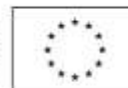


<b>Tytuł projektu</b>	Mechanizm fuzji prostasomów i plemników.
<b>Opiekun główny</b>	Dr hab. Paweł Weroński, prof. IKiFP Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN
<b>Opiekun/opiekunowie pomocniczy</b>	Dr hab. Ewa Luchter-Wasylewska Wydział Lekarski UJ CM, Katedra Biochemii Lekarskiej, Zakład Chemii Fizjologicznej
<b>Opis projektu badawczego</b>	<p>Prostasomy to małe (40-500 nm), wielowarstwowe liposomy produkowane przez gruczoł prostaty, licznie występujące w ludzkim płynie nasiennym. Choć ich obecność w nasieniu została odkryta w 1978 roku, to znajomość ich funkcji fizjologicznych oraz ich znaczenia w procesach reprodukcji jest ciągle ograniczona. Dotychczasowe badania wskazują, że spektrum działania prostasomów jest bardzo szerokie i głównie dotyczy przygotowania plemników do zapłodnienia. Obecność prostasomów w nasieniu jest również istotna dla ochrony męskich komórek rozrodczych przed wrogim środowiskiem pochwy. Dlatego zaburzenia budowy lub funkcji tych, niedawno odkrytych, organelli mogą stanowić jedną z istotnych przyczyn męskiej niepłodności. W starszym wieku ich działanie może być związane z genezą nowotworu prostaty. Budowa prostasomów jest pod wieloma względami niezwykła. Dominującą molekułą jest cholesterol (30%), natomiast lipidy stanowią zaledwie 15% membrany liposomu. Najczęściej występującym fosfolipidem jest sfingomielin (50%). Badania wskazują, że zarówno na powierzchni jak i we wnętrzu prostasomów znajdują się liczne białka (ponad 200 rodzajów). Są to enzymy (35%), białka strukturalne i transportowe (19%), białka GTP (14%), białka opiekuńcze (6%), białka sygnałowe (17%) oraz 9% dotychczas nieznanych białek o nieokreślonych funkcjach. Z tej szczególnej budowy membrany prostasomów wynika jedna z ich najciekawszych właściwości. Jest to mianowicie ich zdolność do fuzji z błoną komórkową plemników, co powoduje jej modyfikacje w zakresie składu białkowego i lipidowego. Dotychczasowe badania wskazują, że zarówno prostasom jak i plemnik w lekko zasadowym środowisku płynu nasiennego wykazują ujemny ładunek elektryczny. Co ciekawe, fuzja zachodzi tylko w środowisku lekko kwaśnym, charakterystycznym dla kobiecych narządów rozrodczych. Na fuzję prostasomów i plemników w istotny sposób wpływają stężenia jonów cynku i wapnia, jednak mechanizm tego procesu jest nieznan.</p> <p>Tematem proponowanej pracy doktorskiej będzie określenie mechanizmów fuzji prostasomów i plemników, a także identyfikacja najważniejszych czynników odpowiedzialnych za ten proces. Badania teoretyczne zostaną przeprowadzone w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN pod kierunkiem dr hab. P. Werońskiego. Będą one obejmowały molekularne modelowanie oddziaływania błony prostasomów z błoną komórkową plemników w</p>



	<p>obecności innych istotnych składników płynu nasiennego. Zastosowane zostaną zaawansowane techniki dynamiki molekularnej, takie jak obliczenia energii swobodnej zmian konformacyjnych, symulacje wymiany replik, oraz alchemiczne obliczenia zaburzeń energii swobodnej. Obliczenia będą przeprowadzone na wielordzeniowych procesorach graficznych wykorzystujących architekturę CUDA. Pozwoli to na kilkudziesięciokrotne przyspieszenie symulacji. Badania te umożliwią szczegółowy opis mechanizmów molekularnych powodujących fuzję prostatomiu i męskiej komórki rozrodczej. Jesteśmy przekonani, że symulacje komputerowe umożliwią zidentyfikowanie pewnych istotnych czynników determinujących przebieg badanego procesu, oraz określenie strukturalnych zmian błony plemnika towarzyszących fuzji. W konsekwencji pozwoli to na lepsze zrozumienie związków między strukturą i funkcją molekuł biorących udział w procesie fuzji.</p> <p>Badaniom teoretycznym będą towarzyszyły badania eksperymentalne, które pozwolą na weryfikację uzyskanych wyników symulacji komputerowych. Eksperymenty te zostaną wykonane w Katedrze Biochemii Lekarskiej (Zakład Chemii Fizjologicznej) UJCM pod kierunkiem dr hab. E. Luchter-Wasylewskiej. Izolacja prostatosomów oraz męskich komórek rozrodczych zostanie wykonana z nasienia męskiego. Prostatosomy zostaną otrzymane przy pomocy technik ultrawirowania oraz rozdzielania chromatograficznego w żelu (sączenia molekularnego), według protokołów proponowanych w literaturze przedmiotu. Plemniki zostaną uzyskane przy pomocy technik wirowania zgodnie z obowiązującymi procedurami. Inkubacja prostatosomów z plemnikami zostanie przeprowadzona w różnych warunkach środowiskowych – zmienne pH i skład roztworu fuzyjnego. Weryfikacja zaistniałej fuzji będzie opierać się na analizie zmian powstałych w błonie komórkowej plemnika. Obserwacja będzie dotyczyła transferu białek o charakterze enzymatycznym, co zostanie sprawdzone poprzez badanie ich aktywności katalitycznej przed i po fuzji. Pomiar aktywności enzymatycznej będzie opierał się na spektrofotometrycznej analizie przyrostu stężenia produktów specyficznych dla poszczególnych reakcji. Białka nieenzymatyczne transferowane do błony plemnika zostaną zidentyfikowane przy użyciu technik immunologicznych. Dodatkowo wykonane zostanie porównanie składu lipidowego błon komórkowych plemników przed i po fuzji. W tym przypadku zastosowane metody będą obejmować techniki rozdzielania chromatograficznego (HPLC) i elektroforetycznego.</p>
<b>Techniki badawcze</b>	<p>Komputerowe symulacje dynamiki molekularnej Wirowanie, ultrawirowanie, filtracja w żelu, analiza spektrofotometryczna UV-Vis, HPLC, elektroforeza, techniki immunologiczne.</p>