



Uniwersytet
Wrocławski

Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego

Jacek Otlewski

Wrocław, 4 czerwca 2012

Zakład Inżynierii Białka

Charakterystyka oddziaływania białko-ligand

Analiza stabilności białka

Otrzymywanie rekombinowanych białek (w systemach bakteryjnych oraz ssaczych)

Inżynieria białka:

- projektowanie stabilnych białek

- konstrukcja białek o nowych właściwościach

Określanie struktur przestrzennych białek

Selekcja bibliotek specyficznie wiążących cele molekularne

- przeciwciała

- alternatywne motywy

- aptamery

Bionanotechnologia:

- otrzymywanie bionanocząstek na bazie tlenków metali opłaszczonych złotem

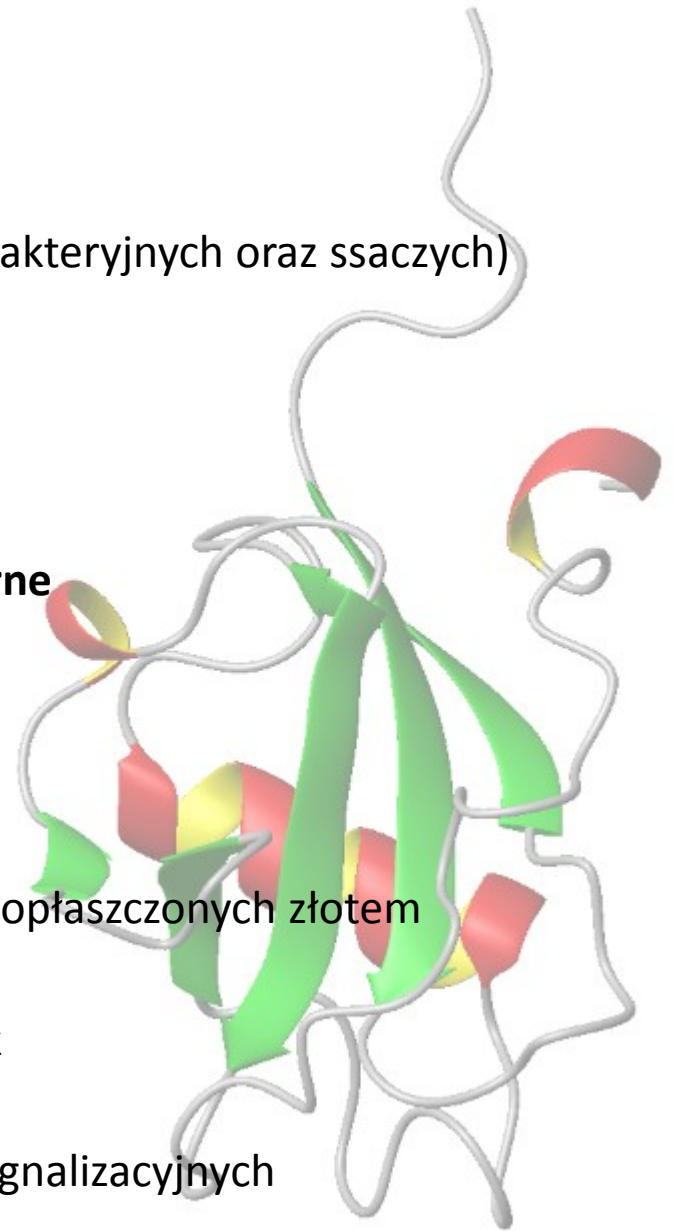
- opłaszczanie nanocząstek modyfikowanymi polimerami

- przyłączanie związków cytotoksycznych do nanocząstek

Badania z użyciem linii komórkowych:

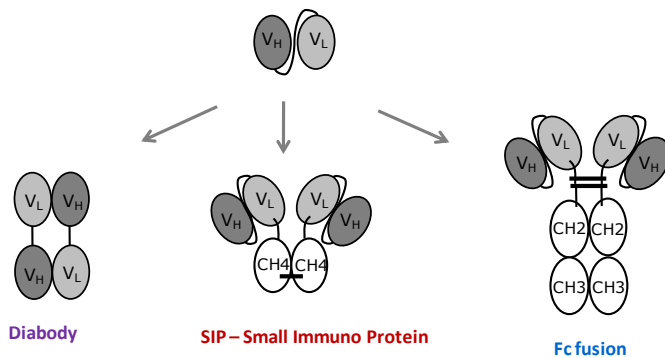
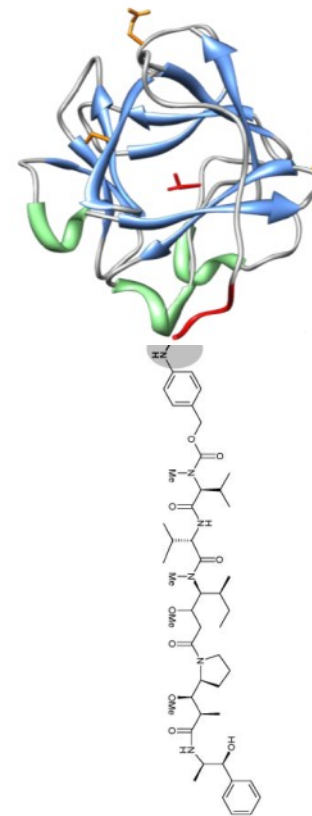
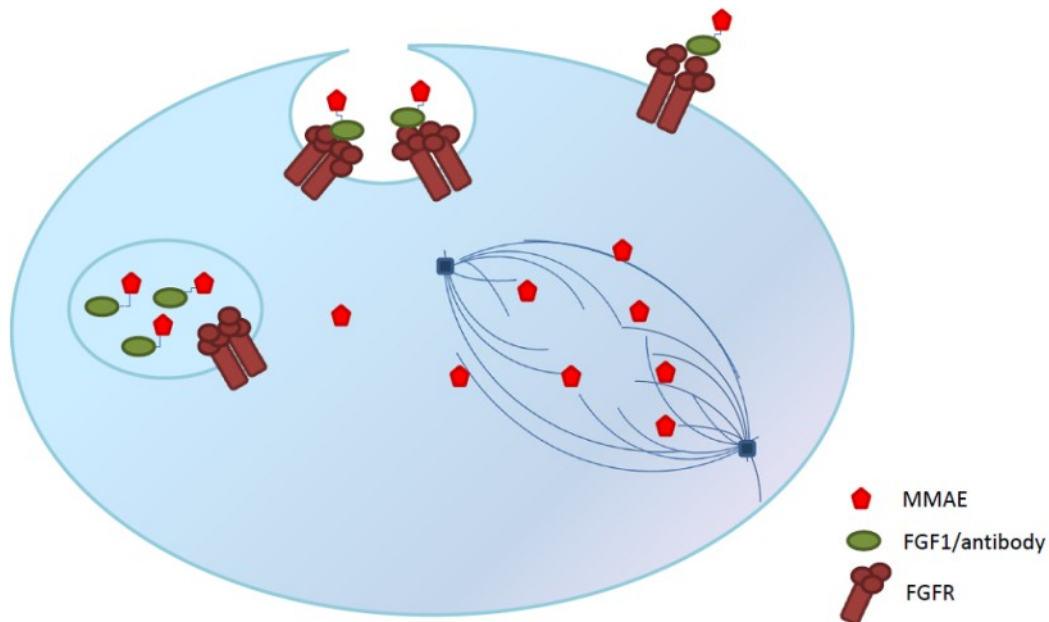
- analiza cytotoksyczności, procesu apoptozy, szlaków sygnalizacyjnych

