

NMR RELAXÁCIÓ ÉS A FEHÉRJÉK BELSŐ DINAMIKÁJA

GÁSPÁR REZSŐ, IFJ.

DOTÉ Biofizikai Intézet

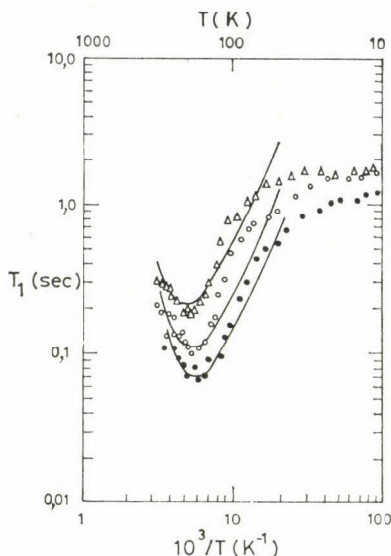
Az utóbbi években született számos kísérleti és elméleti eredmény arra utal, hogy a fehérjék belső dinamikája valószínűleg alapvető szerepet játszik biológiai funkciójuk ellátásában (DAMJANOVICH, SOMOGYI, 1978, CARERI és mtsi 1979). Mivel a fehérjék háromdimenziós szerkezetét többnyire kristályos mintákon végzett röntgen- és neutrondiffrakciós vizsgálatok alapján ismerjük, egyre érdekesebbé válik ezen makromolekulák szilárd állapotában lezajló mozgások tanulmányozása. A fehérje krisztallográfia hőmérsékletfaktor analízise által nyújtott legújabb eredmények (FRAUENFELDER és mtsai 1979, ARTYMIUK és mtsai 1979) jól kiegészítik a témakörre vonatkozó korábbi ismereteinket, melyeket főként oldatokon végzett nagyfeloldású NMR spektroszkópiái (WUTRICH 1976), illetve ab initio dinamikai vizsgálatok szolgáltattak (McCAMMON és mtsai 1977).

A kristályos állapotú fehérjék és más makromolekulák dinamikájára vonatkozó igen értékes információk származtathatók NMR relaxációs kísérletekből. Az ilyen vizsgálatok különösen időszerűek, mivel napjainkban éppen az NMR technika segítségével bizonyították, hogy az oldatban levő fehérje molekulák konformációja igen hasonló a kristályos állapotban észlelthez (JARDETSKY és WADE—JARDETSKY 1980).

Az NMR relaxációs eredmények alapvetően három formában jelentkeznek, spin—rács relaxáció (T_1), spin—spin relaxáció (T_2 vagy vonalszélesség) és a forgó koordináta rendszerbeli relaxáció ($T_{1\rho}$). Az ilyen típusú NMR eredményeket szinte kivétel nélkül relaxációs idő—hőmérséklet grafikonok formájában analizálják. Tipikusan ilyen ábrázolást láthatunk az α -kimotripszinre vonatkozólag az 1. ábrán. A grafikonokból az NMR relaxációt leíró általános elméleti modell alapján (KUBO és TOMITA 1954) a relaxációt kiváltó mozgást jellemző korrelációs frekvencia ν_c , és a mozgás aktivációs energiája számítható. A spin—rács relaxáció (T_1) esetén az elmélet végeredményül a következő egyszerű egyenletre vezet

$$\frac{1}{T_1} = C \left[\frac{\tau_c}{1 + (\omega_0 \tau_c)^2} + \frac{4\tau_c}{1 + (2\omega_0 \tau_c)^2} \right], \quad (1)$$

ahol C az ún. relaxációs paraméter, $\tau_c = 1/2\pi\nu_c$ a korrelációs idő és ω_0 a mérés



1. ábra. Kristályos α -kimotripszin spin-rács relaxációs idejének (T_1) hőmérsékletfüggése három különböző frekvencián (Δ : 60 MHz; $\circ$: 30 MHz; $\bullet$: 18 MHz). Folytonos vonallal a Kubo–Tomita-elmélet alapján illesztett görbékét jelöltük

körfrekvenciája. A korrelációs időre általában feltételezik a 2. egyenlet szerinti egyszerű Arrhenius-féle aktivációs törvényt:

$$\tau_c = \tau_0 \exp \left(\frac{E}{RT} \right). \quad (2)$$

A T_1 mérések tipikusan 10^6 – 10^8 Hz tartományban lezajló mozgások jelenlétéről adnak felvilágosítást. A hőmérsékletfüggő T_2 mérésekből ugyanakkor a makromolekulákon belül történő tipikusan 10^4 – 10^5 Hz frekvenciájú mozgások jelenlétére lehet következtetni. Az utóbbi években egyre elterjedtebb az ún. forgó koordináta rendszerbeli relaxáció mérése, főként a fenti frekvenciatartomány alacsonyabb értékek felé való kiterjesztésére. A forgó koordináta rendszerben a spinek együttforgását biztosító segéd mágneses tér nagyságrendekkel kisebb a T_1 méréseknél ható Zeeman-térnél, így a $T_{1\rho}$ mérésekkel tanulmányozható frekvenciatartomány megegyezik a T_2 mérésekkel detektálhatóval. A forgó koordinátarendszerbeli mérések speciális változatának tekinthető az ún. dipoláris térben történő relaxációs idő, T_{1D} mérés. A dipoláris vagy lokális mágneses tér a Zeeman-térnél sok nagyságrenddel kisebb és így a hőmérsékletfüggő T_{1D} mérések tipikusan 10 – 10^4 Hz frekvenciájú, tehát viszonylag igen lassú mozgások kimutatására is alkalmasak:

