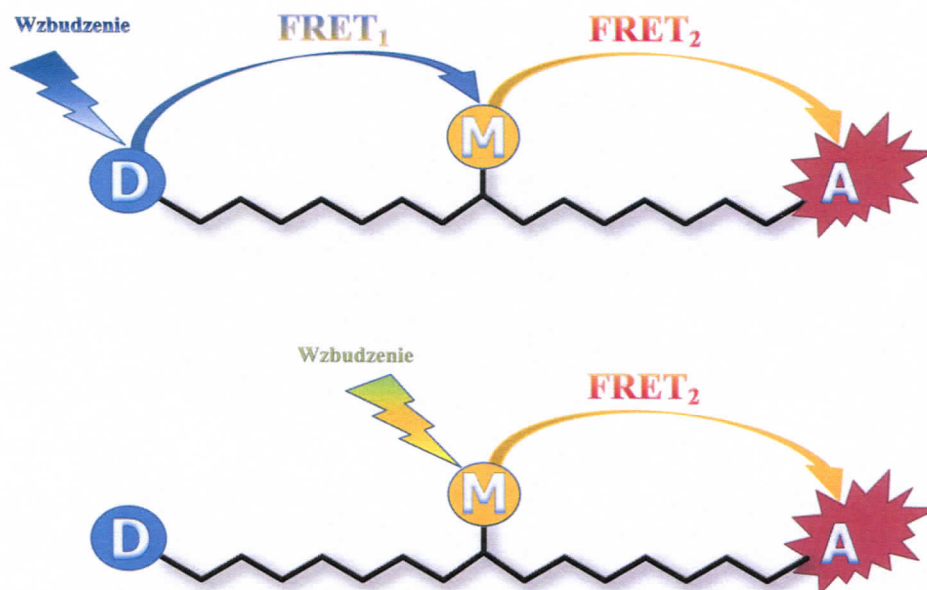
Rys. 2. Zaniki anizotropii Box(naft(OMe)) oraz Box(naft(OMe))-pep6aa w niewyciągniętych ($R_S = 1$) i sześciokrotnie wyciągniętych ($R_S = 6$) matrycach alkoholu poliwinylowego.

Najdłuższe czasy korelacji (ϕ) uzyskano dla wolnych donorów (dwie pochodne benzoksazolo-5-L-alaniny). Związki te charakteryzowały się niewielką różnicą czasów ϕ w niewyciągniętych matrycach PVA. W wyniku osiowego wyciągnięcia folii polimerowych następowało drastyczne wydłużenie anizotropii a uzyskane czasy korelacji dla dwóch badanych pochodnych znacznika nie są już podobne. Wynikało to różnic w strukturze cząsteczek i czasach życia w stanie wzbudzonym obu fluoroforów. Osiowe wyciągnięcie matrycy polimerowej powoduje wymuszone orientowanie się molekuł fluoroforu wzdłuż osi rozciągania czego następstwem jest dużo wolniejszy zanik anizotropii. W przypadku matrycy o $R_S = 1$ wpływ struktury donorów na czas korelacji jest niewielki. Rozciąganie PVA powoduje spłaszczenie i wydłużenie komórek w sieci polimerowej, a co za tym idzie dużo większe znaczenie odgrywa budowa fluoroforu. Oba fluorofory dobrze się orientują w polimerze o czym świadczy praktycznie identyczny wzrost anizotropii. Jednak w przypadku

Box(naft(OMe)) spłaszczenie przestrzeni w sieci PVA powoduje większe utrudnienia rotacji ze względu na prostopadłe ustawienie do osi pierścienia bezoksazolowego podstawnika w pozycji 2 a przez to dużo dłuższy czas korelacji rotacyjnej.

