

# INTERFERENCJA MECHANIZMÓW RELAKSACJI SPINÓW JĄDROWYCH W BADANIACH NMR BIAŁEK

Bartłomiej Banaś

Promotor: dr Anna Zawadzka-Kazimierczuk  
Pracownia Spektroskopii i Oddziaływań Międzycząsteczkowych  
Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski  
b.banas2@student.uw.edu.pl



## WSTĘP

Niemalą część białek obecnych w naturze stanowią białka natywnie nieustrukturyzowane, które w roztworach wodnych nie przyjmują tylko jednej określonej struktury, natomiast mogą istnieć w formach o różnych strukturach. Konieczne jest badanie struktury takich białek, gdyż pełnią one istotne funkcje biologiczne. Interferencja mechanizmów relaksacji spinów jądrowych (CCR) jest skuteczną ale niedocenianą metodą pozwalającą na uzyskanie informacji o kątach dwuściennych w cząsteczkach białek. Zwłaszcza w przypadku białek nieustrukturyzowanych konieczne jest wykorzystanie wielu różnych eksperymentów CCR aby precyzyjnie i jednoznacznie określić zestawy uprzywilejowanych kątów dwuściennych kolejnych reszt białek. Celem mojej pracy było zatem opracowanie i zweryfikowanie nowych eksperymentów CCR, z myślą o wykorzystaniu ich do badań nad białkami nieustrukturyzowanymi.

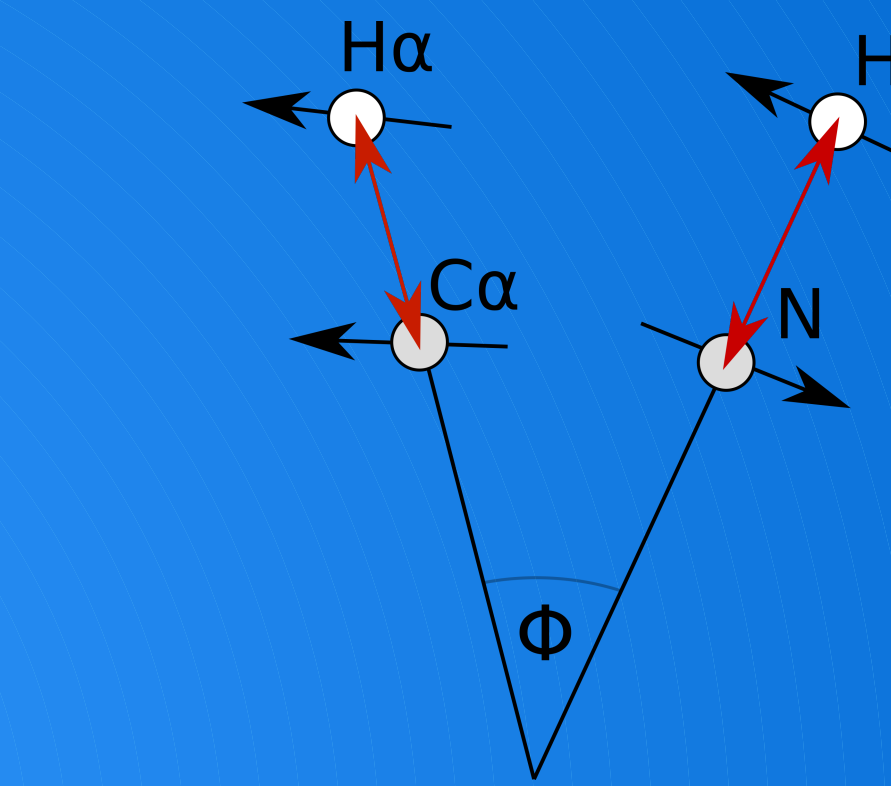
## TEORIA

Interferencja mechanizmów relaksacji spinów jądrowych polega na konstruktywnym lub destruktywnym sumowaniu się różnych mechanizmów relaksacji, w wyniku czego intensywność pików w widmach NMR może wzrastać lub maleć. W przypadku interferencji dwóch mechanizmów dipolowych, zjawisko interferencji zależy od kąta dwuściennego między dwoma parami interferujących jąder (rys. 1). Informację o stopniu w jakim zachodzi interferencja nosi ze sobą stosunek intensywności pików w widmie bez interferencji („auto”) oraz w widmie z interferencją („cross”) - rys. 2.

W przypadku interferencji dwóch mechanizmów dipolowych stała CCR oznaczana jako  $\Gamma$  zależy od współczynników żyromagnetycznych każdego jądra, od lokalnej dynamiki białka oraz od odpowiednich kątów dwuściennych pomiędzy jądrami biorącymi udział w interferencji. Wartość eksperymentalna związana jest ze stosunkiem intensywności w widmie „cross” (z interferencją) do intensywności w widmie „auto” (bez interferencji). Obrazują to poniższe wzory.