- siRNA, stabilne oraz przejściowe tranfekcje, TAP-TAG



Zakład Inżynierii Białka

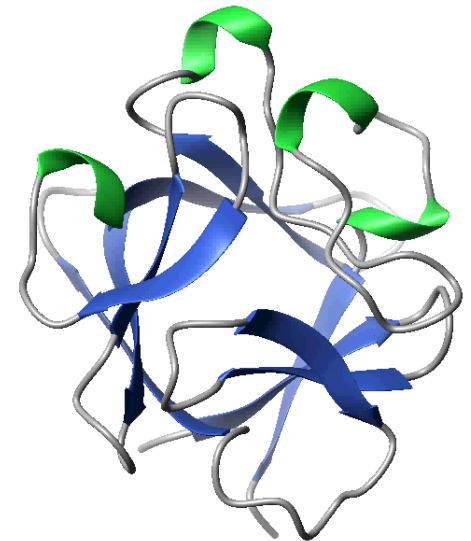
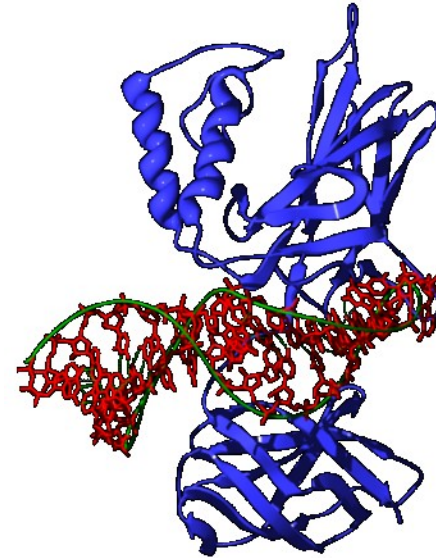
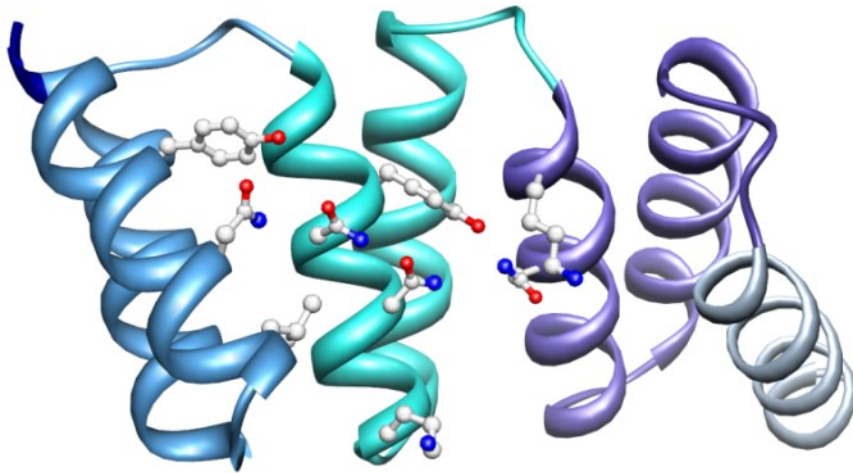
Cytotoksyczne koniugaty, oparte o fibroblastyczny czynnik wzrostu 1 (FGF1) lub specyficzne przeciwciała, celujące w nowotwory nadprodukujące receptory FGF



Zakład Inżynierii Białka

Selekcja bibliotek specyficznie wiążących markery procesów nowotworowych:

- przeciwciała (FGFR 1-4, FSHR)
- alternatywne motywy (S100A13, HSP90, HER2)
- aptamery (HER2, Mdm2, FGFR 1-4)



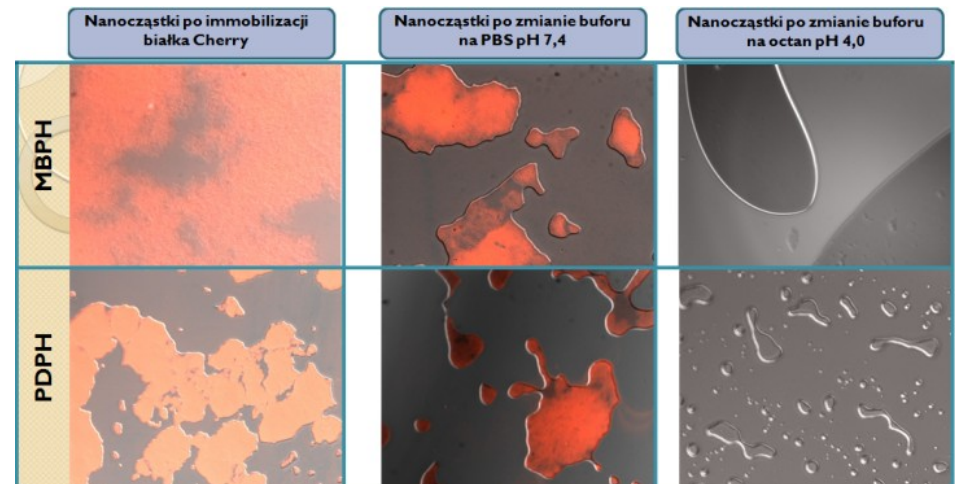
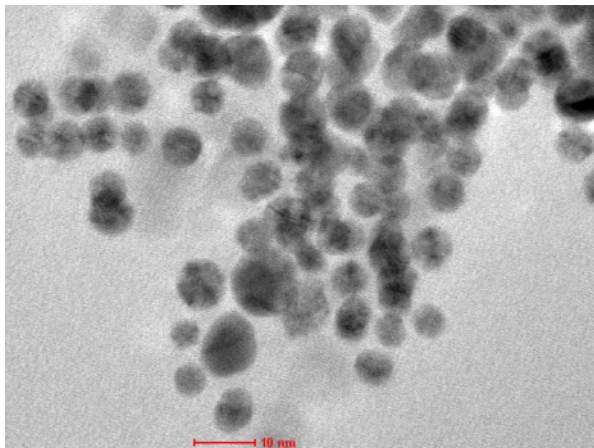
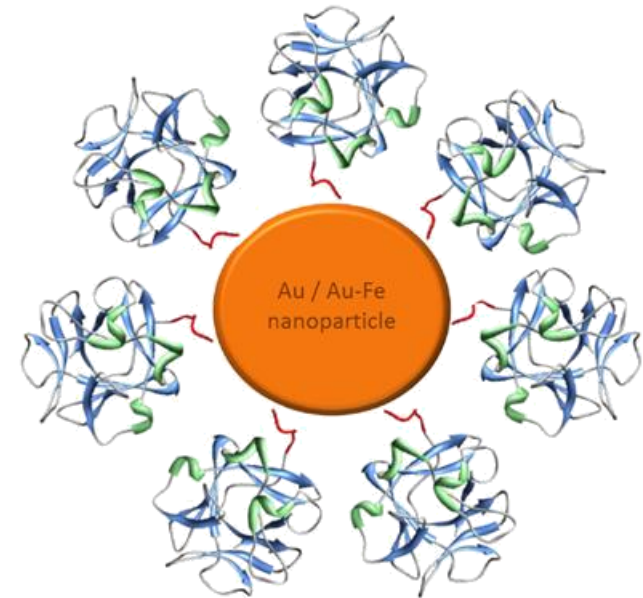
Białka oddziałujące z FGF1 i FGF2 (*Fibroblast Growth Factor*)
Zastosowanie FGF1 i FGF2 w leczeniu ran przewlekłych

Zakład Inżynierii Białka

Otrzymywanie i charakterystyka bionanomateriałów do specyficznych zastosowań medycznych

Otrzymanie oraz charakterystyka nanocząstek o właściwościach superparamagnetycznych na bazie tlenków żelaza opłaszczonych złotem oraz związkami funkcyjnymi

Opracowanie funkcjonalnej bionanocząstki celem zastosowania w systemie rozpoznawania markera molekularnego oraz dostarczanie substancji aktywnej



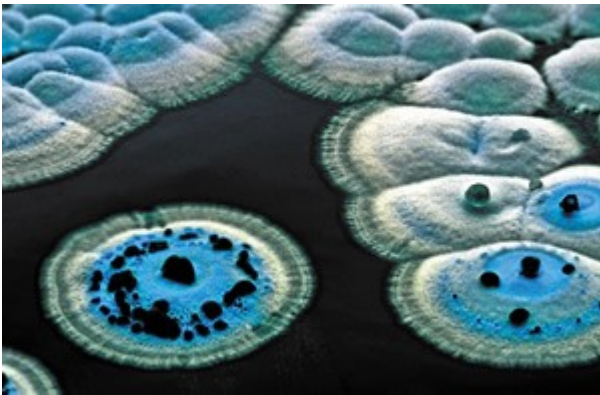
Zakład Mikrobiologii Molekularnej

Tematyka badawcza:

Kluczowe etapy cyklu komórkowego bakterii - replikacja, segregacja chromosomów oraz podział komórkowy – na przykładzie promieniowców rodzaju *Streptomyces* i *Mycobacterium*.

Zastosowanie przemysłowe *Streptomyces* jako producentów metabolitów wtórnych w tym antybiotyków nadaje znaczenie praktyczne badaniom nad biologią tych mikroorganizmów.

Natomiast analiza białek cyklu komórkowego *Mycobacterium* stanowi podstawę do poszukiwania potencjalnych celów dla antybiotyków.



Zakład Mikrobiologii Molekularnej

Stosowane techniki:

Analiza ekspresji genów: S1 mapowanie, real-time PCR, geny reporterowe.