W zanikach anizotropii zarejestrowanych dla peptydów zawierających parę donor – akceptor widoczny jest jedynie bardzo krótki komponent odpowiadający rotacji samego fluoroforu w peptydzie. Czas korelacji całego peptydu dąży do nieskończoności i w zaniku anizotropii widoczne jest plateau. Ta sytuacja dobitnie potwierdza słuszność postawionej przez autora tezy, że żelowanie matrycy polimerowej powoduje „zamrożenie” konformacji łańcucha peptydowego. Takie uwięzienie peptydu w alkoholu poliwinylowym powoduje unieruchomienie całej molekuly i możliwe są jedynie niewielkie ruchy fragmentów łańcucha. Oczywiście znacznik fluorescencyjny jest na tyle mały w porównaniu z cząsteczką peptydu, że jego ruchy są możliwe i będą widoczne w zanikach anizotropii. Uzyskane czasy korelacji były bardzo krótkie ze względu na występujący transfer energii pomiędzy donorem a niefluoryzującym akceptorem. Stwierdzono dobrą korelację czasów φ z długością peptydu – im krótszy peptyd tym większy transfer energii od D do A, a co za tym idzie krótszy czas korelacji. Należy pamiętać, że wyciąganie matrycy powoduje zarówno zmiany konformacyjne łańcuchów peptydowych jak również reorientację znaczników prowadzącą do preferowanego wzajemnego ustawienia momentów przejść. W wyniku tego procesu rośnie ilość transferującego donora w peptydzie (rośnie u) przez co czas korelacji ulega skróceniu.

Pojawia się coraz więcej prac, w których odstępuje się od klasycznego podejścia do badań z wykorzystaniem zjawiska transferu energii. Znane dotychczas systemy wielochromoforowe zawierały trzy znaczniki doczepione do różnych obiektów. W ramach prezentowanych tu badań, po raz pierwszy, został przedstawiony protokół syntezy peptydu wyznakowanego trzema różnymi fluoroforami pomiędzy, którymi zachodzi kaskadowy transfer energii. Transfer energii w takim peptydzie przedstawia schematyczny rysunek poniżej (Rys. 3). Taki układ umożliwia prowadzenie badań z zastosowaniem kaskadowego transferu energii poprzez wzbudzenie donora lub jednoetapowego transferu w przypadku bezpośredniego wzbudzenia mediatora. Tego typu peptydy mogą służyć jako substraty do badań kinetycznych pozwalających badać długie sekwencje aminokwasowe i znajdować specyficzne rejony rozpoznawalne przez enzymy. Dodatkowo wprowadzenie dwóch sekwencji aminokwasowych (D-sekwencja1-M-sekwencja2-A) specyficznych dla różnych enzymów umożliwia wykrywanie ich na przykład w płynach fizjologicznych człowieka lub lizatach komórkowych.



Rys. 3. Schematyczny model peptydu wyznakowanego trzema fluoroforami pomiędzy którymi zachodzi dwu etapowy transfer energii.

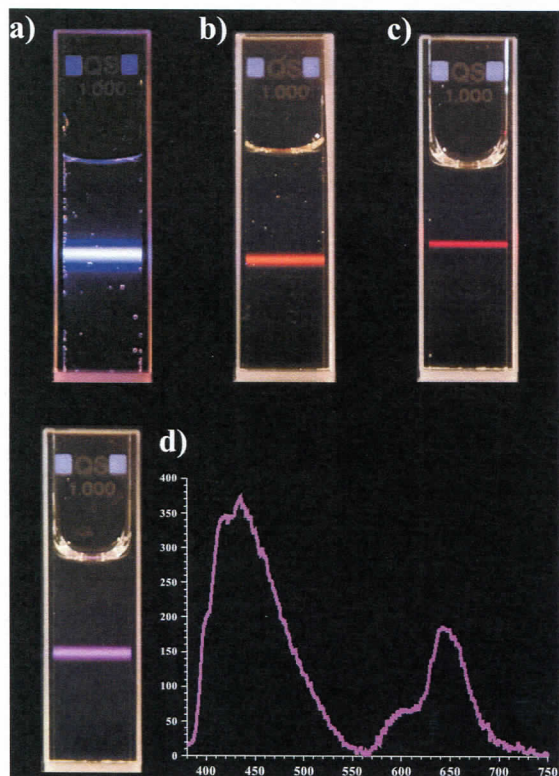
Przeprowadzono pełną charakterystykę spektralną peptydu wykazującego kaskadowy transfer energii, w którym mediatorem był długożyciowy organiczny kompleks rutenu. Sekwencja wyznakowanego peptydu (Triada-pep) zaprezentowana jest poniżej:



Zastosowany dobór znaczników skutkuje bardzo dużą separacją długości fal wzbudzenia i obserwacji, co pozwala stosować standardowo dostępne lasery impulsowe o długości fali około 400 nm natomiast obserwować sygnał akceptora powyżej 650 nm. Obliczone wartości krytycznych odległości Förstera wynoszą odpowiednio dla par DyLight405 – Ru(bPy)₂(phen) $R_0 = 43,5 \text{ \AA}$ oraz Ru(bPy)₂(phen) – DyLight633 $R_0 = 47,1 \text{ \AA}$. Na podstawie oszacowanych odległości pomiędzy grupami funkcyjnymi aminokwasów, do których zostały dołączone znaczniki stwierdzono, że transfer energii na każdym z etapów powinien być dużo większy niż 50%. Na rysunku 4 przedstawiono zdjęcia kuwety wypełnionych wodnymi roztworami poszczególnych fluoroforów oraz peptydu Triada-pep wzbudzanych odpowiednim promieniowaniem laserowym. Dodatkowo obok zdjęcia kuwety zawierającej roztwór Triada-pep umieszczono jego widmo emisji uzyskane z tym samym wzbudzeniem. Zarówno kolor emitowanego promieniowania oraz widmo emisji Triada-pep wskazują na duży udział nietransferującego donora (DyLight405) w sygnale fluorescencji. Kolor magenta (fuksja) emitowany przez próbkę powstaje przez zmieszanie dwóch barw niebieskiej i czerwonej odpowiadającym emitowanym barwom DyLight405 i DyLight633. Na

Handwritten signature

przedstawionym widmie można również zauważyć nieznaczny sygnał od nie transferującego kompleksu rutenu.



Rys. 4. Zdjęcia przedstawiające wodne roztwory trzech fluoroforów oraz Triada-pep wzbudzone światłem laserowym.

a) DyLight405 wzbudzony laserem 405 nm;

b) $\text{Ru}(\text{bPy})_2(\text{phen})$ wzbudzony laserem 450 nm;

c) DyLight633 wzbudzony laserem 635 nm;

d) Triada-pep wzbudzony laserem 375 oraz jego widmo emisji.

Wykonane zostały pomiary czasowo-rozdzielcze badanych próbek. Zastosowany kompleks rutenu w roztworach wodnych charakteryzuje się bardzo długim czasem życia w stanie wzbudzonym, który nie ulega zmianie po dołączeniu do biomolekuły i wynosi około 515 ns [17]. Pomimo iż na widmie emisji Triada-pep pojawia się niewielkie wygarbienie odpowiadające sygnałowi $\text{Ru}(\text{bPy})_2(\text{phen})$ to w trakcie pomiarów czasów życia sygnał od mediatora był niezauważalny.

Dzięki zastosowaniu programu FFit możliwe było określenie ilość nietransferującego donora (DyLight405) w peptydzie Triada-pep, która wyniosła prawie 57%, co jest zgodne wcześniej prezentowanymi wynikami. Nie dziwi więc pojawianie się w widmie Triada-pep zaprezentowanym na rysunku 4 silnego pasma pochodzącego od znacznika DyLight405. W wyniku transferu energii z D do M średni czas życia ważony po amplitudach DyLight405 w peptydzie Triada-pep ulega skróceniu do wartości 0,469 ns, a wydajność tego procesu wynosi bez mała 86%. Na podstawie średniego czasu życia otrzymanego w wyniku bezpośredniego wzbudzenia mediatora długością fali 450 nm i rejestracji sygnału fluorescencji jedynie od $\text{Ru}(\text{bPy})_2(\text{phen})$ przy 600 nm ($\langle\tau\rangle = 0,536$ ns) stwierdzono prawie sto procentowy transfer energii do DyLight633.

W wyniku wzbudzenia akceptora (DyLight633) jedynie poprzez kaskadowy transfer energii w zaniku fluorescencji pojawiają się długożyciowe komponenty nie spotykane w bezpośrednio wzbudzonym fluoroforze. Porównując średnie czasy życia DyLight633 uzyskane w wyniku impulsowego wzbudzenia i kaskadowego transferu energii to okazuje się, że w drugim przypadku czas życia wydłużył się aż 5,6 razy. Uzyskane wyniki bardzo dobrze korespondują z teorią i rezultatami przedstawionymi w pracy Maliwal i in. [17]. Co ważne również sygnał fluorescencji pochodzący od DyLight633 wzbudzonego w wyniku kaskadowego transferu energii jest duży. W wyniku porównania powierzchni pasm emisji DyLight405 i DyLight633 w widmie wyznakowanego peptydu oszacowano wydajność kwantową Triada-pep w paśmie emisji akceptora. Z przeprowadzonego szacowania wynika, iż wydajność kwantowa emisji promieniowania akceptora w Triada-pep wzbudzonego w wyniku dwuetapowego transferu energii jest \geq QY wolnego DyLight633, co również jest zgodne z wynikami przedstawionymi w pracy Maliwal i in. [17].

