

„Wielowymiarowa analiza modulowanych struktur makromolekuł z wykorzystaniem nowatorskich korekt fononowych na przykładzie kompleksu Hyp-1/ANS”

Streszczenie

Zjawisko modulacji struktury jest stosunkowo dobrze poznane w krytalografii małowymiarowej, ale jego występowanie w makromolekularnych kryształach białkowych było zaskakujące. Fizyczne przejawy tego zjawiska obejmują obserwację dodatkowych refleksów między głównymi pikami braggowskimi na dyfraktogramach. W rezultacie modulacji, symetria translacyjna kryształu zostaje zaburzona w przestrzeni trójwymiarowej, a periodyczność struktury zostaje przywrócona tylko w wyższych wymiarach. Wymaga to stosowania specjalistycznych metod analizy wielowymiarowej do prawidłowego wskaźnikowania obrazów dyfrakcyjnych i opisu struktury. Modulacja struktury może być spowodowana zarówno periodycznymi zmianami pozycji atomów w miejscach określonych przez symetrię przestrzenną komórki, jak i okresowymi zmianami obsadzenia danej pozycji krytalograficznej.

Dotychczasowe metody rozwiązywania i udokładniania struktur rutynowo stosowane w krytalografii białek nie są odpowiednie do przeprowadzenia kompleksowej analizy modulowanych struktur. Ograniczenie do opisu w przestrzeni trójwymiarowej oznacza przyjęcie wymierności modulacji, gdzie porządek translacyjny zostaje przywrócony po określonej, całkowitej liczbie komórek elementarnych. Wówczas strukturę należy analizować w powiększonej superkomórce, co prowadzi do znacznego wzrostu liczby parametrów w przypadku złożonych struktur białkowych oraz umożliwia uzyskanie tylko przybliżonego modelu.

Brak odpowiednich narzędzi do analizy makromolekularnych struktur modulowanych prowadzi do poważnych problemów z właściwym wskaźnikowaniem i przetwarzaniem danych dyfrakcyjnych, a następnie konstruowaniem kompletnego modelu struktury o zadowalających wskaźnikach rozbieżności. Dotychczas udało się przeprowadzić pełną analizę strukturalną tylko dla kilku modulowanych kryształów białek. Należą do nich kompleksy białka Hyp-1 z dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum*) z fluorescencyjnym ligandem ANS (8-anilinaftaleno-1-sulfonianem). W zależności od warunków krytalizacji, kompleksy białkowe Hyp-1/ANS mogą tworzyć kryształy o siedmio- (7Hyp/ANS) lub dziewięciokrotnej modulacji struktury (9Hyp/ANS) wzdłuż kierunku *c* grupy przestrzennej *C2*.

W ramach rozprawy doktorskiej porównywałam dwie modulowane struktury krytaliczne kompleksu białkowego Hyp-1/ANS. Pierwsza z nich, oznaczona jako 7Hyp/ANS, została otrzymana, rozwiązana i opisana przez dr Joannę Śliwiak oraz grupę prof. Mariusza Jaskólskiego w 2015 roku i posiadała siedmiokrotną modulację wzdłuż osi *c* oraz zawierała 28 niezależnych molekuł białka w rozbudowanej superkomórce. Obecność modulacji i elementów tNCS (Translational Non-Crystallographic Symmetry, niekrytalograficzna symetria translacyjna) była połączona ze zbliżniaczeniem kryształu, co stanowiło dodatkową trudność podczas rozwiązania i udokładniania struktury. Ostatecznie struktura została rozwiązana i udokładniona w podejściu superkomórki, a następnie wyniki badań zdeponowano w bazie PDB (Protein Data Bank) z kodem 4N3E. Wkrótce potem podczas zmiany warunków krytalizacji i kokrytalizacji w obecności hormonu roślinnego melatoniny, otrzymano kolejną modulowaną strukturę kompleksu Hyp-1/ANS. Omawiany model kompleksu 9Hyp/ANS z dziewięciokrotną modulacją wzdłuż osi *c* składał się finalnie z 36 molekuł białka Hyp-1 rozmieszczonych zgodnie z motywem zawierającym 4 molekuły (2 dimery) Hyp-1 powtórzonym 9 razy wzdłuż *c* ($4 \times 9 = 36$). Struktura 9Hyp/ANS została rozwiązana przez dr Joannę Śliwiak analogicznie do poprzedniego przypadku 7Hyp/ANS, a następnie udokładniona przeze mnie w ujęciu superkomórki.

Przedstawiona rozprawa doktorska składa się z trzech zasadniczych części i zadań związanych z analizą struktury krystalicznej białka Hyp-1. Pierwsza część obejmuje udokładnienie modelu struktury kryształu 9Hyp/ANS w ujęciu superkomórki przy użyciu konwencjonalnego oprogramowania oraz związanej z nim analizy elementów strukturalnych kryształu, szczególnie kwestii związanych z upakowaniem atomów w obrębie komórki elementarnej, perturbacjami periodyczności struktury, porównaniem ze strukturą 7Hyp/ANS oraz rozmieszczeniem liganda.

W drugiej części dokonałam szczegółowej analizy danych dyfrakcyjnych obu modulowanych kryształów Hyp-1/ANS, udokładnienia oraz metodycznego opisu i udokładnienia struktury 7Hyp/ANS w przestrzeni wielowymiarowej. W procesie udokładniania struktury 7Hyp/ANS zostało użyte autorskie, specjalistyczne oprogramowanie stworzone w środowisku Matlab. Zrezygnowanie z uproszczonego założenia wymierności modulacji oraz wprowadzenie dodatkowych poprawek uwzględniających nieporządek w strukturze pozwoliło na uzyskanie nowych modeli oraz poprawę ich wskaźników rozbieżności. Opracowany pakiet został następnie rozbudowany o kolejne moduły umożliwiające wizualizację danych oraz wprowadzanie poprawek związanych z drganiami termicznymi sieci krystalicznej (fononami).

Trzecia część pracy dotyczy zastosowania metod dynamiki molekularnej do badania ruchów termicznych i konformacji łańcuchów bocznych białka Hyp-1 w oparciu o czysto fizyczne podejście, w oderwaniu od więzów narzucanych podczas udokładniania struktury krystalicznej. Uzyskane informacje pozwoliły określić preferowane energetycznie konformacje w obrębie białka oraz ich porównanie z wariantami dobranymi w procesie udokładniania struktury krystalicznej.