

## *Właściwości chiralooptyczne białek i ich kompleksów (CRISPR/Cas-RNA) oraz ich związek z aktywnością biologiczną*



Białka Cas związane z mechanizmem CRISPR to enzymy, nazywane także „molekularnymi nożyczkami”, stanowiące kluczowy element innowacyjnego systemu inżynierii genetycznej do precyzyjnej modyfikacji genomu. Akronim CRISPR (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) dotyczy grupowanych, regularnie rozproszonych, krótkich, powtarzających się sekwencji palindromicznych, występujących naturalnie w genomie bakterii, które razem z białkami Cas są wykorzystywane w ochronie organizmu mikrobów przed atakującymi wirusami. Zatem, system typu CRISPR/Cas jest naturalnym mechanizmem obronnym bakterii, który został zaadoptowany przez naukowców jako narzędzie biologii molekularnej, pozwalające na precyzyjną edycję genów w szerokim zakresie organizmów. Opracowanie metody inżynierii genetycznej opartej na systemie CRISPR/Cas daje możliwość łatwego dodawania, usuwania lub zmiany określonych fragmentów DNA, zmniejszając przy tym czas i koszty procesu modyfikacji genomu oraz zwiększając jednocześnie jego potencjalne zastosowanie w rolnictwie, biologii i medycynie. W 2020 roku *Królewska Szwedzka Akademia Nauk* przyznała **Nagrodę Nobla w dziedzinie Chemii** za **odkrycie**, opracowanie i badania nad **systemem CRISPR/Cas**, co automatycznie podkreśla znaczenie i możliwości tej metody. Jak wspomniano powyżej, **działanie systemu CRISPR/Cas zostało porównanie do pracy „nożyczek molekularnych”**, które **tną DNA w określonym miejscu, prowadząc do usunięcia konkretnych fragmentów** lub ich **zastąpienia alternatywnymi sekwencjami**. Podstawę systemu CRISPR/Cas stanowią dwie główne makrocząsteczki: **pojedyncza cząsteczka przewodnika RNA (gRNA)**, która zawiera krótką sekwencję nukleotydów, komplementarną do fragmentu docelowego DNA, tym samym pełni rolę przewodnika systemu oraz **cząsteczka białka Cas**, która wykonuje cięcie. W efektywnym systemie CRISPR/Cas zaprojektowana w laboratorium cząsteczka gRNA wiąże się z nukleazą Cas, co powoduje istotną zmianę geometrii białka i prowadzi do powstania kompleksu rybonukleoproteinowego (RNP), wykazującego ukierunkowaną aktywność nukleolityczną.

**Stąd główną motywacją projektu jest ustalenie, jak i w jakim stopniu, zmiany konformacyjne białek z rodziny Cas wpływają na ich aktywność biologiczną.** W tym celu jako wiodące metody badawcze wybrano **chiralooptyczne techniki spektroskopowe**, takie jak *elektryczny dichroizm kołowy (ECD)*, *wibracyjny dichroizm kołowy (VCD)* i *ramanowska aktywność optyczna (ROA)*, uzupełnione o techniki konwencjonalne, takie jak *spektroskopia absorpcyjna z zakresu UV-Vis (UV-Vis)*, *spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni (IR)*, a także *spektroskopia ramanowska (RS)*. Realizacja projektu pozwala na **analizę zróżnicowanej struktury białek Cas**, a także **wykorzystanie opracowanej metodologii do badania aktywności biologicznej oraz struktury innych ważnych enzymów i ich kofaktorów**, a także **białek globularnych** po związaniu naturalnych związków tj. pigmenty, czyli witaminy.

Literatura naukowa pokazuje, iż zastosowanie spektroskopowych technik chiralooptycznych do badania interakcji białek i kwasów nukleinowych jest dobrym wyborem, ponieważ tego typu metody są bardzo wrażliwe na trójwymiarową strukturę naturalnych biomolekuł. Zarówno białka, jak i kwasy nukleinowe, takie jak RNA i DNA, to chiralne i aktywne optycznie układy, które oddziałują ze światłem spolaryzowanym kołowo w charakterystyczny sposób. Metody: ECD i VCD, opierają się na rejestracji różnicy w absorpcji lewo- i prawoskrętnej polaryzacji światła, przez związki chiralne. Z kolei technika ROA wiąże się z obserwacją niewielkiej różnicy w intensywności rozpraszania na sposób ramanowski poszczególnych komponentów światła spolaryzowanego kołowo, również przez związki chiralne. Zaskakujący jest fakt, iż **metody chiralooptyczne prawie nie były wykorzystane do analizy strukturalnej białek Cas** oraz ich kompleksów RNP. Zatem, połączenie konwencjonalnych metod, tj. spektroskopia absorpcyjna z zakresu UV-Vis i IR oraz spektroskopia ramanowską, z technikami chiralooptycznymi ECD, VCD i ROA **pozwole na otrzymanie zestawu ultraczułych narzędzi do badania struktury drugo- i trzeciorzędowej białek oraz monitorowania zmian konformacyjnych w strukturze ich kompleksów w roztworze**, a także w przypadku zastosowania ECD i ROA również w naturalnym środowisku wodnym.