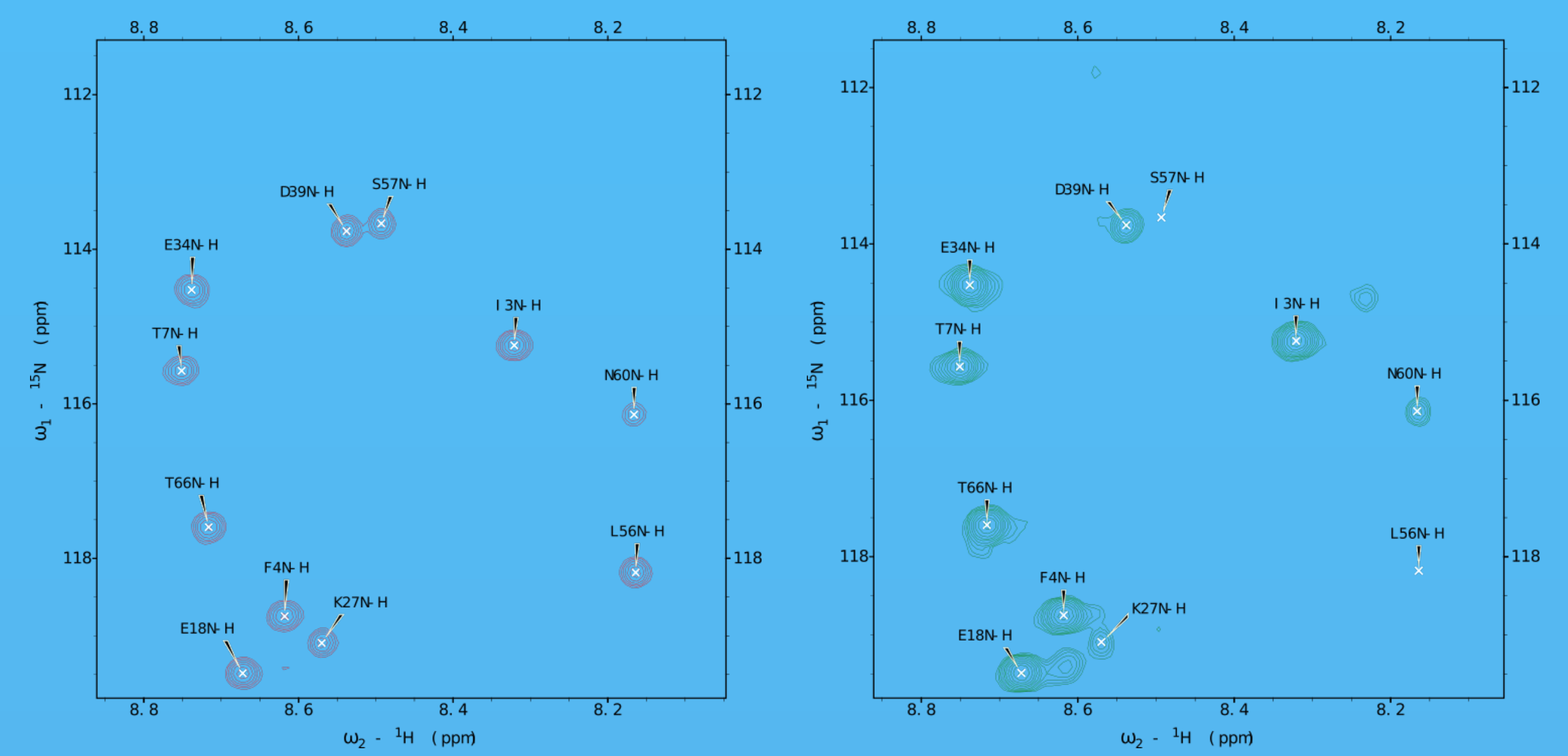
$$\Gamma_{teor} = \frac{2}{5} \left( \frac{\mu_0 \hbar}{4\pi} \right)^2 \gamma_1 \gamma_2 \gamma_3 \gamma_4 \tau_c S^2 f(\phi, \psi)$$

$$\Gamma_{eksp} = \frac{1}{T_c} \operatorname{artanh} \left( \frac{I_{cross}}{I_{auto}} \right)$$



Rys. 1. Dwie pary jąder, ulegających interferencji relaksacji poprzez mechanizm dipolowy, są ze sobą powiązane poprzez kąt dwuścienny, od którego wartości zależy stała relaksacji. Sąsiednie pary Ha-Cα i N-H w cząsteczce białka powiązane są ze sobą kątem dwuściennym  $\phi$ .

- $\Gamma$  – stała CCR
- $T_c$  – czas interferencji
- $I_v$  – intensywność pików w danym widmie
- $\mu_0$  – przenikalność magnetyczna próżni
- $\gamma_i$  – współczynnik żyromagnetyczny jądra
- $\tau_c$  – czas korelacji
- $S^2$  – współczynnik lokalnego uporządkowania
- $\phi, \psi$  – kąty dwuściennie w danej reszcie białka



Rys. 2. Widma HNCACO i N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-CA<sub>i</sub>HA<sub>i</sub> ubikwityny w trybie „auto” (po lewej) i w trybie „cross” (po prawej).

