

## Popularnonaukowe streszczenie projektu

Białka fluorescencyjne wyróżniają się spośród innych zdolnością do absorpcji światła o odpowiedniej długości fali i następującej emisji światła. Z tego powodu, występujące naturalnie białka fluorescencyjne są odpowiedzialne m.in. za komunikację między organizmami lub odstraszenie drapieżników. Ta niebywała zdolność do pochłaniania i emitowania światła jest również wykorzystywana we współczesnej chemii i biologii do wizualizacji różnych procesów zachodzących w żywych komórkach, tkankach, a nawet całych organizmach.

„Sercem” każdego białka fluorescencyjnego odpowiedzialnym za absorpcję i emisję światła jest chromofor. Jest to zestaw zmodyfikowanych aminokwasów, który powstaje w wyniku reakcji katalizowanych przez jego białkowe otoczenie. Co więcej, otoczenie chromoforu jest kluczowym elementem odpowiedzialnym za jego właściwości spektralne (intensywność absorpcji oraz emisji światła, a także długości fal przy których intensywność ta jest maksymalna), strukturalne i fizykochemiczne.

W związku z silnym wpływem otoczenia chromoforu na wymienione właściwości spektralne, możliwe jest projektowanie i otrzymywanie białek fluorescencyjnych o pożądanym widmie absorpcyjnym i emisyjnym poprzez wprowadzenie odpowiednich mutacji w sekwencji aminokwasowej białka. Dotychczas, badania eksperymentalne doprowadziły do powstania całej gamy białek fluorescencyjnych, których widma absorpcji i emisji pokrywają cały zakres widzialny, a także bliski nadfiolet i bliską podczerwień.

Jednym z nowoczesnych kierunków rozwoju białek fluorescencyjnych jest wykorzystanie ich w dwufotonowej mikroskopii fluorescencyjnej. Technika ta wykorzystuje zjawisko pochłaniania nie jednego, ale dwóch fotonów, których jednak energia jest dwa razy mniejsza niż jednego fotonu. Zjawisko to pozwala na wizualizację wybranych cząstek i procesów w żywych tkankach i organizmach przy znacznie mniejszym wpływie na badany układ niż w przypadku zastosowania metod wykorzystujących absorpcję jednofotonową. Co więcej, mikroskopia dwufotonowa pozwala na otrzymanie obrazów o znacznie polepszonej rozdzielczości i kontraście.

Obecnie, białka fluorescencyjne wydają się być dobrze scharakteryzowane pod względem właściwości jednofotonowych. Jednakże, w przypadku intensywności absorpcji dwufotonowej, dane eksperymentalne otrzymane różnymi technikami różnią się nawet o dwa rzędy wielkości. Co więcej wpływ białkowego otoczenia chromoforu na szybkość jego formacji jest zazwyczaj nieznaną, więc określenie stężenia funkcjonalnego białka fluorescencyjnego może być trudne. Z powodu trudności napotykaną podczas pomiarów eksperymentalnych, konieczne jest wykorzystanie metod chemii teoretycznej, aby otrzymać konsistentne i niezależne od innych czynników wyniki. Co więcej, opisanie wpływu białkowego otoczenia chromoforu na jego właściwości absorpcyjne jest najbardziej przekonujące dzięki wspólnej analizie wyników pomiarów eksperymentalnych i obliczeń teoretycznych.

Celem niniejszego projektu jest systematyczne scharakteryzowanie wpływu białkowego otoczenia chromoforu na jego właściwości spektralne, a w szczególności intensywność absorpcji dwufotonowej. Zgodnie z danymi literaturowymi, otoczenie chromoforu wpływa na intensywność absorpcji dwufotonowej w znacznie większej mierze niż na intensywność absorpcji jednofotonowej. Kluczowe jest więc zrozumienie czynników odpowiedzialnych za wysoką wartość przekroju na absorpcję dwufotonową, aby w sposób ukierunkowany projektować i otrzymywać białka fluorescencyjne do wykorzystania w mikroskopii dwufotonowej.

Badania będą opierały się na wykorzystaniu tzw. techniki hybrydowej, w której część białka odpowiedzialna za absorpcję światła jest opisywana za pomocą mechaniki kwantowej (QM, ang. quantum mechanics), a reszta układu za pomocą mechaniki molekularnej (MM, ang. molecular mechanics). Najpierw wykonane zostaną obliczenia mające na celu wybranie najbardziej optymalnej metodologii QM w sensie jakości otrzymywanych wyników oraz potrzebnego czasu i zasobów obliczeniowych. Następnie, chromofor wraz z resztami aminokwasowymi oraz cząsteczkami wody z najbliższego otoczenia opisywany będzie kwantowo-mechanicznie, aby jak najdokładniej opisać wpływ otoczenia na właściwości spektralne. Następnie wykonamy dekompozycję energii oddziaływania chromoforu z resztami aminokwasowymi otoczenia na wkład od poszczególnych reszt. W ten sposób uzyskany zostanie jakościowy lub półilościowy obraz oddziaływań białkowego otoczenia na właściwości spektralne chromoforu. W kolejnym etapie, wybrane reszty aminokwasowe zostaną zastąpione innymi, a efekty tych mutacji zbadane pod kątem wpływu na właściwości spektralne. Takie systematyczne badania pozwolą na lepsze zrozumienie relacji właściwości spektralne – otoczenie chromoforu, co pozwoli w przyszłości na racjonalne projektowanie nowych białek fluorescencyjnych. Co więcej, na podstawie wyników obliczeń, zaproponowane zostaną nowe białka fluorescencyjne, w szczególności mające wysoką wartość przekroju na absorpcję dwufotonową.

Efektym końcowym projektu będzie zaproponowanie procedury otrzymywania nowych białek fluorescencyjnych, opartej o przewidywanie ich właściwości na podstawie badań metodami modelowania molekularnego. Podejście takie znacząco przyspieszy i zwiększy wydajność otrzymywania nowych znaczników.