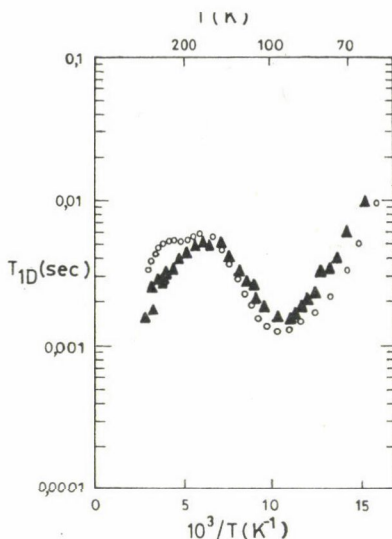
A kristályos fehérjékben lezajló NMR-rel észlelhető mozgásokat a következő kategóriákba lehet osztani:

1. Elsődleges polipeptidlánc-mozgások (a lánc főtengelye körüli gátolt rotáció, aktivációs energiája kb. 120 kJ/mol vagy nagyobb).
2. Másodlagos polipeptidlánc-mozgások (a lánc egyes részeire lokalizált torziós, hajlító mozgások kb. 40–60 kJ/mol aktivációs energiákkal).
3. Oldalláncmozgások (nagy, erősen poláros oldalláncokra 80 kJ/mol vagy a feletti, kis oldalláncokra 10 kJ/mol körüli aktivációs energiákkal).
4. Alacsony molekulasúlyú szennyezések mozgásai (pl. víz hatása).

Az első két mozgástípus elvileg további felbontásra szorulna a szilárd anyagokban sokszor jelenlevő amorf és kristályos régióknak megfelelően. Fehérje kristályokra vonatkozóan azonban még olyan kísérletes bizonyíték nincs, amely ezen felbontást indokolná.

A fehérjék belső dinamikájának vizsgálatára irányuló NMR relaxációs vizsgálatokat a kristályos aminosavakon végzett hasonló mérések előzték meg (ANDREW és mtsai 1977). A fehérje struktúra sok belső szabadsági fokkal rendelkező komplex dinamikai rendszer, így első közelítésben az alapvető mozgásformák megismerésére célszerűnek látszott egyszerű homopolipeptideken tájékozódó vizsgálatokat végezni. A kristályos polialaninon, polileucinon és polivalinon végzett hőmérsékletfüggő T_1 méréseink (ANDREW és mtsai 1978) a polimerek oldalláncaiban elhelyezkedő metil-csoportok domináló hatását mutatták ki ezen molekulák proton mágneses relaxációjára. A metil-csoportok mozgásának hatása annyira erősnek bizonyult ezen anyagoknál, hogy teljesen lehetetlenné tette minden más, a polimerekre jellemző mozgás NMR-es detektálását. Az észlelt mozgások frekvenciatartománya tipikusan 10^8 Hz, aktiválási energiájuk 10 kJ/mol köré tehető. A polipeptid lánc dinamikájára fordítva figyelmünket célszerűnek látszott két további homopolipeptid vizsgálata is, nevezetesen a poliglicin és a poliprolin. Ezek az anyagok metil-csoporttól mentesek és az oldalláncmozgások zavaró hatásával sem kellett számolnunk. A poliglicin esetében valóban sikerült a fő polipeptidlánc mozgását észlelnünk az általunk használt NMR relaxációs technikával, azonban a poliprolinnál ismét nem várt, a metil-csoportok hatásához hasonló, erős relaxációs folyamatra bukkantunk. A poliprolinra vonatkozó eredményeink a prolin gyűrű belső mozgására épülő elméleti relaxációs modellel egybevágnak, így a szokatlanul erős proton-relaxáció forrását ebben az esetben a prolin gyűrű belső átfordulásai-ban látjuk (ANDREW és mtsai 1981).