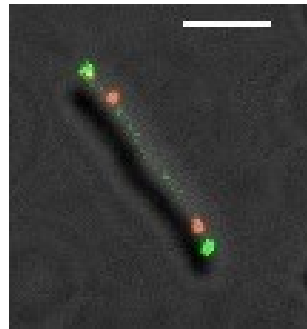
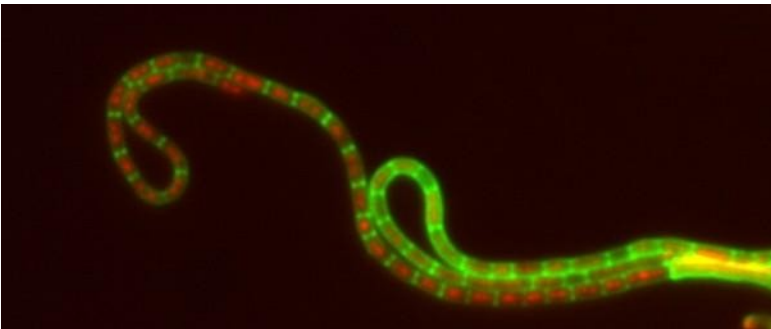
Konstrukcja i analiza zmutowanych szczepów bakteryjnych: mutanty punktowe, delecje, geny fuzyjne.

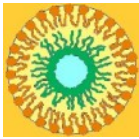
Oczyszczanie białek i analiza oddziaływań międzycząsteczkowych:

Białko-białko, białko –DNA: bakteryjne systemy jedno- i dwuhybrydowe, ChiP-seq, chromatografia powinowactwa, DNaseI footprinting, EMSA, SPR

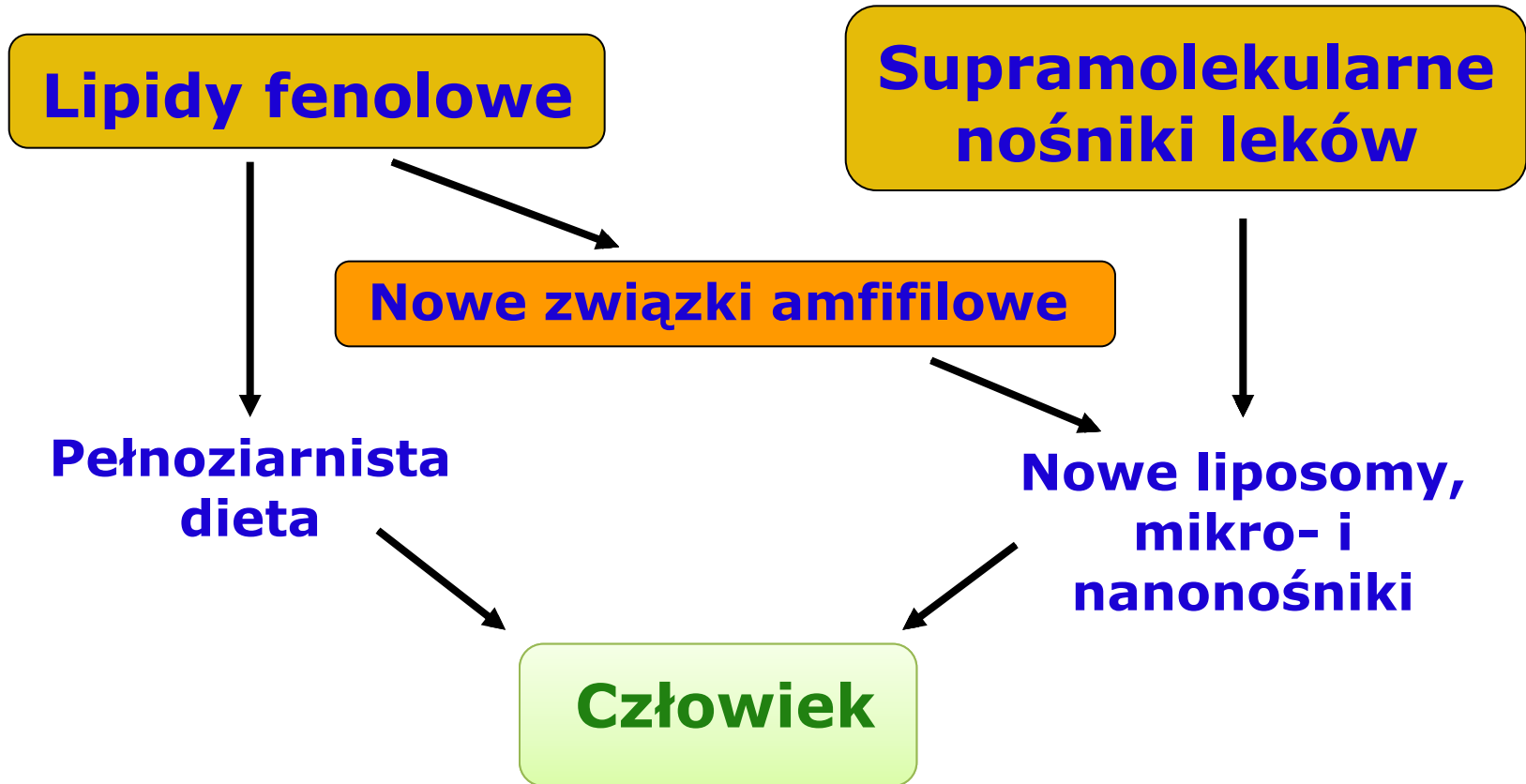
Biologia komórkowa i mikroskopia fluorescencyjna:

lokalizacja wewnątrzkomórkowa białek i ich kompleksów w czasie rzeczywistym.





Tematyka i jej powiązania



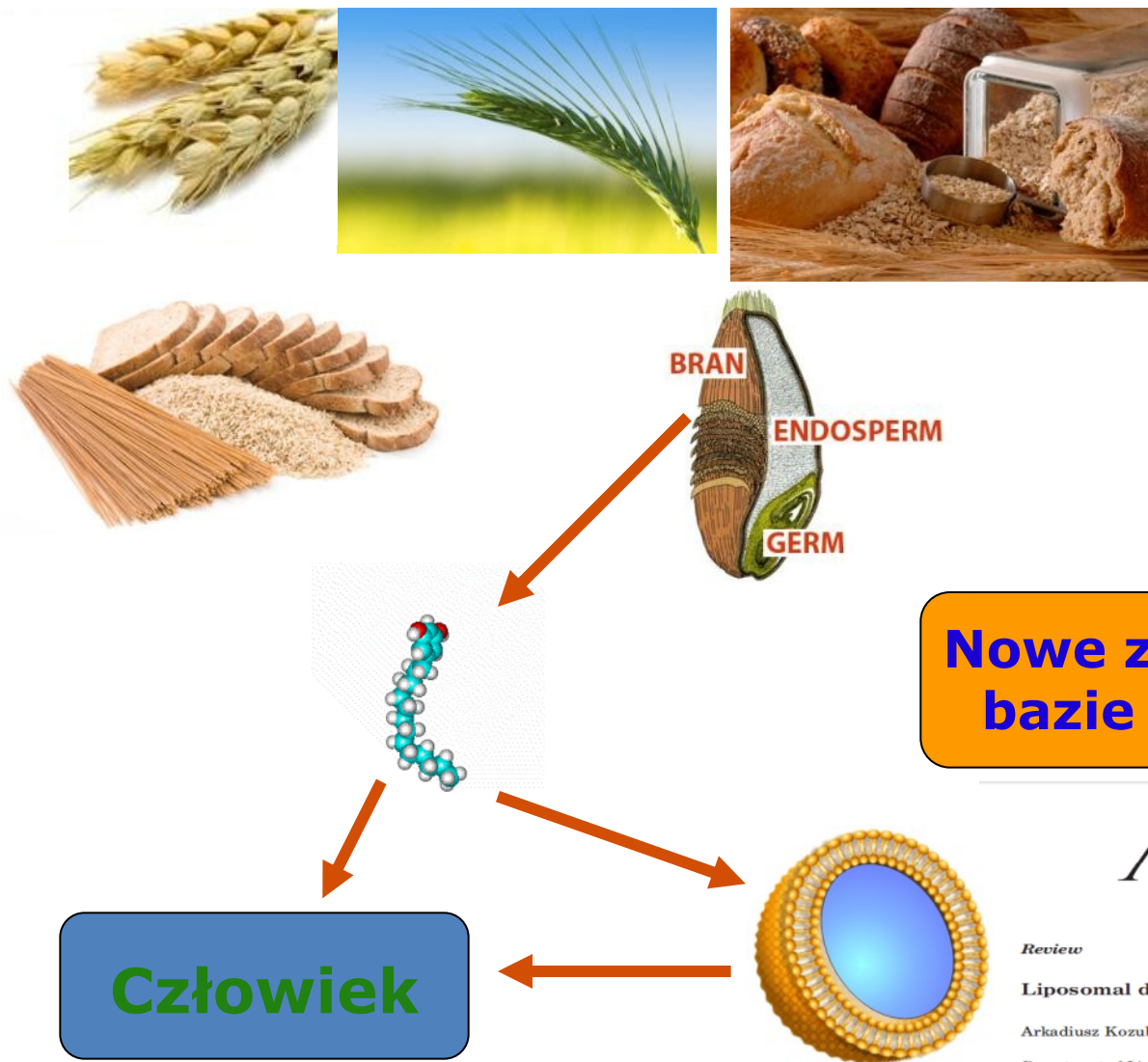


Zakład Lipidów i Liposomów

Lipidy fenolowe

Regularne spożywanie tzw. produktów pełnoziarnistych obniża o ok. 30% ryzyko choroby wieńcowej oraz pewnych nowotworów, szczególnie jelita grubego a także otyłości i chorób z nią związanych, szczególnie cukrzycy typu II.