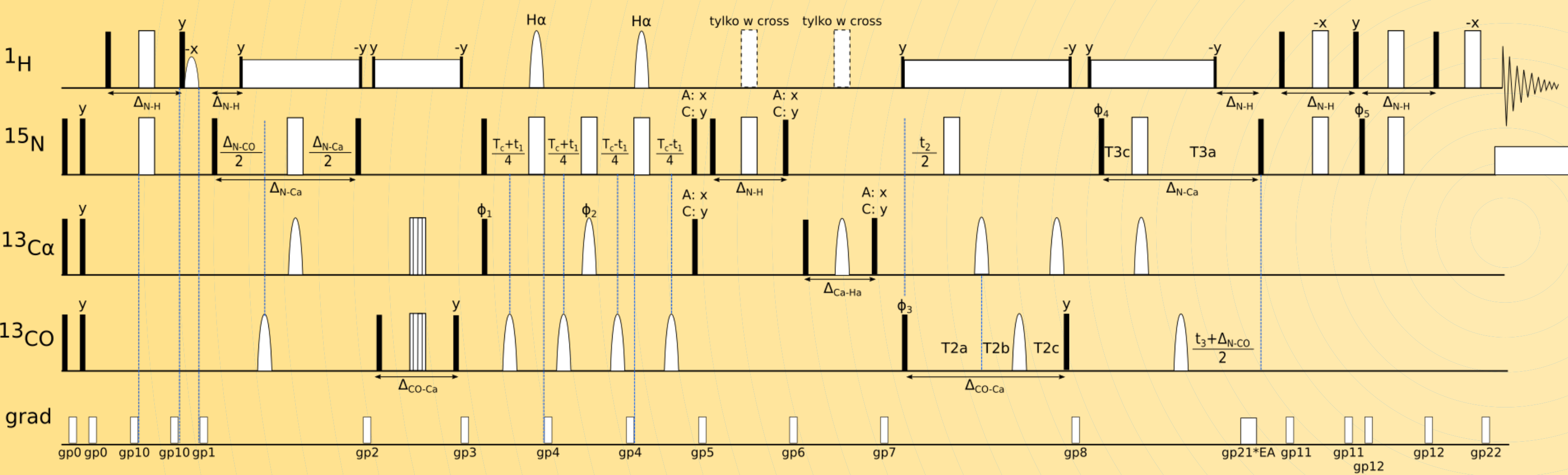
## WYNIKI

Poniżej przedstawiono nowe sekwencje impulsowe trzech różnych eksperymentów CCR NMR opartych na interferencji różnych oddziaływań dipol-dipol. Czarne prostokąty oznaczają twarde (nieselektywne) impulsy 90°, białe prostokąty twarde impulsy 180°, a impulsy w kształcie dzwonu są impulsami kształtowanymi, oddziałującymi na węższy zakres częstotliwości, np. tylko na karbonylowe atomy węgla.

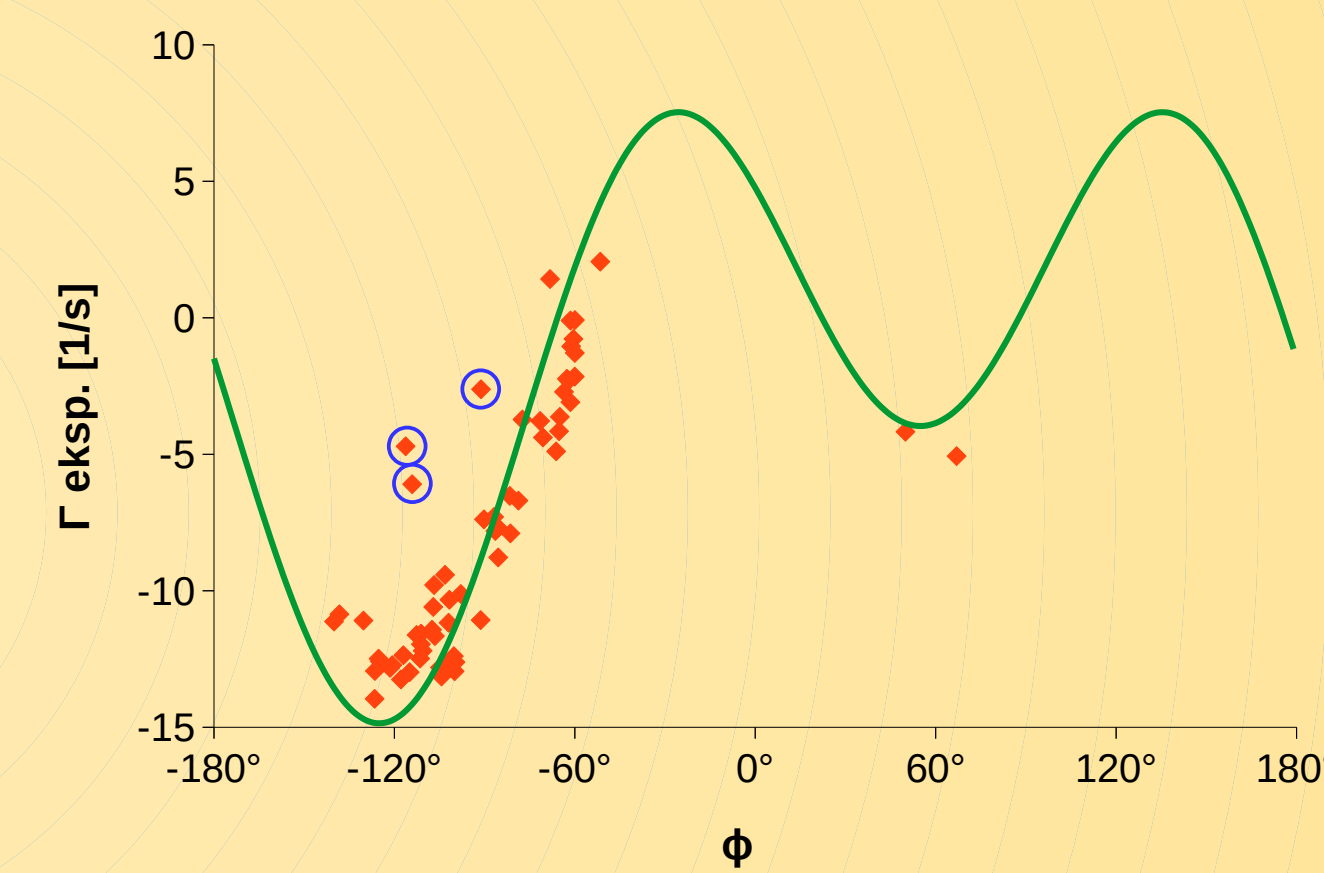
Po prawej stronie znajdują się wykresy przedstawiające porównania eksperymentalnych wartości stałych CCR obliczonych na podstawie widm zmierzonych dla ubikwityny (białka ustrukturyzowanego złożonego z 76 reszt aminokwasowych). Czerwonym kolorem zaznaczono wartości eksperymentalne, a zielonym wartości przewidywane na podstawie opublikowanej struktury tego białka (PDB 1d3z). Niebieskim kołem oznaczono punkty pomiarowe odpowiadające resztom na C-końcu białka, które w przypadku ubikwityny odznaczają się dużą ruchliwością, w przeciwieństwie do pozostałej części białka.

