

Warszawa, 24 marca 2019 r.

Mgr Szymon Żerko
Pracownia Oddziaływań Międzymolekularnych
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski

Autoreferat pracy doktorskiej

Wysokowymiarowe metody spektroskopii NMR dedykowane do badań białek nieustrukturyzowanych

Promotor: prof. dr hab. Wiktor Koźmiński

Białka jako grupa związków o istotnym znaczeniu biologicznym nieprzerwanie od wielu lat są obiektem intensywnych badań naukowych. Choć historycznie funkcja białka była utożsamiana z posiadaniem przez nie stabilnej struktury trzeciorzędowej w ostatnich latach poznano wiele przykładów białek nieustrukturyzowanych pełniących istotne funkcje biologiczne. Ze względu na odmienne właściwości fizykochemiczne badania białek nieustrukturyzowanych wymagają rozwinięcia nowych metod badawczych, często znacznie różniących się od metod wykorzystywanych w badaniach białek globularnych.

Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego jest wiodącą techniką pozwalającą na opis właściwości białek nieustrukturyzowanych z rozdzielczością atomową. Korzystne właściwości relaksacyjne tej grupy białek, pozwalają na rejestrację widm NMR o wysokiej czułości, pozwalając jednocześnie na realizację wielowymiarowych eksperymentów korelacyjnych.

Jednym z problemów napotykanym w badaniach białek nieustrukturyzowanych z wykorzystaniem spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego jest istotne nakładanie się sygnałów obecnych na rejestrowanych widmach, co utrudnia ich interpretację. Problem ten naturalnie rośnie wraz ze zwiększeniem rozmiarów badanego białka, często ograniczając użyteczność wielu standardowych technik w badaniach białek o dużych rozmiarach. Proces przypisania poszczególnym jądrom atomowym ich częstości rezonansowych jest zwykle pierwszym etapem badań, koniecznym do uzyskania informacji z rozdzielczością atomową.

W pracy przedstawiono dwie nowe ścieżki realizacji procesu przypisania sygnałów. Pierwsza polega na rejestracji widm projekcyjnych o sześciu i siedmiu wymiarach. Druga ścieżka dotyczyła rozwoju widm o czterech i pięciu wymiarach wykorzystujących bezpośredni transfer magnetyzacji z korzystając ze sprzężeń skalarnych przez trzy wiązania pomiędzy węglami karbonylowymi łańcucha głównego białka.

Nowy schemat uzyskiwania widm projekcyjnych o sześciu i więcej wymiarach polega na jednoczesnym wykorzystaniu dwóch różnych rodzajów próbkowania niejednorodnego: radialnego oraz próbkowania losowego. W proponowanych eksperymentach cztery, próbkowane pośrednio, wymiary są realizowane poprzez próbkowanie losowe, pozostałe wymiary pośrednie są natomiast współewoluowane poprzez zastosowanie próbkowania radialnego z jednym z wymiarów próbkowanym losowo. W wyniku otrzymywane są widma pięciowymiarowe, będące projekcjami widm o sześciu lub siedmiu wymiarach.

Jako przykład praktycznej realizacji proponowanej koncepcji wybrano eksperyment HNCO(N)CACONH (podkreślono wymiary współewoluowane). Ostatecznie otrzymuje się bezpośrednie połączenia sekwencyjne pomiędzy sygnałami obecnymi w trójwymiarowym widmie HNCO, z dodatkową możliwością uzyskania przesunięć chemicznych węgli C α . Co ważne, przetwarzanie i analiza uzyskiwanych w ten sposób widm projekcyjnych jest prowadzona analogicznie jak standardowych widm pięciowymiarowych, z wykorzystaniem tego samego oprogramowania.

Zaproponowane eksperymenty o czterech i pięciu wymiarach wykorzystujące przeniesienie magnetyzacji pomiędzy węglami karbonylowymi poprzez sprzężenie skalarnie przez trzy wiązania, pozwalają na uzyskanie połączeń sekwencyjnych pomiędzy trójką przesunięć chemicznych C'(i-1), N(i), H(i), a parą przesunięć C'(i±2), N(i±1). Zastosowanie dłuższych czasów mieszania prowadzi do uzyskania sygnałów korelacyjnych także do dalszych par przesunięć: C'(i±3), N(i±2), jednakże negatywnie wpływa na czułość eksperymentu. Zaproponowana koncepcja została zaimplementowana jako eksperymenty pięciowymiarowe HNCOCNH i (HACA)CON(CO)CONH. Druga z proponowanych technik, cechuje się zdecydowanie lepszymi właściwościami. Co szczególnie istotne w łatwy sposób pozwala na kontynuowanie przypisania sekwencyjnego, w przypadku gdy w sekwencji pierwszorzędowej badanego białka występują proliny (niesąsiadujące z innymi prolinami).

Charakterystyczną cechą uzyskiwanych widm jest ich szeroki zakres dynamiczny. Sygnały diagonalne, zasadniczo nieniosące informacji sekwencyjnej, są sygnałami o najwyższej intensywności. Sytuacja taka jest szczególnie niekorzystna w przypadku widm rejestrowanych z wykorzystaniem próbkowania losowego, ze względu na wysoki poziom artefaktów próbkowania pochodzących od sygnałów diagonalnych, co efektywnie utrudnia identyfikację pozostałych (pozadiagonalnych) sygnałów niosących informację sekwencyjną. Z tego powodu w pracy przedstawiono efekty zastosowania rekonstrukcji uzyskiwanych widm algorytmem separacji sygnałów. Wyniki jasno wskazują, że w przypadku proponowanych eksperymentów rekonstrukcja widm prowadzi do znacznej poprawy jakości widm i w zasadzie powinna być standardowo wykorzystywana w przypadku proponowanych eksperymentów.

Porównanie efektywności wszystkich proponowanych technik przedstawiłem, badając kompletność uzyskiwanych przypisań sygnałów ludzkiego białka α -synukleiny, modelowego białka nieustrukturyzowanego. W porównaniu tym została uwzględniona także możliwość rekonstrukcji uzyskanych widm.

W pracy przedstawiono także wyniki realizacji przypisań sygnałów izoformy 3x ludzkiego białka Tau. Zastosowanie proponowanych technik pozwoliło na pełne przypisanie sygnałów łańcucha głównego, także w długiej części sekwencji białka bogatej w proliny, czego nie udało się uzyskać stosując standardowe techniki pięciowymiarowe. Potwierdziło to użyteczność zaproponowanych w pracy technik w zastosowaniach do trudnych przypadków.