Badania roli lipidów fenolowych



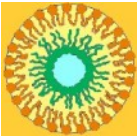
Nowe związki amfifilowe na bazie lipidów fenolowych

Acta
Biochimica
Polonica

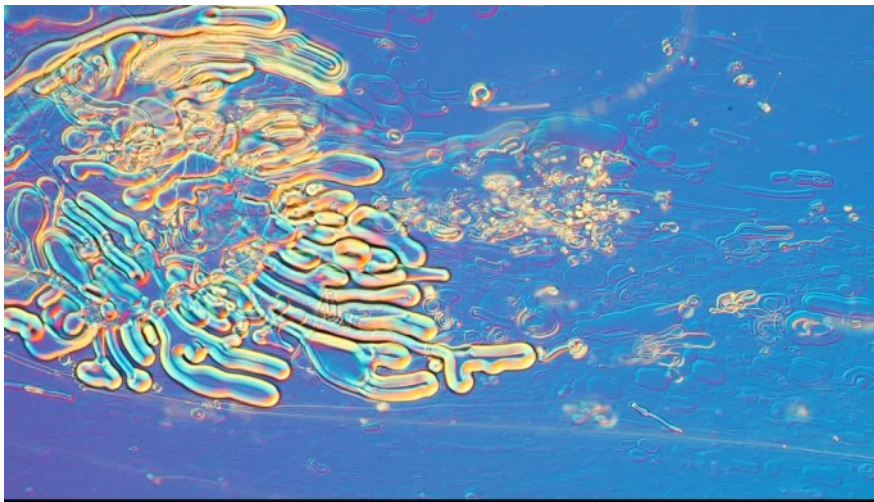
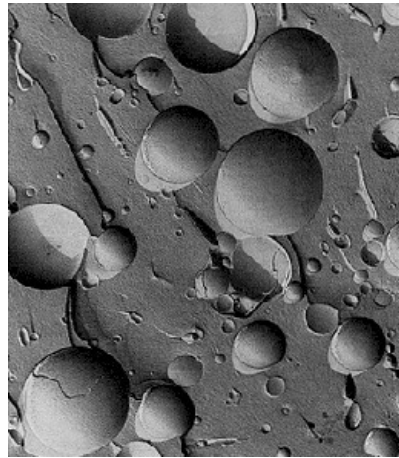
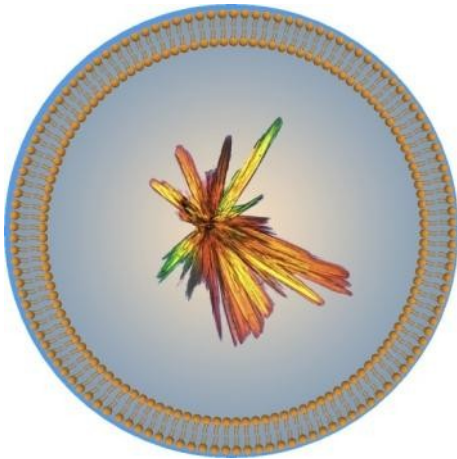
Vol. 47 No. 3/2000
639-649
QUARTERLY

Review
Liposomal drug delivery, a novel approach: PLARosomes*^o

Arkadiusz Kozubek^o, Jerzy Gubernator, Ewa Przeworska and Maria Stasiuk
Department of Lipids and Liposomes, Institute of Biochemistry and Molecular Biology,
University of Wrocław, St. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław, Poland

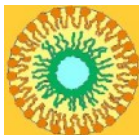


Zakład Lipidów i Liposomów



Supramolekularne nośniki leków





Nasze patenty (A1)

Supramolekularne nośniki leków

COMPOUND LIPIDES FOR MANUFACTURING LIPOSOMES

| | | | | | | |
|---|--|---|------------|--------------------------------------|--|-------------------------------------|
| ★ | Inventor: GRZYBEK MICHAŁ [PL] WYROZUMSKA PAULINA [PL] (+4) | Applicant: UNIV WROCLAWSKI [PL] | EC: | IPC: A61K8/14 A61K9/127 | Publication info: PL372683 (A1) 2006-08-21 PL196966 (B1) 2008-02-29 | Priority date: 2005-10-10 |
|---|--|---|------------|--------------------------------------|--|-------------------------------------|

LIPOSOME PREPARATION OF A SUBSTANCE COUNTERACTING CANCER, METHOD FOR ITS MANUFACTURE AND PHARMACEUTICAL COMPOUND CONTAINING SUCH PREPARATION

| | | | | | | |
|---|---|---|------------|---|--|-------------------------------------|
| ★ | Inventor: KOZUBEK ARKADIUSZ [PL] GRYNKIEWICZ GRZEGORZ [PL] (+5) | Applicant: INST FARMACEUTYCZNY [PL] | EC: | IPC: A61K31/337 A61K47/16 A61K9/127 (+1) | Publication info: PL368029 (A1) 2005-11-28 PL197939 (B1) 2008-05-30 | Priority date: 2004-05-17 |
|---|---|---|------------|---|--|-------------------------------------|

ANTI-CANCER LIPOSOME PREPARATION, METHOD FOR ITS MANUFACTURE AND COMPOUND PHARMACEUTICAL CONTAINING SUCH PREPARATION

| | | | | | | |
|---|---|---|------------|---|--|-------------------------------------|
| ★ | Inventor: KOZUBEK ARKADIUSZ [PL] GRYNKIEWICZ GRZEGORZ [PL] (+5) | Applicant: INST FARMACEUTYCZNY [PL] | EC: | IPC: A61K31/337 A61K47/12 A61K9/127 (+1) | Publication info: PL364657 (A1) 2005-08-08 PL197939 (B1) 2008-05-30 | Priority date: 2004-01-30 |
|---|---|---|------------|---|--|-------------------------------------|

AGENT FOR PROTECTING FATS AGAINST OXIDATIVE DESTRUCTION

| | | | | | | |
|---|--|--|------------|--|--|-------------------------------------|
| ★ | Inventor: WITEK STANISLAW [PL] KOZUBEK ARKADIUSZ [PL] (+3) | Applicant: POLITECHNIKA WROCLAWSKA [PL] | EC: | IPC: A23D9/06 C07C69/612 (IPC1-7):A23D9/06 (+1) | Publication info: PL338760 (A1) 2001-09-10 PL195707 (B1) 2007-10-31 | Priority date: 2000-02-29 |
|---|--|--|------------|--|--|-------------------------------------|

LIPOID COMPOSITION FOR OBTAINING LIPOSOMES

| | | | | | | |
|---|---|---|------------|---|--|-------------------------------------|
| ★ | Inventor: GUBERNATOR JERZY [PL] KOZUBEK ARKADIUSZ [PL] | Applicant: UNIV WROCLAWSKI [PL] | EC: | IPC: A61K47/08 A61K9/127 (IPC1-7):A61K9/127 | Publication info: PL329424 (A1) 2000-05-08 PL188497 (B1) 2005-02-28 | Priority date: 1998-10-28 |
|---|---|---|------------|---|--|-------------------------------------|

LIPOSOMIC PREPARATION OF MITOXANTRONE, METHOD OF OBTAINING SUCH PREPARATION OF HIGH ENCAPSULATION DEGREE AND COMPOSITION CONTAINING SAME

| | | | | | | |
|---|---|---|------------|--|--|-------------------------------------|
| ★ | Inventor: GUBERNATOR JERZY [PL] KOZUBEK ARKADIUSZ [PL] (+1) | Applicant: INST FARMACEUTYCZNY [PL] | EC: | IPC: A61K31/135 A61K9/127 (IPC1-7):A61K9/127 | Publication info: PL328204 (A1) 2000-02-28 PL190078 (B1) 2005-10-31 | Priority date: 1998-08-24 |
|---|---|---|------------|--|--|-------------------------------------|

LIPOSOMIC PREPARATION OF DOXORUBICIN, METHOD OF OBTAINING SUCH PREPARATION OF HIGH ENCAPSULATION DEGREE AND ANTICARCINOGENIC PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAME

| | | | | | | |
|---|---|---|------------|--|--|-------------------------------------|
| ★ | Inventor: GUBERNATOR JERZY [PL] KOZUBEK ARKADIUSZ [PL] (+1) | Applicant: INST FARMACEUTYCZNY [PL] | EC: | IPC: A61K31/704 A61K9/127 (IPC1-7):A61K9/127 | Publication info: PL328203 (A1) 2000-02-28 PL190077 (B1) 2005-10-31 | Priority date: 1998-08-24 |
|---|---|---|------------|--|--|-------------------------------------|