Pomyślnie opracowano, zaprogramowano i zweryfikowano na podstawie pomiarów dla ubikwityny trzy nowe eksperymenty 4D NMR pozwalające na pomiar interferencji różnych oddziaływań dipol-dipol. Uzyskane wyniki są w wystarczającym stopniu zgodne z wartościami teoretycznymi. Jednakże aby ostatecznie ocenić ich przydatność konieczne jest by w kolejnym etapie badań opracowane eksperymenty spróbować zastosować do białek nieustrukturyzowanych.

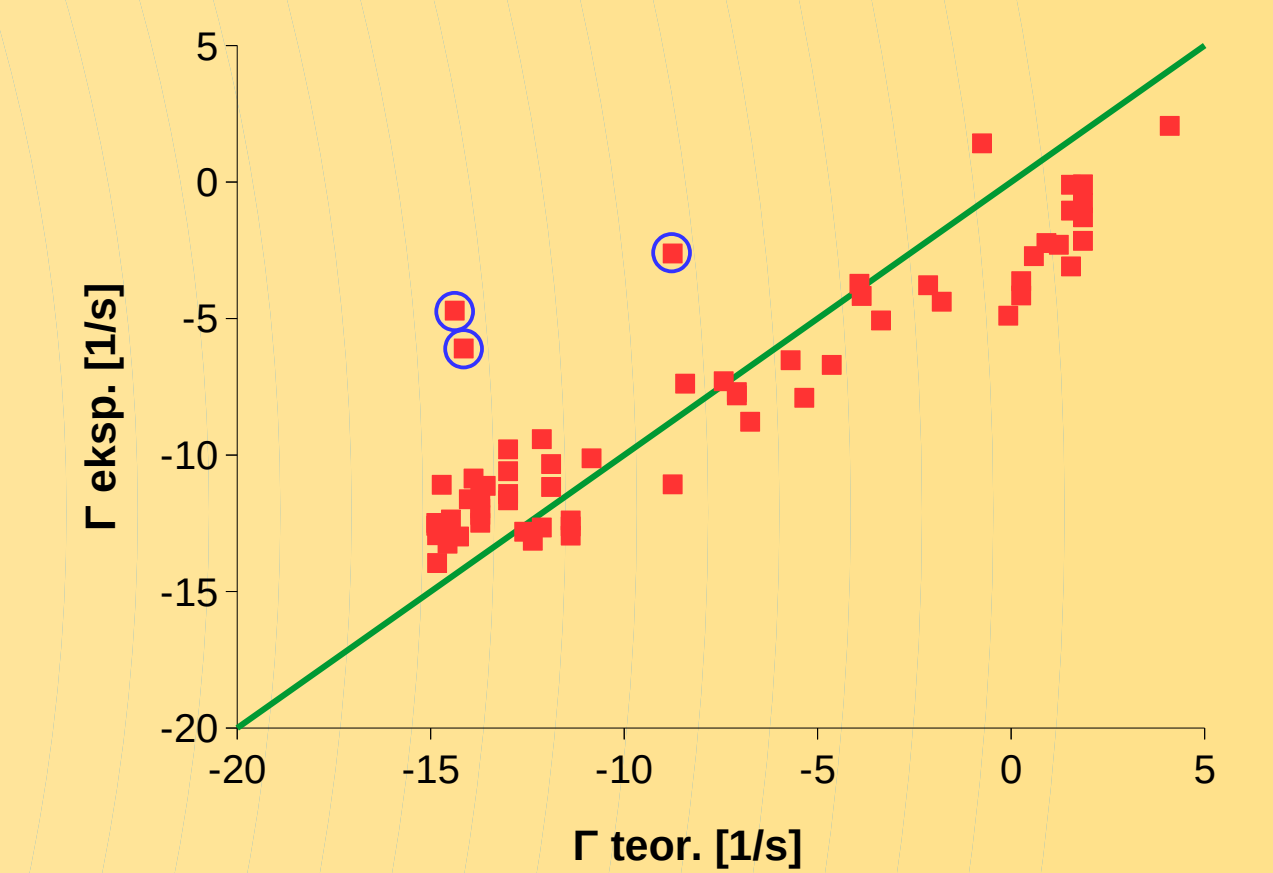
### HNCACO<sub>i</sub> N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-CA<sub>i</sub>HA<sub>i</sub>



Rys. 3. Sekwencja impulsów opracowana dla eksperymentu HNCACO i N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-CA<sub>i</sub>HA<sub>i</sub>.