Podsumowanie

Do najważniejszych osiągnięć w ramach przeprowadzonych badań należą:

- Opracowany nowy program FFit jest wyjątkowym i uniwersalnym narzędziem pozwalającym na korektę wyników czasowo-rozdzielczych i otrzymanie zaniku transferującego donora w próbce. Program FFit oprócz czasów życia transferującego i nietransferującego donora podaje informację jaki procent z populacji wszystkich molekuł donora w próbce bierze udział w transferze energii.
- Dowiedziono, że samo dołączenie znacznika fluorescencyjnego do łańcucha biomolekuły powoduje ograniczenie jego rotacji przez co nie jest możliwe uzyskanie izotropowego rozkładu momentów przejść D i A nawet w roztworach wodnych. Skutkiem tego jest pojawienie się sygnału fluorescencji od molekuł donora, które nie biorą udziału w bezpromienistym transferze energii. Udowodniono również, że ilość cząsteczek D niebiorących udziału w FRET zależy od lepkości medium, długości łańcucha peptydowego oraz miejsca dołączenia fluoroforu do biomolekuły. Wzrost lepkości rozpuszczalnika ogranicza swobodę rotacji znaczników, w wyniku czego wzrasta populacja nietransferujących cząsteczek D. Dodatkowo wzrost lepkości spowalnia dynamikę zmian konformacyjnych łańcucha głównego biomolekuły.

- Wykazano, że cyklodekstryny mogą być stosowane jako modele hydrofobowej wnęki cząsteczki „gospodarza” np. dużego białka. Dokowanie peptydu do wnęki cząsteczki „gospodarza” może w znaczący sposób zmieniać właściwości spektroskopowe znaczników a w szczególności wartość R_0 , w znaczącym stopniu utrudnia uzyskanie izotropowego rozkładu momentów przejść D i A oraz wpływa na możliwość przyjmowania przez łańcuch peptydowy określonych konformacji.
- Powolne sieciowanie wielocząsteczkowego alkoholu poliwinylowego utrwala w matrycy główne konformacje peptydów a obliczone dla nich średnie odległości międzychromoforowe różnią się w niewielkim stopniu od tych uzyskanych dla roztworów wodnych. Wyciąganie matrycy PVA powoduje zmiany populacji poszczególnych konformerów oraz preferowane orientowanie się peptydu wzdłuż osi rozciągania. Matryca polimerowa w bardzo znacznym stopniu utrudnia osiągnięcie izotropowego rozkładu momentu przejść D i A, w wyniku czego dla peptydów obserwowano duży udział nietransferującego donora w zaniku fluorescencji.
- Zastosowanie dwuetapowego transferu energii pomiędzy trzema różnymi znacznikami otwiera nowe możliwości badań biomolekuł. Udowodniono, iż odpowiedni dobór znaczników pozwala na odsunięcie się z obserwacją o ponad 250 nm w stosunku do długości fali wzbudzającej. Kaskadowy transfer energii pozwala na badanie o wiele dłuższych łańcuchów peptydowych niż przy zastosowaniu klasycznego transferu pomiędzy dwoma molekułami D i A. Wykazano, że użycie długożyciowego fluoroforu, jako mediatora, pozwala znacząco wydłużyć czas życia akceptora a jego wydajność emisji promieniowania przy kaskadowym wzbudzeniu będzie, co najmniej tak duża jak w przypadku bezpośredniego wzbudzenia.