Współpraca



University of Mato Grosso



INSTYTUT FARMACEUTYCZNY



Dublin, Ireland



Wrocławskie
Centrum
Badań



WROCLAWSKIE LABORATORIA
AGREGATÓW LIPODOWYCH

Tematyka badawcza Zakładu Biochemii

1. Przystawanie żelaza i hemu przez bakterie *Porphyromonas gingivalis* oraz oddziaływanie bakterii *P. gingivalis* z komórkami gospodarza (kierownik projektu: dr hab. Teresa Olczak)
2. Transportery nukleotydo-cukrów i ich udział w procesie glikozylacji (kierownik projektu: prof. dr hab. Mariusz Olczak)
3. Roślinne kwaśne fosfatazy (kierownik projektu: prof. dr hab. Mariusz Olczak)
4. Toksyny drożdży (kierownik projektu: prof. dr hab. Wiesław Wątopek)

Aparatura

1. Zestawy FPLC, HPLC
2. Spektrofotometry
3. Wirówki, ultrawirówki
4. Licznik scyntylicyjny
5. Termocyklery do PCR i real-time PCR
6. Chromatograf gazowy
7. Pracownia hodowli komórkowych

Finansowanie badań

1. Projekt badawczy (własny) MNiSW nr: N N303 518438 „Oddziaływanie białka HmuY z bakterii *Porphyromonas gingivalis* z komórkami gospodarza - poznanie mechanizmu wstępem do opracowania testu diagnostycznego i składnika szczepionki przeciwko przewlekłym periodontopatiom” (2010-2012) – kierownik projektu
2. Projekt „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne – BioMed” (POIG 01.01.02-02-003/08-00), Wrocławskie Centrum Badań EIT+, Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, Działanie 1.1.2, Zadanie III.3: „Wykorzystanie mechanizmów przyswajania żelaza i hemu przez bakterie *Porphyromonas gingivalis* w zapobieganiu i leczeniu periodontopatii” (2009-2014) – kierownik zadania
3. Projekt badawczy (własny) MNiSW nr: N301 012 32/0869 „Strukturalna i funkcjonalna analiza błonowych transporterów nukleotydo-cukrów jako regulatorów procesów glikozylacji w komórce” (2008-2010) – wykonawca
4. Projekt badawczy (własny) MNiSW nr: N303 014 32/0670 „Analiza strukturalna i funkcjonalna fosfataz/fosfodiesteraz PPD z łubinu żółtego” (2008-2009) – wykonawca

Współpraca naukowa Zakładu Biochemii z wrocławskimi ośrodkami naukowymi

1. Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego

dr Jacek Wojaczyński, prof. dr hab. Lechośław Latos-Grażyński

Tematyka: Charakterystyka bakteryjnych białek wiążących metaloporfiryny

Wojaczyński J, Połata H, Olczak T, **Latos-Grażyński L**: NMR study of heme binding to HmuY protein from *Porphyromonas gingivalis*. 9th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Wrocław, Poland, 2-6 September 2008. Streszczenia str. 323 (plakat)

Wójtowicz H, **Wojaczyński J**, Olczak M, Króliczewski J, **Latos-Grażyński L**, **Olczak T**: Heme environment in HmuY, the heme-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 383, 178-182

Wojaczyński J, Wójtowicz H, Bielecki M, Olczak M, Smalley JW, **Latos-Grażyński L**, **Olczak T**: Iron(III) mesoporphyrin IX and iron(III) deuteroporphyrin IX bind to the *Porphyromonas gingivalis* HmuY hemophore. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411, 299-304

2. Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

Dr Barbara Żarowska

Tematyka: Toksyny drożdży

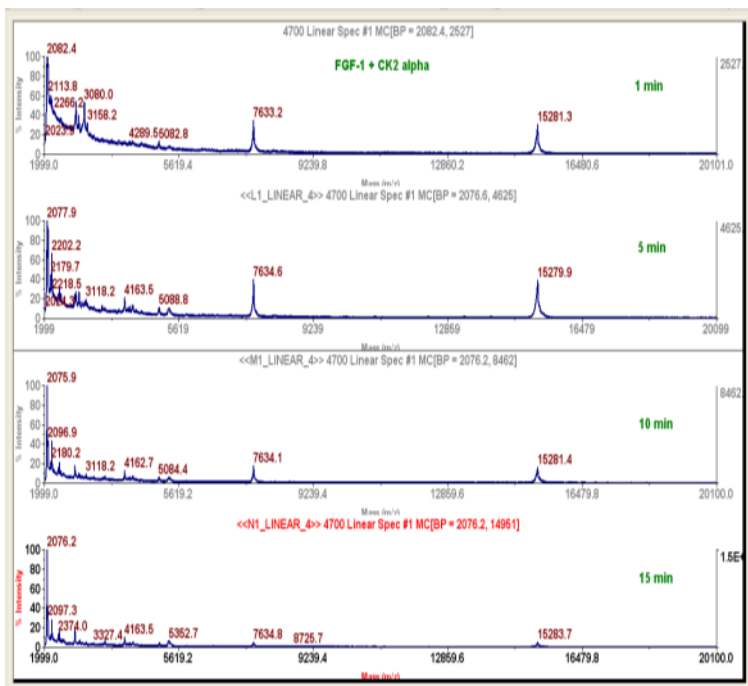
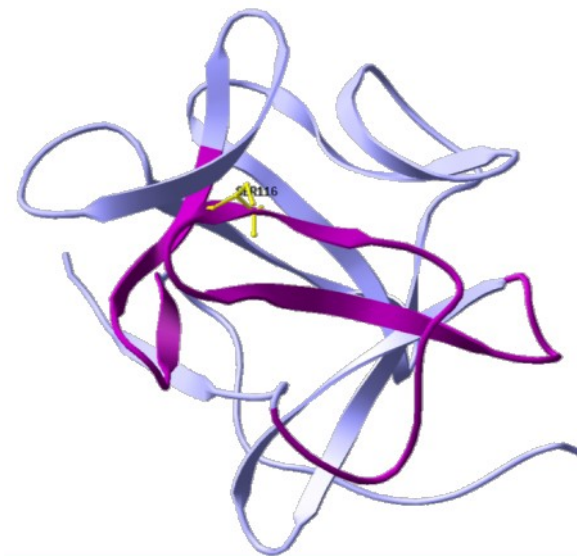
Żarowska B., Szalewicz A., Kłossowicz M., Wątopek W. Comparison of killer activity in selected *Debaryomyces hansenii* strains. 27th Annual Meeting of Polish Microbiological Society, Lublin 2012 (plakat)

Zakład Biotechnologii Białek

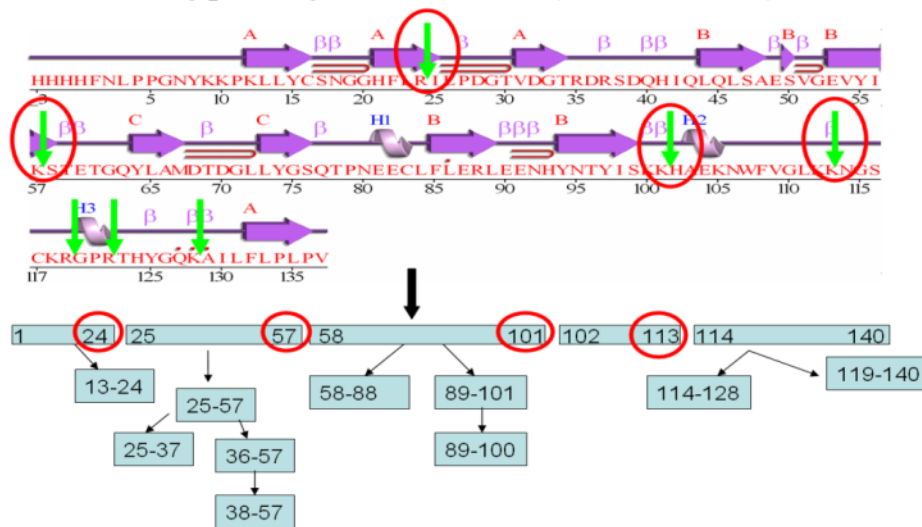
Projektowanie białek odpornych na degradację proteolityczną

Analiza modyfikacji potranslacyjnych białek

Badanie oddziaływania białko-ligand z użyciem spektrometrii mas



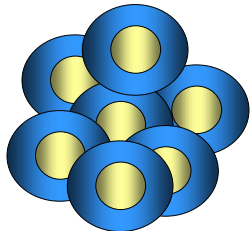
Trypsinolysis of FGF-1 (MALDI MS)