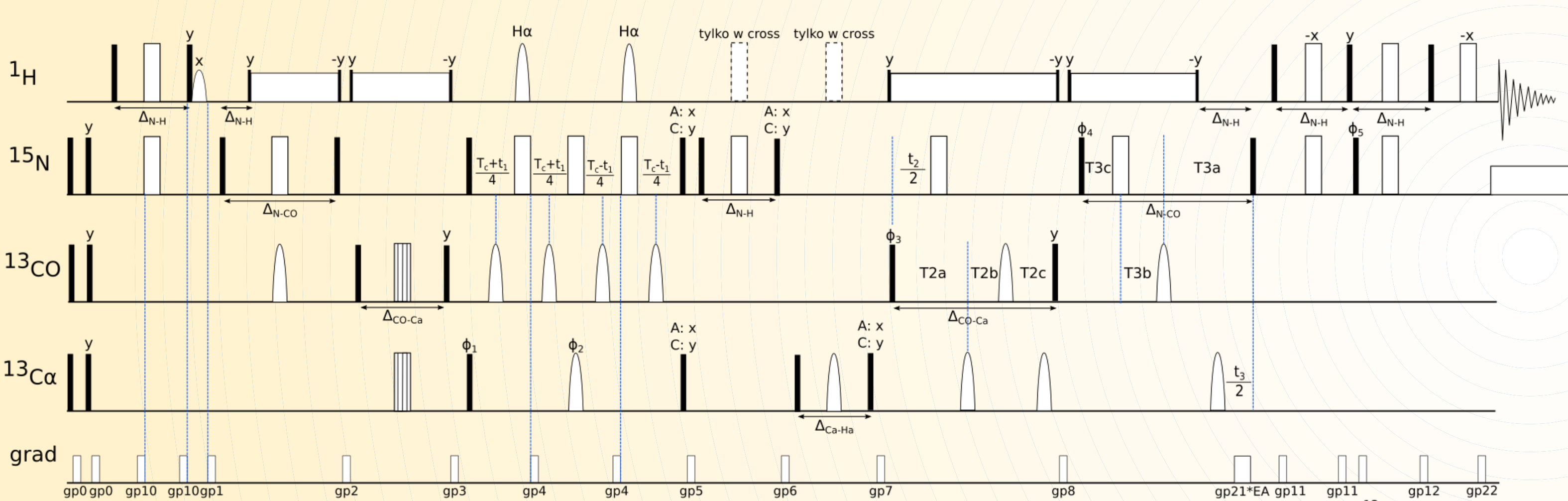


Rys. 4. Porównanie eksperymentalnej i teoretycznej zależności stałych  $\Gamma$  od kąta  $\phi$  reszt ubikwityny w przypadku eksperymentu HNCACO i N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-CA<sub>i</sub>HA<sub>i</sub>.