Literatura

1. Dos Remedios C.G., Moens P.D.J. 1995. *Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable “ruler” for measuring structural changes in proteins*. Journal of Structural Biology, 115: 175-185.
2. Bojarski P., Kulak L., Walczewska-Szewc K., Synak A., Marzullo V.M., Luini A., D’Auria S. 2011. *Long-distance FRET analysis: a Monte Carlo simulation study*. Journal of Physical Chemistry B, 115: 10120–10125.
3. Maliwal B.P., Raut S., Fudala R., D’Auria S., Marzullo V.M., Luini A., Gryczynski I., Gryczynski Z. 2012. *Extending Förster resonance energy transfer measurements beyond 100 Å using common organic fluorophores: enhanced transfer in the presence of multiple acceptors*. Journal of Biomedical Optics, 17: 011006 (8 stron).
4. Faiz J.A., Williams R.M., Pereira Silva M.J.J., De Cola L., Pikramenou Z. 2006. *A unidirectional energy transfer cascade process in a ruthenium junction self-assembled by α - and β -cyclodextrins*. Journal of the American Chemical Society, 128: 4520-4521.

5. Chen H.H., Ho Y.-P., Jiang X., Mao H.-Q., Wang T.-H., Leong K.W. 2009. *Simultaneous non-invasive analysis of DNA condensation and stability by two-step QD-FRET*. Nano Today, 4: 125-134.
6. Xu Q.-H., Wang S., Korystov D., Mikhailovsky A., Bazan G.C., Moses D., Heeger A.J. 2005. *The fluorescence resonance energy transfer (FRET) gate: a time-resolved study*. PNAS, 102: 530-535.
7. Ter Braak C.J.T. 2006. *A Markov Chain Monte Carlo version of the genetic algorithm Differential Evolution: easy Bayesian computing for real parameter spaces*. Statistics and Computing, 16: 239-249.
8. Garcia-Echeverria C., Rich D.H. 1992. *New intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrates for the study of the kinetic specificity of papain*. FEBS Letters, 297: 100-102.
9. Szabelski M., Rogiewicz M., Wiczak W. 2005. *Fluorogenic peptide substrates containing benzoxazol-5-yl-alanine derivatives for kinetic assay of cysteine proteases*. Analytical Biochemistry, 342: 20-27.
10. Cheung H.C. 2002. *Resonance energy transfer*. Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 2: Principles, pod edycją Lakowicz J.R., Plenum Press, New York: 127-176.
11. Takahashi Y. 1997. *Neutron structure analysis of poly(vinyl alcohol)*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 35: 193-198.
12. Pacansky J., Schneider S. 1990. *Electron beam chemistry in solid films of poly(vinyl alcohol): exposures under vacuum and under nitrogen at atmospheric pressure; irradiation monitored using infrared spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry, 94: 3166-3179.
13. Yamaura K., Kuranuki N., Suzuki M., Tanigami T., Matsuzawa S. 1990. *Properties of mixtures of silk fibroin/syndiotactic-rich poly(vinyl alcohol)*. Journal of Applied Polymer Science, 41: 2409-2425.
14. Schröder G.F., Alexiev U., Grubmüller H. 2005. *Simulation of fluorescence anisotropy experiments: probing protein dynamics*. Biophysical Journal, 89: 3757-3770.
15. Li J.K., Wang N., Wu X.S. 1998. *Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing-thawing process for protein/peptide drug delivery*. Journal of Controlled Release, 56: 117-126.
16. Patsialas K., Papaioannou E.H., Liakopoulou-Kyriakides M. 2012. *Encapsulation of the peptide Ac-Glu-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Trp-Lys-NH₂ into polyvinyl alcohol biodegradable formulations - effect of calcium alginate*. Carbohydrate Polymers, 87: 1112-1118.
17. Maliwal B.P., Gryczynski Z., Lakowicz J.R. 2001. *Long-wavelength long-lifetime luminophores*. Analytical Chemistry, 73: 4277-4285.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Pozostałe projekty naukowe, w których brałem udział i jestem współautorem publikacji oraz doniesień naukowych na konferencjach krajowych i zagranicznych prezentujących ich wyniki można podzielić na zasadnicze grupy tematyczne:

- Opracowanie metody syntezy i badania właściwości fizykochemicznych syntetycznych aminokwasów będących pochodnymi benzoksazolo-5-L-alaniny. Posiadanie części aminokwasowej czyni te fluorofory znakomitymi znacznikami peptydów i białek oraz umożliwia wbudowanie ich w dowolne miejsce w sekwencji aminokwasowej. Charakteryzują się one wysokimi wydajnościami kwantowymi a ich widma absorpcji i emisji leżą poza zakresem naturalnych fluoroforów. Opracowano i scharakteryzowano kilkanaście pochodnych benzoksazolo-5-L-alaniny, których właściwości różniły się w zależności od rodzaju podstawnika w pozycji 2.

