

## **NOWE METODY MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO (NMR) W FAZIE STAŁEJ Z ULTRASZYBKIM WIROWANIEM POD KĄTEM MAGICZNYM I DETEKcją PROTONOWĄ DLA BIOLOGII STRUKTURALNEJ SYMETRYCZNYCH KOMPLEKSÓW BIAŁKOWYCH DUŻYCH ROZMIARÓW**

Białka są podstawowym budulcem żywych organizmów. Ich rolą jest m.in. regulacja funkcji komórkowych, przenoszenie sygnałów, budowa i niszczenie innych białek, transport jonów i wody przez ściany komórkowe. Od dekad naukowcy usiłują zrozumieć na poziomie atomowym zależności między strukturą i dynamiką oraz relacje między tysiącami niezwykle zróżnicowanych białek.

Jednym z interesujących spostrzeżeń jest, iż natura dąży do oszczędzania zasobów i maksymalnego wykorzystania informacji genetycznej. W tym celu, duże maszyny molekularne są często złożone z mniejszych białek, ułożonych zgodnie z wysoką symetrią. Skrajnym przykładem są otoczki wirusowe zbudowane z setek kopii jednego białka. W bakteriach i wyższych organizmach, skomplikowane maszyny molekularne takie jak np. replizom DNA czy proteazom często zawierają symetryczne samoorganizujące się kompleksy białek w kształcie pierścienia.

Białka cechują się również wyraźną dynamiką, a ich funkcja wynika nieraz z przejściowych oddziaływań z innymi białkami lub kwasami nukleinowymi. Z tego względu statyczny obraz pojedynczych białek, uzyskany klasycznymi metodami biologii strukturalnej (tj. krystalografią rentgenowską, mikroskopią krioelektronów lub jądrowym rezonansem magnetycznym (NMR)), jest często niewystarczający do zrozumienia funkcji białka. Ostatnia z wymienionych metod (NMR) wykorzystuje magnetyzm jąder wodoru, atomu wszechobecnego w molekułach o znaczeniu biologicznym, pozwalając na monitorowanie ich otoczenia chemicznego. Z tego względu NMR stanowi unikalną metodę badania oddziaływań między białkami lub z kwasami nukleinowymi, które modulują lokalną strukturę i dynamikę jąder.

W tym projekcie proponujemy zastosowanie spektroskopii NMR do badania samoorganizujących się kompleksów białek. Konwencjonalny NMR dla dużych białek w roztworach napotyka ogromne trudności z powodu wolnej reorientacji molekuł, prowadzącej do błyskawicznego zaniku sygnału NMR. Jako alternatywę proponujemy wykorzystać nowe metody badań unieruchomionych biomolekuł, które zachowują się podobnie jak w fazie stałej, mimo że makroskopowo próbka przypomina żel. Jedną z metod przestrzennego ograniczenia ruchu molekuł jest sedymentacja pod wpływem ogromnych przyspieszeń odśrodkowych. Wypadkowa grawitacja, sięgająca 150 000 g w ultrawirówce lub kilku milionów g w wirującym rotorze, utrzymuje molekuły w niewielkich odległościach, uniemożliwiając ich obroty, pomimo braku istotnych sił międzycząsteczkowych. Co ważne, białka pozostają w prawie natywnym środowisku z dużą zawartością wody, co pozwala na obserwację oddziaływań międzymolekularnych tak jak w roztworze.

Dla optymalizacji właściwości spektroskopowych w NMR, faza „stała” złożona z przestrzennie stłoczonych białek musi być wirowana z dużą częstotliwością. Obecnie próbka jest umieszczana w niewielkich rotorach, o średnicy zewnętrznej rzędu 1 milimetra, i wirowana pod wpływem skierowanego strumienia powietrza z częstotliwością przekraczającą 100 000 razy na sekundę, co czyni rotor najszybciej wirującym obiektem mechanicznym używanym dotąd przez człowieka. Rotacja odbywa się w statorze nachylonym pod tzw. kątem magicznym ( $\approx 54^\circ$ ) względem silnego zewnętrznego pola magnetycznego, generowanego przez kriogenicznie chłodzony nadprzewodzący magnes. Posiadając tak zaawansowane wyposażenie, możemy wykorzystać fale częstotliwości radiowej do uzyskania informacji o otoczeniu chemicznym jądrowych momentów magnetycznych.

Celem projektu jest opracowanie strategii interpretacji złożonych widm NMR dużych białek, które zawierają setki do tysięcy linii rezonansowych w ograniczonym zakresie częstotliwości. Zaprojektujemy nowe eksperymenty dla rozdzielania sygnałów, a analizę danych eksperymentalnych wesprzemy wykorzystując dostępne struktury trójwymiarowe z użyciem odpowiednich metod obliczeniowych. Dodatkowo wykorzystamy nowatorskie metody biosyntetyczne, tj. selektywne znakowanie izotopowe wybranych domen białek, dla ograniczenia liczby widocznych w NMR rezonansów. W ten sposób zachowamy atomową rozdzielczość widm NMR, tj. możliwość jednoznacznego przypisania każdego sygnału do określonego atomu w białku.

Metody te umożliwią śledzenie wiązania się oraz określenie powierzchni kontaktu białek w jednym z komponentów maszyny replikacyjnej DNA w bakteriach: kompleksu helikazy DnaB oraz prymazy DnaGC, który rozwija i inicjuje kopiowanie podwójnej nici DNA. Z продемонstrujemy też użyteczność spektroskopii NMR na przykładzie proteazomu 20S z archeonów, kompleksu który rozwija i degraduje zbędne lub nieprawidłowo zwinięte białka.