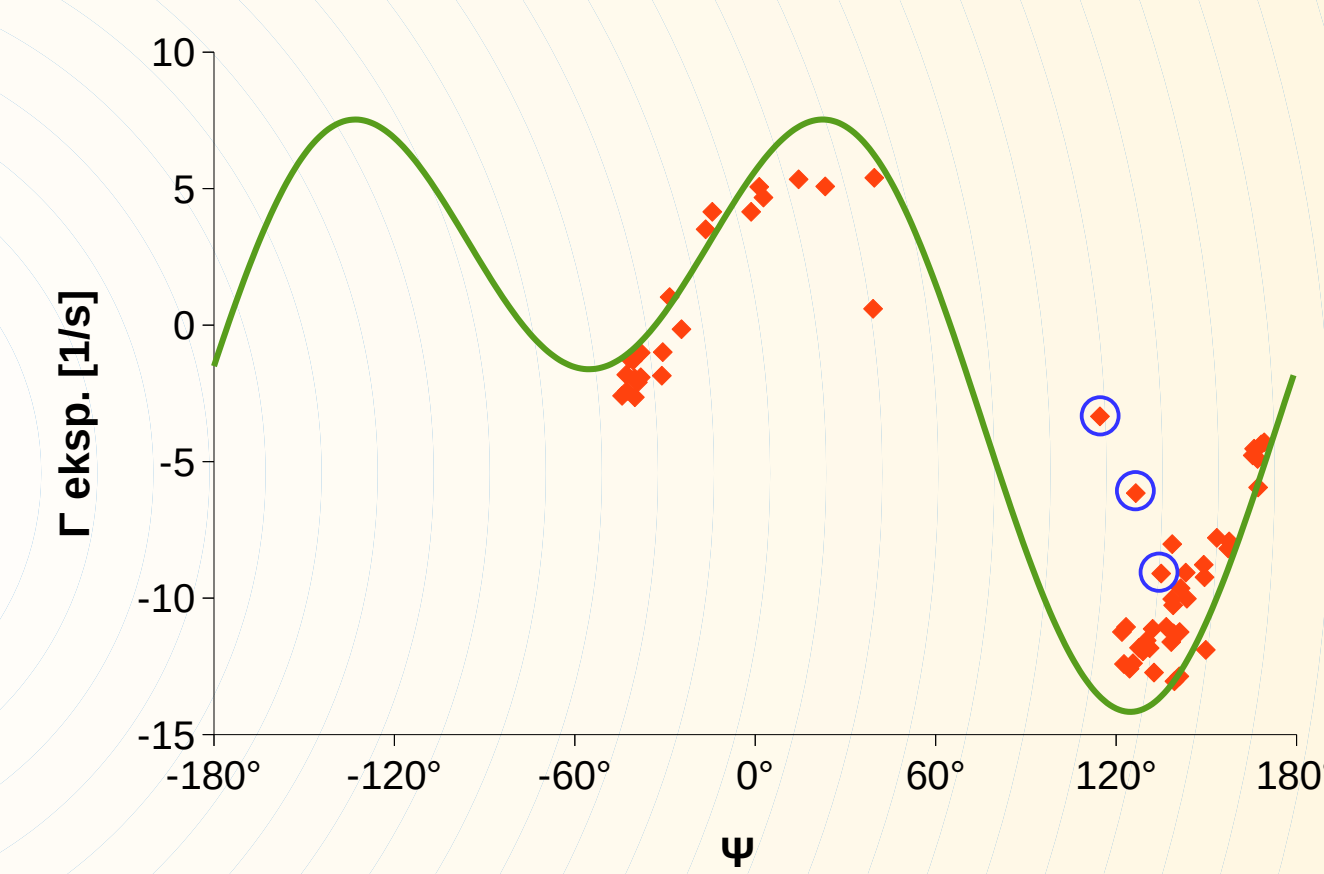


Rys. 5. Porównanie eksperymentalnych i teoretycznych wartości stałych  $\Gamma$  dla reszt ubikwityny w przypadku eksperymentu HNCACO i N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-CA<sub>i</sub>HA<sub>i</sub>.

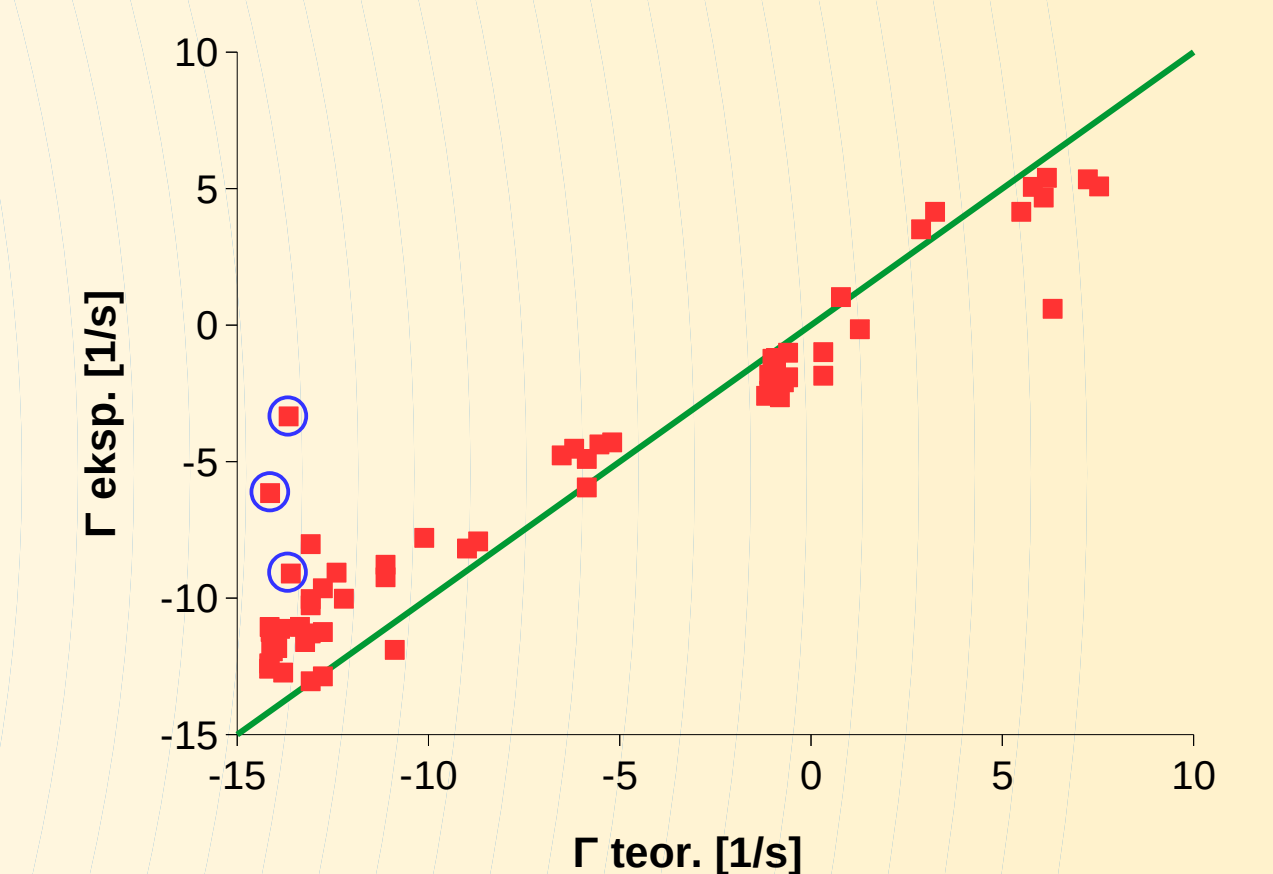
### HNCOCA N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-CA<sub>i-1</sub>HA<sub>i-1</sub>



Rys. 6. Sekwencja impulsów opracowana dla eksperymentu HNCOCA N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-CA<sub>i-1</sub>HA<sub>i-1</sub>.