- Badania wpływu polarności otoczenia oraz pH na właściwości fotofizyczne tyrozyny i jej prostych analogów metodami stacjonarnej i czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej. Metody pomiarowe zostały wsparte analizą globalną oraz obliczeniami teoretycznymi.
- Określenie wpływu różnych czynników na tworzenie kompleksów cyklodekstryn z naturalnymi i syntetycznymi aminokwasami oraz krótkimi peptydami. W trakcie badań określono stechiometrię i stałe trwałości powstających kompleksów typu „gość-gospodarz”. Do analizy danych wykorzystano między innymi analizę globalną zaników fluorescencji w czasie.
- Charakterystyka wybranych proteaz cysteinowych – zbadanie wpływu rozpuszczalników organicznych na aktywność enzymatyczną, znalezienie i charakterystyka wydajnie hydrolizowanych specyficznych substratów tych enzymów.
- Opracowanie nowych materiałów luminescencyjnych na bazie kserożeli krzemionkowych domieszkowanych związkami metali ziem rzadkich. Dokonano pełnej charakterystyki spektralnej nowych materiałów technikami stacjonarnej i czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej. Zbadano również bezpromienisty transfer energii pomiędzy poszczególnymi składnikami matryc.
- Podstawione w pozycji *para* pochodne N,N-dimetyloaniliny jako potencjalne sensory pH. Wykonano badania metodami stacjonarnej i czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej szeregu pochodnych, dokonano pełnej charakterystyki spektroskopowej oraz na podstawie krzywych miareczkowania wyznaczono stałe pKa
- Badania transferu i migracji energii w matrycach polimerowych. Szereg zestawów fluoroforów zostało umieszczone w niewyciągniętych i kilkakrotnie rozciągniętych matrycach alkoholu poliwinylowego. Wpływ matrycy PVA i osiowego zorientowania molekuł fluoroforów na proces przekazywania energii został określony z zastosowaniem stacjonarnej i czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej. Uzyskane wyniki przeanalizowano z wykorzystaniem symulacji *Monte Carlo*.
- Poznanie właściwości naturalnych związków biologicznych, takich jak sprzężone kwasy tłuszczowe i hipercyna, istotnych z punktu widzenia zdrowia i diety człowieka. Do badań wykorzystano stacjonarne i czasowo-rozdzielcze techniki fluorescencyjne. Wyniki eksperymentalne zostały uzupełnione symulacjami dynamiki molekularnej.

- Krótko-życiowe standardy fluorescencyjne do czasowo-rozdzielczej spektroskopii i mikroskopii, pozwalające na rejestrację funkcji odpowiedzi aparaturowej (IRF) w wybranym przedziale widmowym.
- Właściwości spektroskopowe wybranych zasad azapurynowych. Zbadano procesy tautomerii i transferu protonu w wstanie wzbudzonym z wykorzystaniem stacjonarnej i czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej.
- Synteza i badania właściwości dinukleotydów analogów cap wyznakowanych poprzez dołączenie kwasu antranilowego lub N-metyloanthranilowego do rybozy w 7-metyloguanozynie, które zostały zaprojektowane do otrzymywania fluorescencyjnych mRNA poprzez transkrypcję *in vitro*. W celu oceny użyteczności tych związków do badań oddziaływań z białkami wiążącymi cap i procesów komórkowych związanych z cap, określono zarówno biologiczne jak i spektroskopowe właściwości tych związków.
- Nowy znacznik fluorescencyjny o długim czasie życia i emisji w zakresie czerwieni do badań dużych biomolekuł. Długi czas życia w stanie wzbudzonym wykorzystano do określenia czasu korelacji wielkocząsteczkowych przeciwciał i ich kompleksów z króliczą immunoglobuliną G metodami stacjonarnej i czasowo-rozdzielczej anizotropii fluorescencji.

6. Dane bibliometryczne.

W skład mojego dorobku naukowego wchodzi: jedna monografia, 34 publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, 2 publikacje naukowe z poza bazy JCR.

Sumaryczny *impact factor* według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: **69,773**

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science: **331**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **13**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: **796**

Maciej Szabelski