

NMR spektroszkópia a fehérje biokémiában

Závodszy Péter – Beinrohr László
MTA SzBK Enzimológiai Intézet

NMR spektroszkópia a fehérje biokémiában

Závodszy Péter – Beinrohr László
MTA SzBK Enzimológiai Intézet

- **Kémiai eltolódás, 1D-s spektrumok**
- **Vonalszélesség és jeleloszlás**
 - denaturált vagy feltekeredett
 - aggregáció és flexibilitás
- **Izotópos jelölés, több dimenziós spektroszkópia**
 - fehérje „ujjlenyomatok”
 - ligandumkötés, „SAR by NMR”
 - konformáció nagy fehérjékre
 - szerkezet kis fehérjékre

Az NMR spektroszkópia a technikai fejlődés eredményeként mára a fehérje biokémia fontos és mással nem pótolható eszköze lett. Alkalmas szerkezet meghatározásra, a konformációs dinamika leképezésére, fehérje-fehérje kölcsönhatások leírására, kötőhelyek sztereokémiai szintű feltérképezésére egyebek között.

A fehérjék fontos vonása a dinamikus térszerkezet



Különös jelentősége van az NMR módszernek a fehérjék konformációs flexibilitásával összefüggő jelenségek vizsgálatánál, mivel - szemben a röntgen diffrakciós technika által szolgáltatott statikus képpel - az NMR tükrözi az atomi szintű mozgásokat és kicserélődési folyamatokat.

Kémiai eltolódás

Egy fehérjében még az egyforma atommagoknak sem lesz egyforma a rezonancia frekvenciája! Ennek oka az árnyékolás.

• A magot körülvevő elektronok a B_0 térrel ellentétes mezőt generálnak - az atommag csökkent mágneses teret érez.

• Az árnyékolás nagysága az atommagot körülvevő elektronfelhő sűrűségétől függően változik.

Árnyékolás csökken
Nagyobb rezonancia
frekvenciák

Árnyékolás nő
Kisebb rezonancia
frekvenciák

amid
protonok



Nagy elektronszívó
hatás – kisebb
 ^1H árnyékolás!

Kis elektronszívó
hatás – nagyobb
 ^1H árnyékolás!

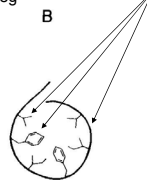
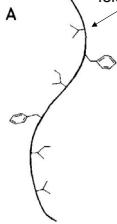


A kémiai eltolódás tulajdonképpen egy-egy atommag közvetlen környezetét tükrözi (árnyékolás), így nagy felbontású szerkezeti információt tartalmaz.

Denaturált és „feltekeredett” fehérjék

A természetes térszerkezettel (B) rendelkező fehérjékben más a protonok környezete, mint denaturált vagy „random coil” (A) szerkezetekben.

Kitekeredett fehérjékben egy adott proton eltolódása a sokféle szerkezetben tapasztalt érték átlagának felel meg



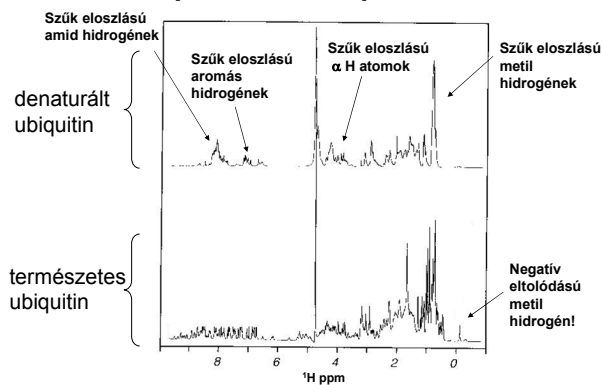
Feltekeredett fehérjékben egy adott proton eltolódását befolyásolják a térben közeli csoportok, a fehérjévéz konformációja, stb. Az effektusok nem átlagolódnak ki, mert általában egy határozott szerkezet létezik.

Tehát néhány proton „különleges” környezetben lehet, és ehhez mérten eltolódása távol lehet az átlagtól!