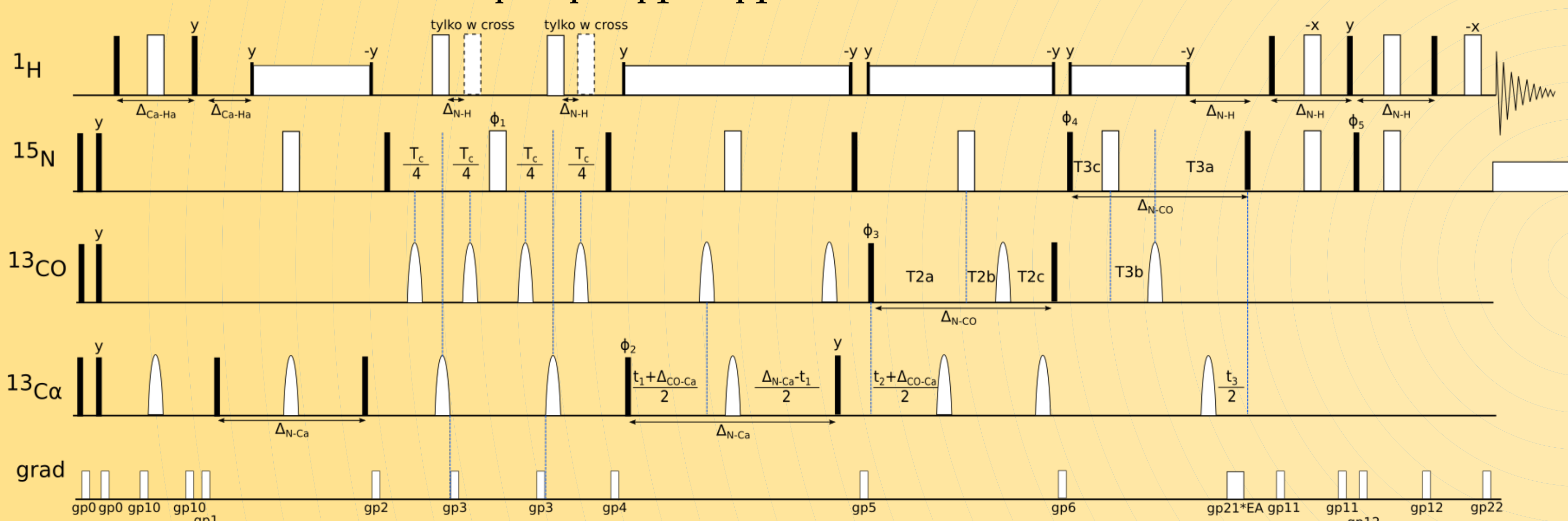


Rys. 7. Porównanie eksperymentalnej i teoretycznej zależności stałych  $\Gamma$  od kąta  $\psi$  reszt ubikwityny w przypadku eksperymentu HNCOCA N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-CA<sub>i-1</sub>HA<sub>i-1</sub>.