Zakład Biotechnologii Białek

Wywoływanie różnicowania komórek białaczkowych

Komórki ostrych
białaczek
szpikowych
z różnymi
mutacjami

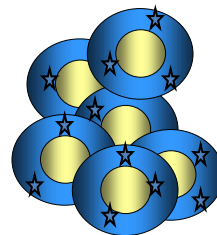


Linie komórkowe
oraz komórki
pacjentów

Analogi witamin
 D_2 i D_3 oraz
kwasu
retinowego



Różnicowanie się do
dojrzałych
fenotypów

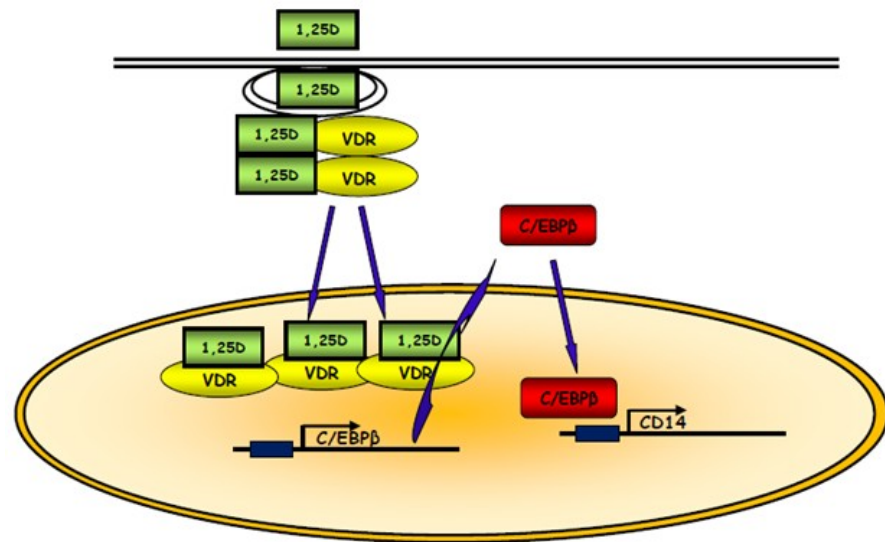
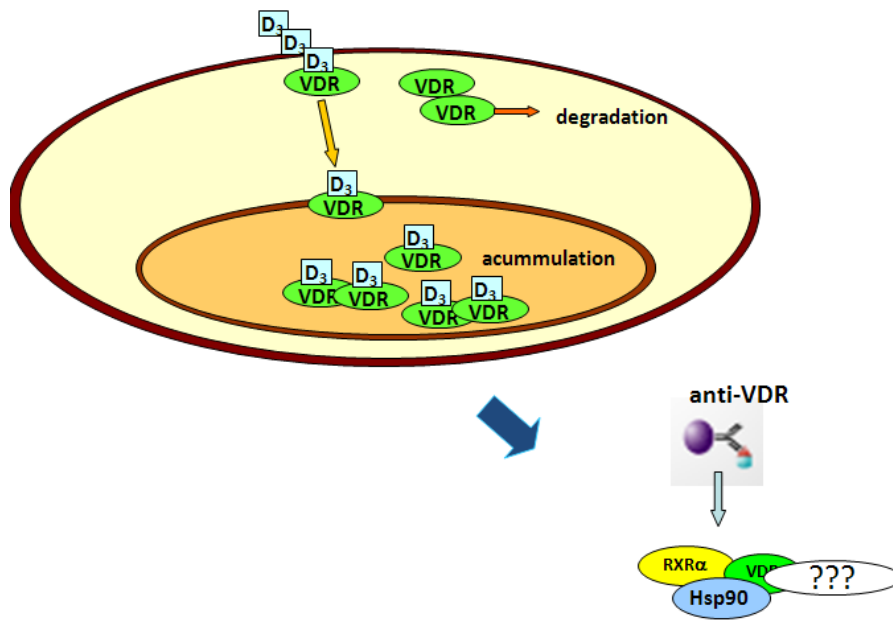


Badanie ekspresji wielu
genów zależnych od
receptora witaminy D i
receptora witaminy A

Zakład Biotechnologii Białek

Poszukiwanie białek oddziałujących z VDR (receptorem witaminy D) oraz poznanie ich funkcji

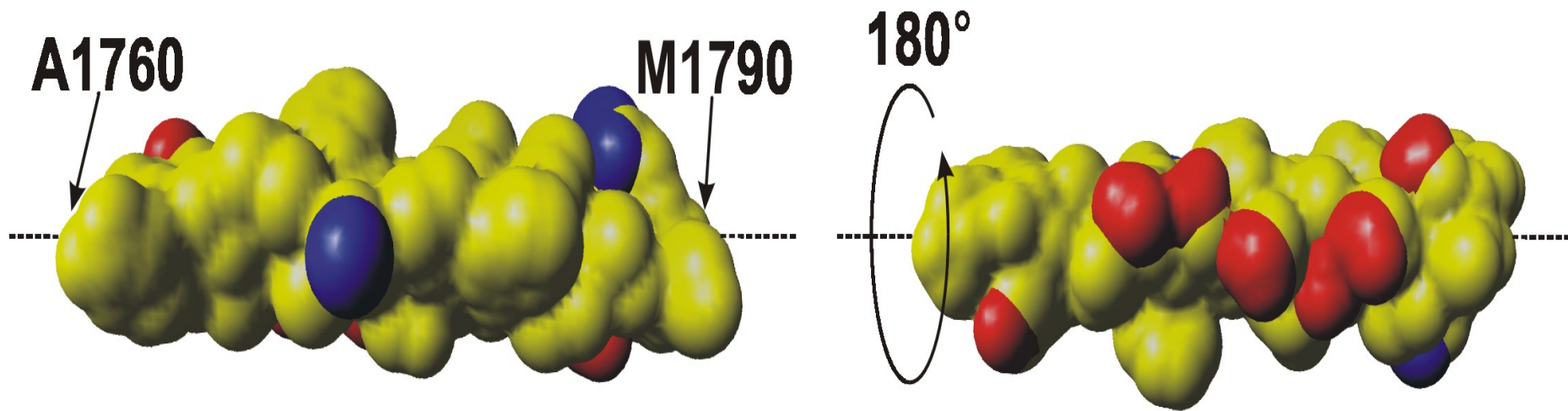
Badanie czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za proces różnicowania się komórek krwi



Zakład Cytobiochemii

1. Badania nad rolą biologiczną szkieletu błony,
2. Badania nad biologicznym mechanizmem kontrolującym powstawanie tratw błonowych,
3. Konstrukcja liposomowych nośników leków genetycznych.

Oddziaływanie spektryny z mono- i dwuwarstwami lipidowymi - struktura i funkcja domeny wiązania lipidów w spektrynie



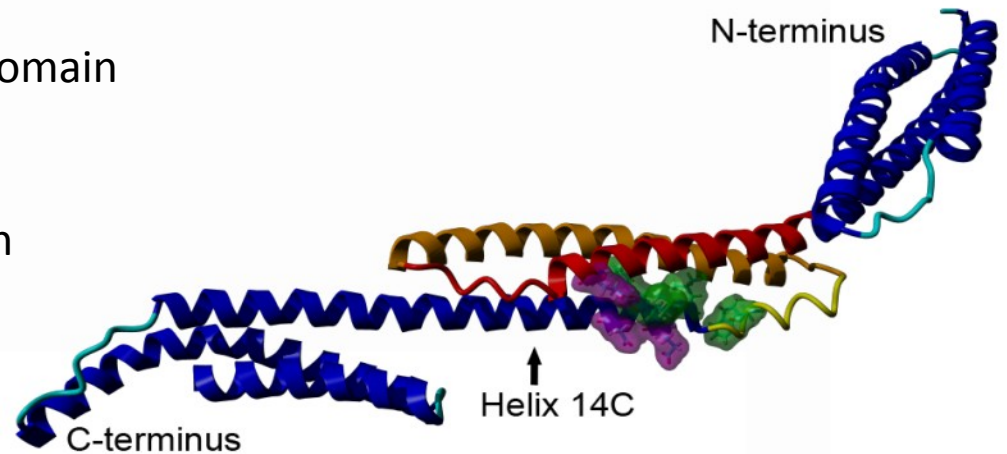
Structural insight into an ankyrin-sensitive lipid-binding site of erythroid beta-spectrin.

Czogalla A, Jaszewski AR, Diakowski W, Bok E, Jezierski A, Sikorski AF.

Mol Membr Biol. 2007 May-Jun;24(3):215-24.