Alkalmazási lehetőség rendezett és rendezetlen fehérjék közötti különbségtétel. A rendezetlen fehérjékben az atomok eltolódása egy átlagos értékhez közelít, míg rendezett esetben egyes eltolódások igen távol eshetnek az átlagtól.

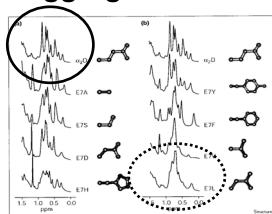
Példa az előbbire: denaturált és természetes ubiquitin 1D ^1H NMR spektruma. A denaturált fehérje spektruma láthatólag jelszegényebb, és a jelek csoportokba rendezhetők. A természetes fehérje spektruma sokkal változatosabbnak tűnik, a jelek nem asszignálhatók egyértelműen. Figyelemre méltóak a negatív tartományban levő protonjelek, amelyek csakis rendezett fehérjék spektrumaiban fordulnak elő. Mindez az egyes magok környezetének egyedi voltából következik – vagyis a rendezett térszerkezetből.

Denaturált és feltekeredett fehérjék proton NMR spektruma



Az egyszerű 1D-s protonspektrum jeleinek félérték szélessége is hasznos információt hordoz. Ha a jelek szélesebbek a vártnál, általában aggregációt jelent, de a fehérje megnövekedett flexibilitására is utalhat.

Jelkiszélesedés 1D-s spektrumokban: aggregáció és konformációs flexibilitás



Hill és DeGrado (2000) Structure 8: 471-9

Hill és DeGrado metilcsoportok hidrogénatomjainak jeleoszlását és kiszélesedésüket mérte 1D-s ^1H NMR spektrumokból. Ebből következtettek mutáns $\alpha_2\text{D}$ fehérjék flexibilitására.

•A jelszélességeknek általában meg kell felelnie a várt méretű fehérjének.

•A vártnál nagyobb félértékszélesség aggregációra utalhat.

•Azt is jelentheti, hogy több kissé eltérő konformer van jelen.

•A konformációs flexibilitás szűkíti a jelek eloszlását is.

Vizsgálták például az $\alpha_2\text{D}$ mesterséges fehérjét és pontmutánsait. Bizonyos mutánsok proton NMR spektruma - amely mutánsok *nem* aggregálódtak (ultracentrifugával ellenőrizhető) és másodlagos szerkezetük sem változott meg (CD spektroszkópiával ellenőrizhető) – markáns eltérést mutattak a kiindulási fehérjéhez képest. Ebből a fehérjék megnövekedett konformációs flexibilitására következtethetünk.

Az egy dimenziós NMR spektrumok korlátai

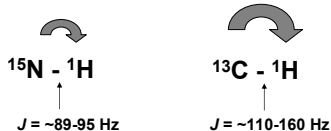
Általában az 1D-s NMR spektrumok csak kvalitatív információt adnak fehérjéről, azaz...

- Van-e állandó, meghatározott szerkezete az NMR mérés körülményei között?
- Aggregálódott-e?

Az igen kicsinek számító, 6 000 molekulatömegű fehérjéknek is igen bonyolult 1D-s spektrumuk van, szerves kismolekulákéval összehasonlítva!

Dimenziók hozzáadása: izotópos jelölés

- Nagyon sok átfedő jel van a fehérjék 1D-s spektrumában.
- Egy módszer az átfedés csökkentésére a fehérjék nitrogén és/vagy szén jelölésén alapszik.
- Összefüggést keresnek a ^{15}N és/vagy ^{13}C jelek és az olyan protonok jelei között, amelyek közvetlenül kapcsolódnak a szóbanforgó atomokhoz.



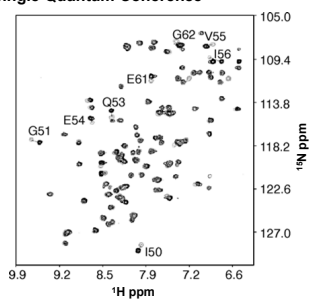
^{15}N - ^1H HSQC spektrum: fehérjék ujjlenyomata

Heteronuclear Single Quantum Coherence

• Jel ott van, ahol egy proton és egy kapcsolódó ^{15}N atom eltolódása metszi egymást.