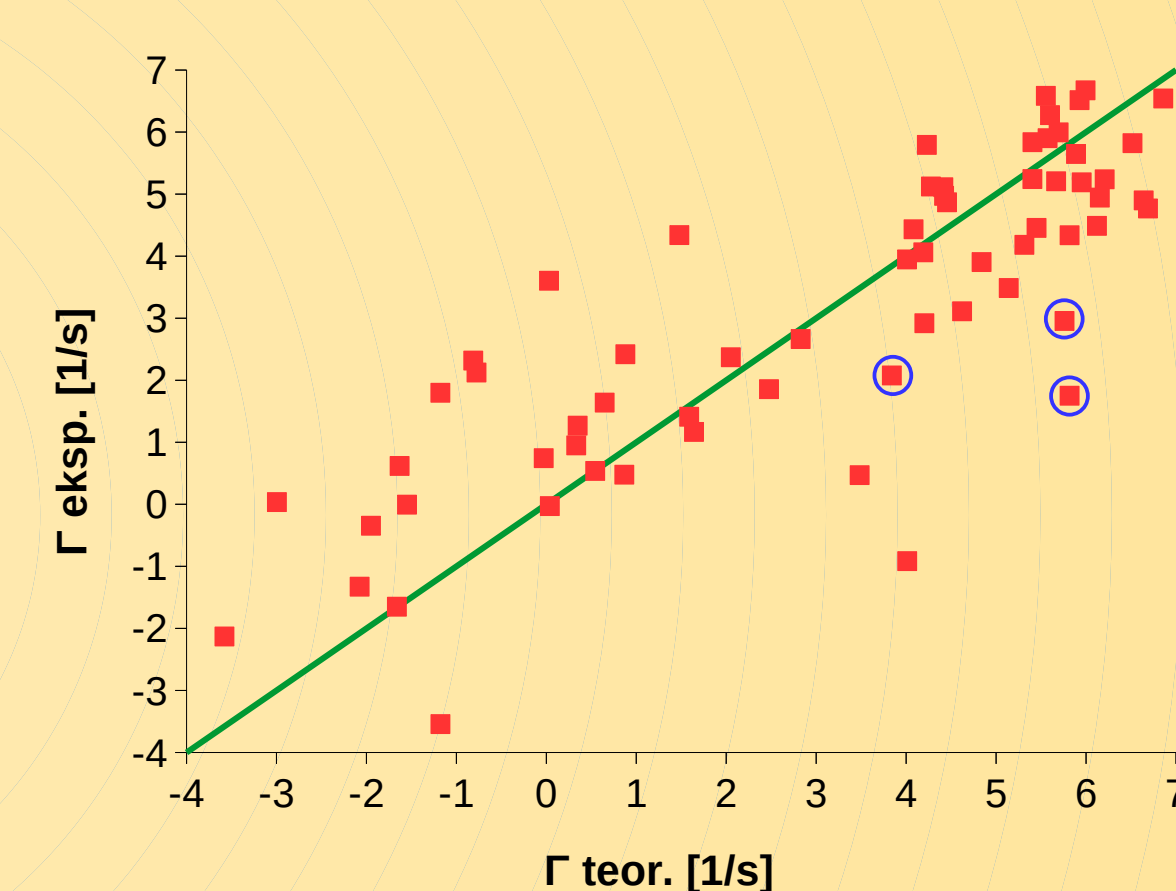


Rys. 8. Porównanie eksperymentalnych i teoretycznych wartości stałych  $\Gamma$  dla reszt ubikwityny w przypadku eksperymentu HNCOCA N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-CA<sub>i-1</sub>HA<sub>i-1</sub>.

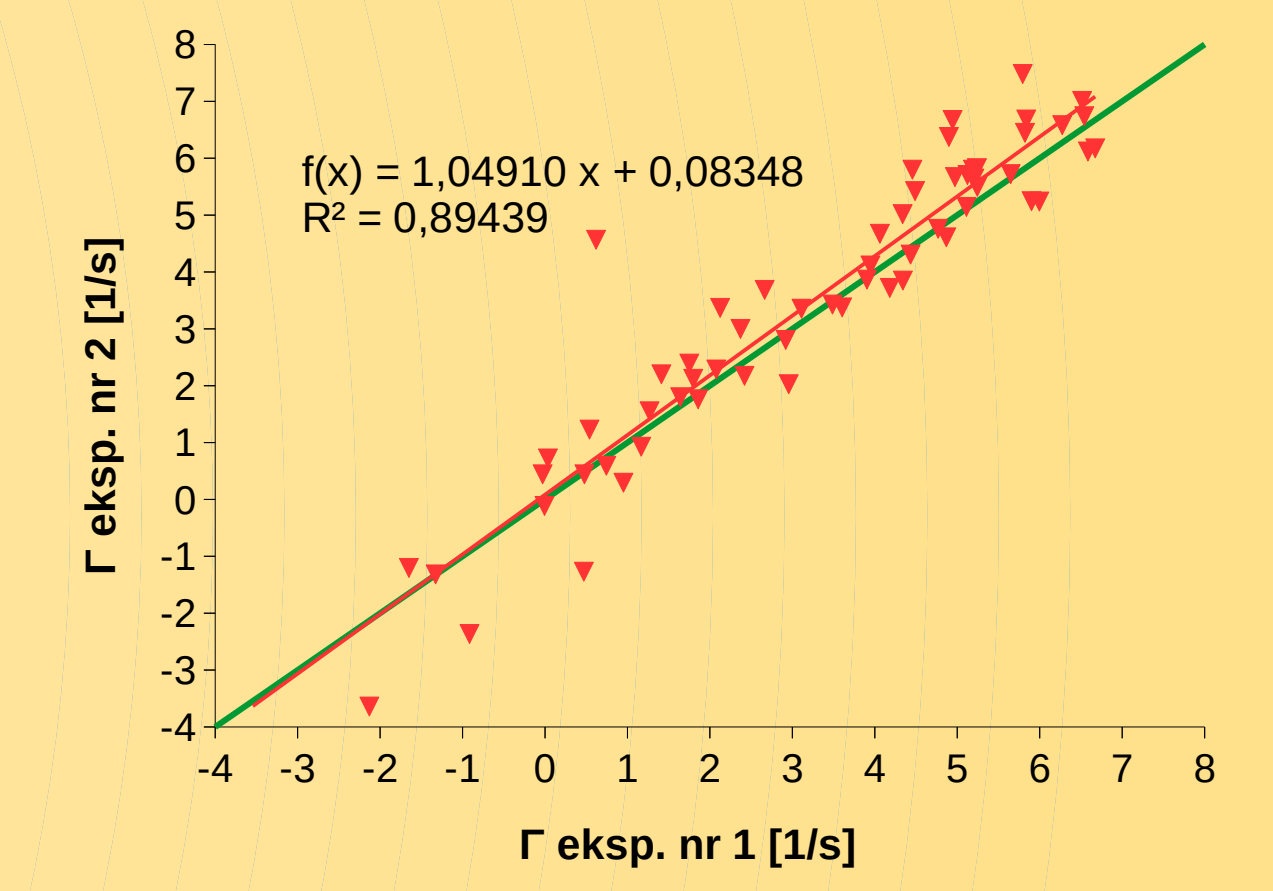
### hacanCACONH N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-N<sub>i-1</sub>H<sup>N</sup>



Rys. 9. Sekwencja impulsów opracowana dla eksperymentu hacanCACONH N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-N<sub>i-1</sub>H<sup>N</sup>.



Rys. 10. Porównanie eksperymentalnych i teoretycznych wartości stałych  $\Gamma$  dla reszt ubikwityny w przypadku eksperymentu hacanCACONH N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-N<sub>i-1</sub>H<sup>N</sup>.



Rys. 11. Porównanie eksperymentalnych wartości stałych  $\Gamma$  dla reszt ubikwityny w przypadku dwóch powtórzeń eksperymentu hacanCACONH N<sub>i</sub>H<sup>N</sup>-N<sub>i-1</sub>H<sup>N</sup>, obrazujące powtarzalność opracowanej sekwencji