A fenti modellvegyületeken végzett kísérletek után megvizsgáltunk néhány természetes eredetű fehérjét, név szerint a lizozimot, α -kimotripsint és a ribonukleáz (ANDREW és mtsai 1980). Egyrészt a hagyományos T_1 -hőmérséklet függésén keresztül, másrészt pedig a dipoláris térben végzett T_{1D} mérésekkel kívántunk ezen molekulák esetében a belső mozgások széles frekvenciatartományáról felvilágosítást kapni. Széles hőmérséklet (50–300 K)- és frek-



2. ábra. Kristályos lizozim dipoláris spin-rács relaxációs idejének (T_{1D}) hőmérsékletfüggése O-deuterált, és $\blacktriangle$ -normál mintán mérve. Magasabb hőmérsékleteken a görbék letörése a fehérjén belüli másodlagos láncmozgások jelenlétére utal

venciatartományban (18–60 MHz) végzett T_1 méréseink tanúsága szerint a fehérjék általános tulajdonsága, hogy bennük a protonrelaxáció elsődleges forrását az energia spin-diffúzió útján történő átadása jelenti a polipeptid váz mentén elszórtan elhelyezkedő metil-csoportok felé (l. pl. 1. ábra). A vizsgált fehérjék esetén egyéb mozgások is kimutathatóan hozzájárultak a protonrelaxációs folyamathoz, mint pl. más, metil-csoportot nem tartalmazó oldalláncok, valamint a kristályszerkezetben elhelyezkedő vízmolekulák mozgása. Ezen következtetéseinket az említett fehérjék hőmérséklet függvényében mért spin-rács relaxációs idejének a Kubo—Tomita-moddal való összevetéséből állapítottuk meg. A Kubo—Tomita-modell által az izolált CH_3 -csoportokra megjósolt C relaxációs paraméter ugyanis önmagában nem bizonyult elegendőnek az általunk vizsgált fehérjék erős relaxációs viselkedésének (nagy relaxációs paraméter érték) leírására. Az elmélet és a kísérleti eredmények között fennálló ellentmondást egyéb, a fehérjén belüli mozgások által generált relaxációs mechanizmusok feltételezésével lehetett csak feloldani, illetőleg a tapasztalt eltérés ezek jelenlétét bizonyítja.

A lizozim és az α -kimotripszin esetén ugyanakkor a T_{1D} mérések a fenti mozgások mellett magasabb hőmérsékleten (200 K felett) egy újabb, korábban nem észlelt aktív relaxációs forrás jelenlétére utalnak (2. ábra). Ezt a relaxációs forrást, mivel a hozzá rendelhető korrelációs frekvencia meglehetősen alacsony, 100 Hz, egyértelműen a polipeptid lánc másodlagos mozgásaival hoztuk összefüggésbe (GÁSPÁR és mtsai 1982).

A fenti kísérletek azon túl, hogy a kristályos fehérjén belül is aktív mozgások jelenlétét bizonyítják, rávilágítanak egy ezen makromolekulákon belül létező, alapvető energiaátadási mechanizmusra. Ez az intramolekuláris energiaátadási mechanizmus jelentősen közrejátszhat abban, hogy a fehérjék képesek legyenek katalitikus funkciójuk ellátására.

IRODALOM

- ANDREW, E. R., HINSHAW, W. S., HUTCHINS, M. G., SJOBLÖM, R. O. I.: *Mol. Phys.* **34**, 1695—1706 (1977).
- ANDREW, E. R., GÁSPÁR, R., WENNARD, W.: *Biopolymers* **17**, 1913—1925 (1978).
- ANDREW, E. R., BONE, D. N., CASHELL, E. M., GÁSPÁR, R., MENG, Q. A., BRYANT, D. J.: *Pure & Appl. Chem.* **54**, 585—594 (1982).
- ANDREW, E. R., BRYANT, D. J., CASHELL, E. M., GÁSPÁR, R., MENG, Q. A.: in: *Proc. of International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, Bendor, France (1980). megjelenés alatt.
- ARTYMIUK, P. J., BLAKE, C. C. F., GRACE, D. E. P., OATLEY, S. J., PHILLIPS, D. S., STERNBERG, M. J. E.: *Nature* **280**, 563—568 (1979).
- CARERI, G., FASELLA, P., GRATTON, E.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **8**, 69—97 (1979).
- DAMJANOVICH, S., SOMOGYI, B.: in: *New Trends in the Description of the General Mechanism and Regulation of Enzymes* (Eds.: Damjanovich, S., Elődi, P., Somogyi, B.) *Symp. Biol. Hung.* **21**. Akad. Kiadó, Budapest 169—184 (1978).
- FRAUENFELDER, H., PETSCH, G. A., TERNOGLOU, D.: *Nature* **280**, 558—563 (1979).
- GÁSPÁR, R., jr., ANDREW, E. R., BRYANT, D. J., CASHELL, E. M.: *Chem. Phys. Letters* **86**, 327—330 (1982).
- JARDETSKY, O., WADE-JARDETSKY, N. G.: *FEBS Letters* **110**, 113—135 (1980).
- KUBO, R., TOMITA, K.: *J. Phys. Soc. Japan* **9**, 888—919 (1954).
- MCCAMMON, J. A., GELIN, B. R., KARPLUS, M.: *Nature* **267**, 585—590 (1977).
- WUTHRICH, K.: *NMR in biological research: peptides and proteins*. North-Holland, Amsterdam (1976).