• Körülbelül annyi jel van, ahány aminosav - a ^{15}N - ^1H HSQC spektrum a fehérje NMR ujjlenyomata lehet.

• A spektrum széthúzása a síkon megnöveli a felbontást.



Egy fehérje HSQC spektruma ligandum jelenlétében (fekete), és ligandum nélkül (világos). Néhány csúcs elmozdul, a többi nem – specifikus adszorpció!

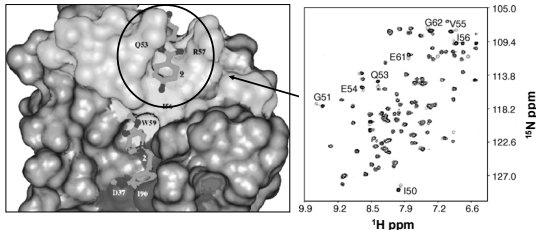
1D-s ^1H NMR spektrumok felvétele általában nem ütközik nehézségekbe, hiszen a minták nem igényelnek különleges előkészítést és a spektrumuk is egyszerű. Számos hasznos információ nyerhető belőlük, de kvantitatív szerkezeti információ nem kapható belőlük még igen kicsinek számító fehérjék esetén sem, mivel több száz vagy ezer átfedő jel várható egy szűk jeltartományba!

Megoldást az átfedő jelek szétválasztása jelenti. A ^{15}N és ^{13}C atommagokkal „jelölt” fehérjék előállítása körülményesebb, viszont az eddig 1 dimenziós spektrum több dimenzióba kerül, az átfedő jelek szétválnak. Ezen túl összefüggést kaphatunk az atomok közvetlen kapcsolatáról, vagyis a szerkezetéről.

Például ^{15}N - ^1H HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) spektrumban ott kapunk jelet, ahol kapcsoló atomok eltolódásai metszik egymást. Az egy dimenziós spektrumban levő, egymást fedő jeleket megkülönböztethetjük aszerint, hogy mely atomokhoz kapcsolódnak.

A HSQC spektrum változásaiból szerkezeti információt nyerni

- HSQC spektrumokat rutinszerűen használnak ligandkötés detektálására.
- Ez az alapja a "SAR by NMR" módszernek. SAR = „structure-activity relationships”.
- Ha tudni akarjuk, hogy a ligand hova kötődik, „mindössze” azokat a jeleket kell azonosítani, amelyek elmozdultak.



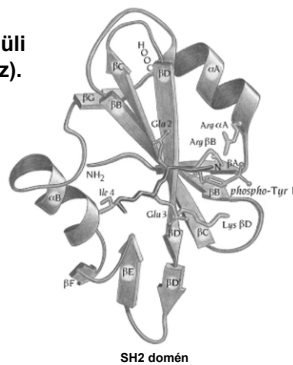
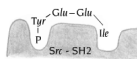
„Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR”
Shuker et al. *Science* (1996) 274: 1531-4

Példa: egy fehérje ^{15}N - ^1H HSQC spektruma ligandum jelenlétében és anélkül. Bizonyos jelek megváltoztak a ligandumkötés hatására, a többsége nem: ez specifikus, adott helyhez való kötődést jelez! Ez az alapja a “SAR by NMR” módszernek, mivel detektálhatók a függetlenül kötődő ligandumok, amelyeket végül kovalensen összekapcsolva még erősebben kötődő ligandumok állíthatók elő.

Az SH2 domén szerkezete

- Számos fehérjében megtalálható – sejten belüli jelátvitel (Src tirozin kináz).

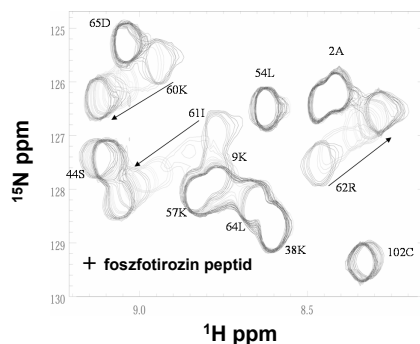
- Megközelítőleg 100 aminosav hosszú.



