

Przypisanie sygnałów rezonansowych grup metylowych głównej proteazy koronawirusa SARS-CoV-2 metodami jądrowego rezonansu magnetycznego NMR w fazie stałej

Ewelina Kuc

Kierownik: dr Jan Stanek

Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego NMR pozwala na badanie struktury, dynamiki oraz oddziaływań biomakrocząsteczek z rozdzielczością atomową. Ograniczeniem dla badań NMR tego typu obiektów w roztworach jest spadek czułości i rozdzielczości widmowej wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej obiektu. Dodatkowo, w badaniach cieczowych problematyczna może okazać się niestabilność próbek. Wspomniane problemy nie dotyczą pomiaru NMR w fazie stałej - wymaga on jednak zastosowania odmiennej metodologii m.in. przeprowadzenia pomiaru w warunkach wirowania pod kątem magicznym (*ang. Magic Angle Spinning, MAS*), z częstością minimum 50 000 razy na sekundę dla detekcji protonowej.^[1]

Pierwszym etapem badań biomakrocząsteczek metodami NMR jest przypisanie sygnałów rezonansowych spinów jądrowych, czyli określenie, od której grupy jąder pochodzi dany sygnał rezonansowy. Wówczas śledzenie zmian intensywności czy też położenia przypisanego sygnału (przy kontrolowanej zmianie parametrów, takich jak stężenie liganda czy temperatura) dostarcza wielu informacji o badanym układzie np. pozwala na wyznaczenie miejsca wiązania liganda do białka czy stałej dysocjacji takiego procesu. Funkcję tego typu mikroskopowych próbników pełnić mogą grupy metylowe, ze względu m.in. na ich powszechne występowanie w kluczowych fragmentach strukturalnych białek.

Celem projektu było przypisanie sygnałów rezonansowych grup metylowych: leucyn, waliny oraz izoleucyn głównej proteazy koronawirusa SARS-CoV-2 (M^{PRO}). Badane białko zostało wzbogacone izotopowo 2H , ^{13}C i ^{15}N ; zastosowano także łagodną renaturację w H_2O oraz odpowiednie prekursorzy leucyny (L), waliny (V) i izoleucyny (I), tak aby sprotonować specyficznie grupy metylowe $\{L(^{13}CH_3, ^{12}CD_3), V(^{13}CH_3, ^{12}CD_3), I(\delta_1^{13}CH_3, \gamma_2^{13}CD_3)\}$ oraz atomy wodoru w łańcuchu głównym białka. Następnie białko skryształizowano metodą dyfuzji par^[2] i zapakowano do rotora o średnicy 0,81mm, wykorzystując ultrawirowanie. Przypisania sygnałów rezonansowych dokonano w oparciu o wcześniejsze przypisanie rezonansów łańcucha głównego oraz projektując i rejestrując w warunkach MAS 90 kHz szereg eksperymentów korelacyjnych trój- i czterowymiarowych: $H_{\gamma/\delta}C_{\gamma/\delta}C_{\beta/\gamma}$, $H_{\gamma/\delta}C_{\gamma/\delta}(C_{\beta/\gamma})C_{\alpha/\beta}$, $(HN)C_{\alpha}(C_{\beta}C_{\gamma})C_{\delta}H_{\delta}$ (tylko dla leucyn i izoleucyn) i $H_{\gamma}C_{\gamma}(C_{\beta}C_{\alpha})NH$ (tylko dla waliny). Część z stworzonych w projekcie sekwencji impulsowych została oparta na sekwencjach cieczowych, opracowanych przez zespół prof. L. Kaya.^[3] Na podstawie dostępnych danych udało przypisać się: 57% sygnałów dla leucyn, 76% sygnałów dla waliny, 63% sygnałów dla izoleucyn (odpowiednio 71%, 85% i 88% względem sygnałów obecnych w widmie $^{13}C, ^1H$ HSQC).

Literatura:

- [1] E.R. Andrew, A. Bradbury, R.G. Eades, Nature. 1959, 183, 4678:1802-1803
- [2] S. Günther, i in. Science. 2021, 372, 6542:642-646.
- [3] V. Tugarinov, L. Kay, JACS. 2003, 125, 45:13868-13878.