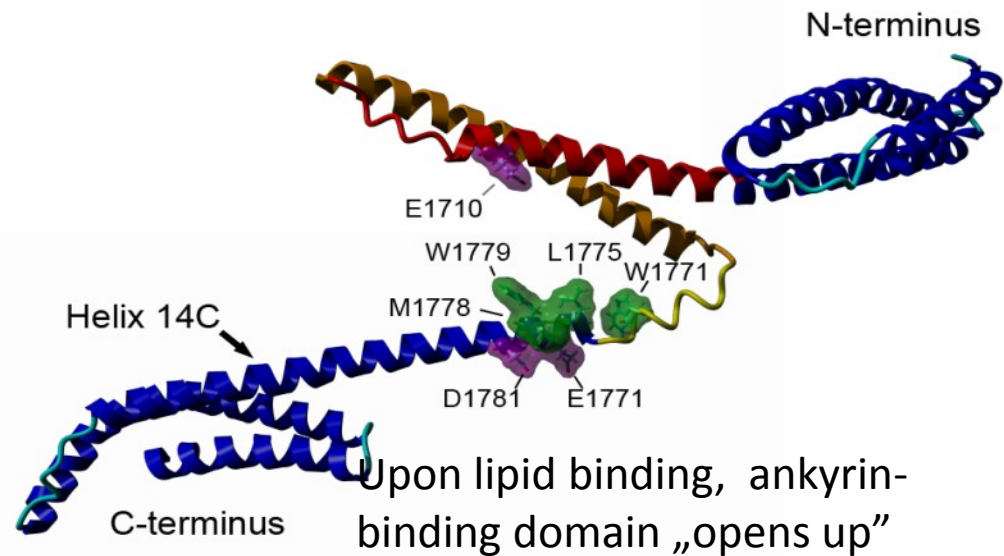
„Closed” structure of ankyrin binding domain
(residues 1584-1889)

- green – putative lipid binding site
- purple – residues taking part in ankyrin binding
- yellow – 3.10 helix



Distances between pairs of α carbons between proximal amino acid residues in the energy-minimized model of spectrin repeat (ankBD) in the presence of PE:PC liposomes

| Residue 1 | Residue 2 | Distance (Å) |
|-----------|-----------|--------------|
| 1699 | 1768 | 20.54 |
| 1710 | 1779 | 24.62 |
| 1750 | 1771 | 17.22 |
| 1754 | 1761 | 11.34 |
| 1754 | 1768 | 12.88 |
| 1754 | 1780 | 23.04 |
| 1771 | 1779 | 14.20 |



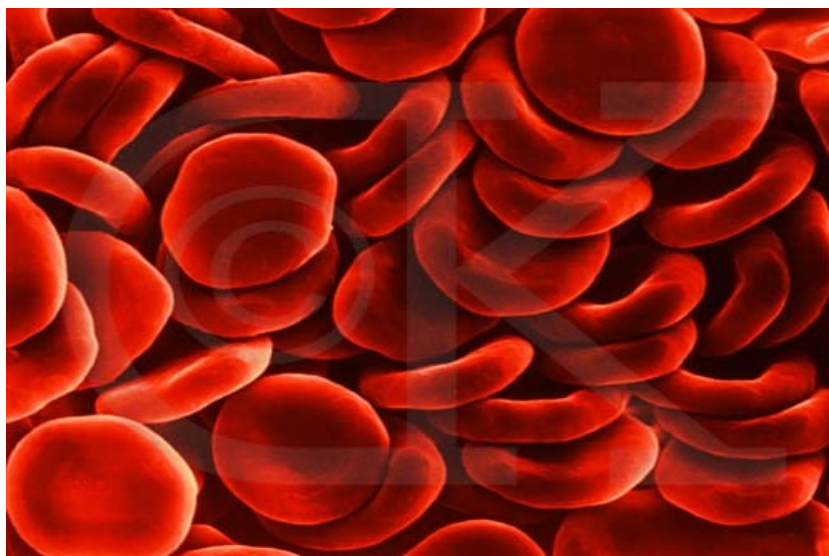
Phospholipid-induced structural changes...

Czogalla A, Grzymajto K, Jezierski A, Sikorski AF.

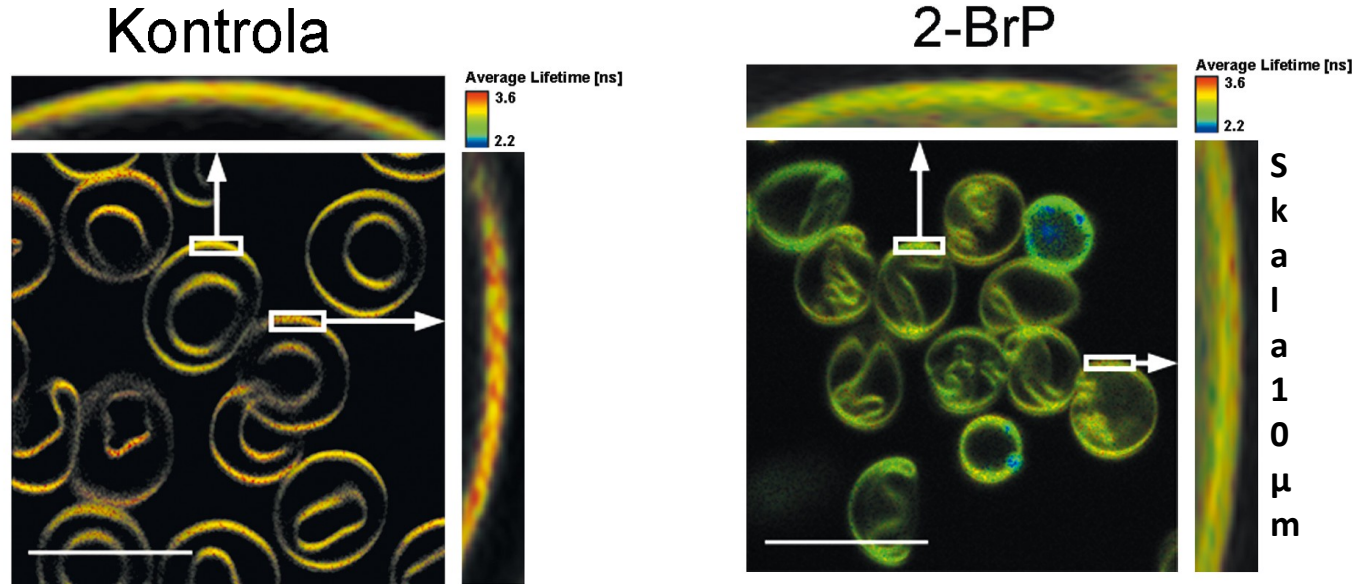
Biochim Biophys Acta-Biomembranes 2008 Nov;1778(11):2612-20.

Key amino acid residues of ankyrin-sensitive phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine-lipid binding site of β I-spectrin. Wolny M, Grzybek M, Bok E, Chorzalska A, Lenoir M, Czogalla A, Adamczyk K, Kolondra A, Diakowski W, Overduin M, Sikorski AF. PLoS One. 2011;6(6):e21538. Epub 2011 Jun 28.

Rola białka MPP1 w organizacji tratw błonowych komórek erytroidalnych

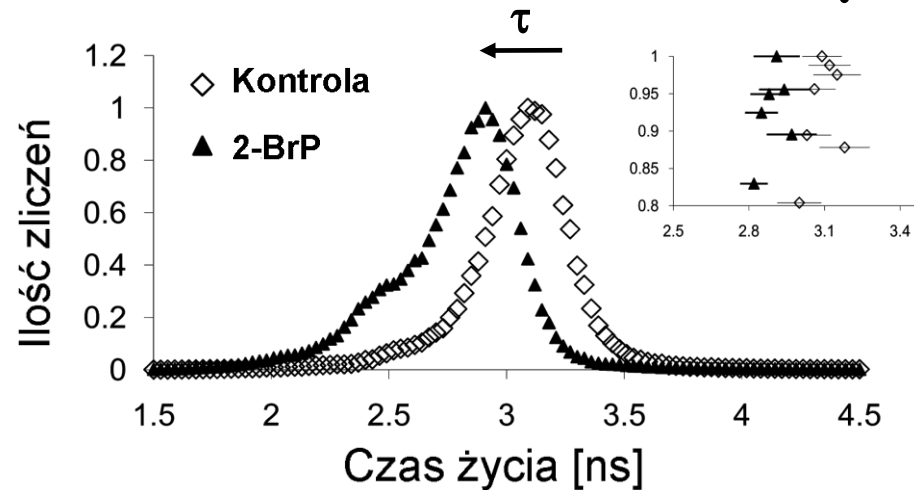


Inhibicja palmitoilacji białka MPP1 zmienia stopień uporządkowania błony w erytrocytach – analiza FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)



$\tau = 3.1 \text{ ns}$

$\tau = 2.8 \text{ ns}$

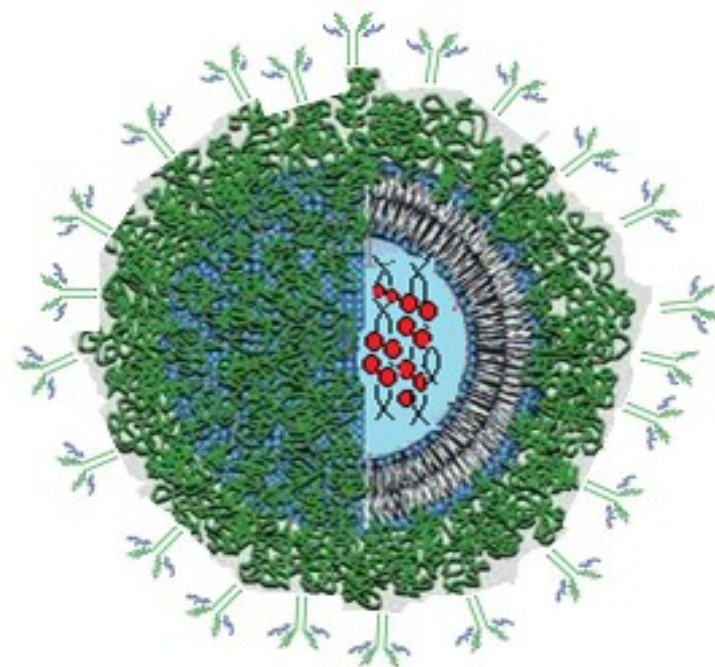


di-4-ANEPPDHQ

Supramolekularne postacie substancji bioaktywnych – od projektu do produktu Opracowanie liposomowych nośników leków genetycznych

Obszary zastosowania/rozwnięcia wyników badań:

- Leczenie białaczek opornych na tradycyjnie stosowane chemioterapeutyki.
- Zastosowanie standardowej chemioterapii w połączeniu terapią za pomocą liposomowego nośnika leku genetycznego, której celem jest uwrażliwienie komórek nowotworowych na cytostatyki, znacznie zmniejszając terapeutyczną dawkę cytostatyków.
- Wykorzystanie nośnika jako transfektanta w badaniach *in vitro*.





SPR BIAcore T3000



Applied Biosystems AB 4800+
MALDI TOF/TOF



HPLC Dionex Ultimate 3000



API 2000 LC MS/MS



DLS, Wyatt DynaPro Nanostar



FPLC: Acta Prime, Acta Explorer, Acta Purifier

HPLC Waters, analytical, preparative



Liposomal extruders
(from 1 ml to 900 ml)

DLS, Malvern Zetasizer

Typhoon, phospho-, chemo-
and fluoro- imager



B. Braun Biostat C 15 L fermentor



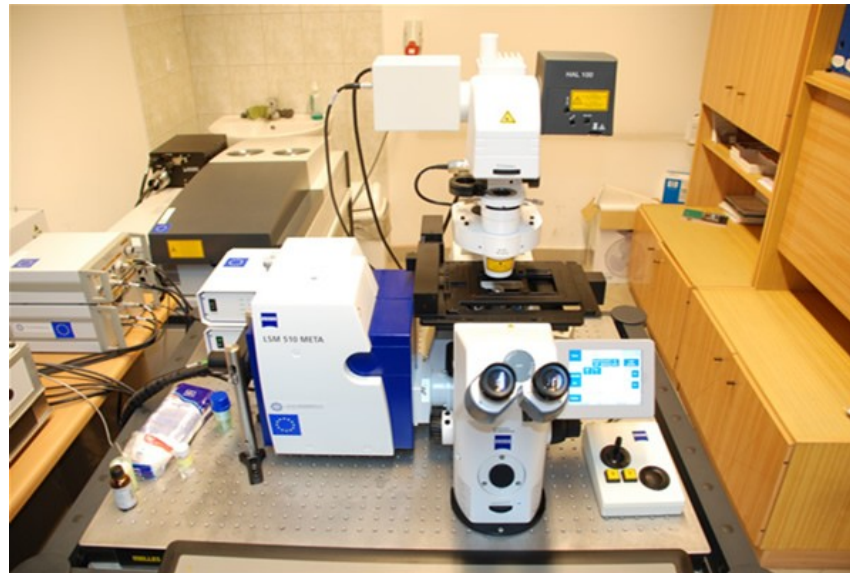
Incubators, laminars, cell culture shakers



StepOnePlus Real-Time PCR



Z1 Cell Observer (Zeiss)



Zeiss LSM 510 Meta Confocal Microscope



Spectropolarimeter Jasco J715



Fluorometers, Jasco FP750, modular Horiba FluoroLog 3



Differential Scanning Calorimeters: CSC Nano 5100 and 4100

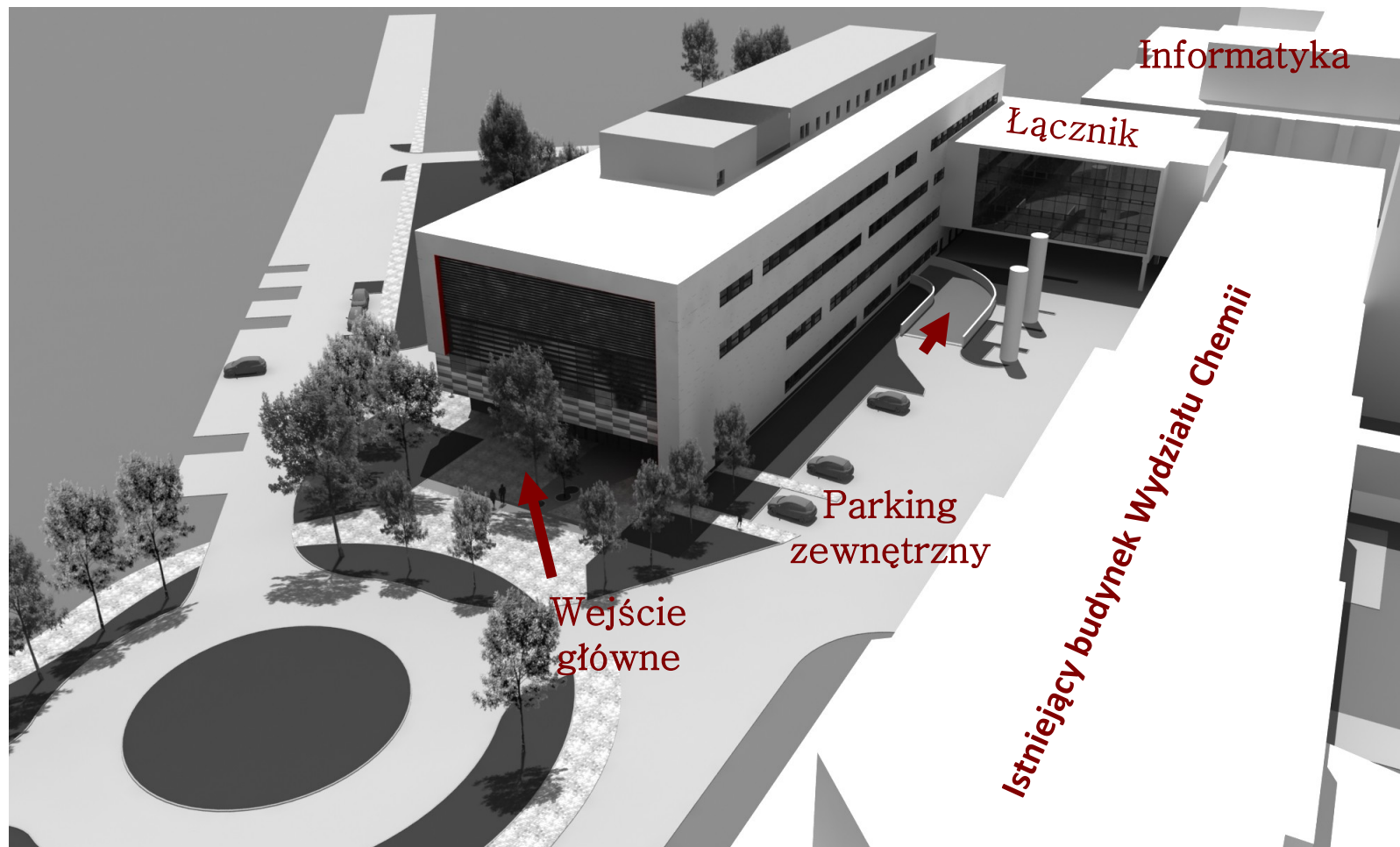


Isothermal Titration Calorimeter, CSC Nano III

Nowy budynek Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego



Nowy budynek Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego



Nowy budynek Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego



Położenie nowego budynku Biotechnologii