SH2 domén

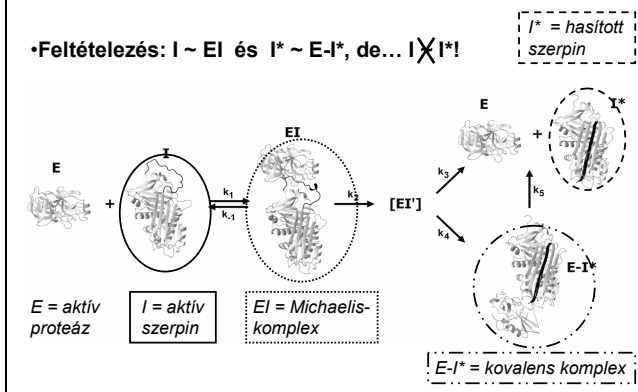
Másik példa: az SH2 fehérje család tagjai a sejten belüli jelátvitelért felelősek. A fehérjék foszforilált tirozin aminosavtartalmú molekulákat kötnek meg. ^{15}N - ^1H HSQC spektrumból sikerült azonosítani a kötőhelyet és a jelátvitelért felelős szerkezeti elemeket.

A foszfortirozin peptid kötődése az SH2 doménhez



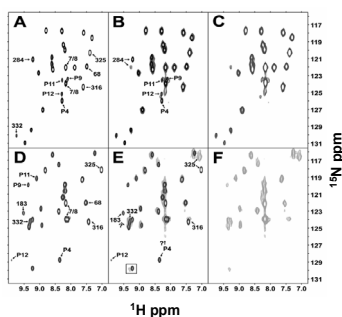
Szerpinek: változatos konformációk, a feltételezett mechanizmus

•Feltételezés: $I \sim EI$ és $I^* \sim E-I^*$, de... $I \not\sim I^*$!



A szerpinek szerin proteáz inhibitor fehérjék. Az alábbi reakciómechanizmus általánosan elfogadott, de igazolására ezidáig csak közvetett módon került sor. A szerpinek specifikusan, proteázok álszubsztrátjaként működnek, a proteáz egy felszínén lévő hurok régióba (Reactive Center Loop, RCL) támad. Ezután a szerpinmolekula RCL régiója elhasad és beékelődik a szerpin kiterjedt β -réteg struktúrájába. Ennek során megsérül a proteáz katalitikus hármának szerkezete, a proteáz inaktíválódik. Ha a reakció sikeres, a proteáz kovalensen a szerpinhez kötve marad, egyébként a szerpin hasadt formában keletkezik.

Szerpin fehérje módosulatok ^1H - ^{15}N HSQC NMR spektrumai



Szelektívén ^{15}N -Ala aminosavval jelölt szerpin módosulatok.

A = aktív szerpin
B = A+C
C = Michaelis komplex
D = hasított szerpin
E = D+F
F = kovalens komplex

Az NMR spektrum igazolja a feltételezett gátlási mechanizmust!

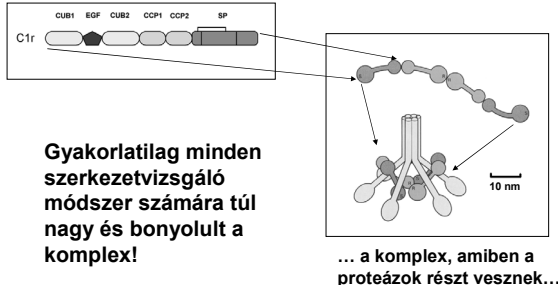
Dobó J. JBC (2004) 279: 9264-9

A szerpin minden alanin aminosavát - és csak azokat - specifikusan jelöljük. Felvehető a szerpin-enzim reakció intermediereinek számító szerpin módosulatok ^{15}N - ^1H HSQC spektruma. Kiderült, hogy a szerpinmolekulának *önmagában* hasonló a spektruma, mint a *nemkovalens* szerpin-enzim intermedierek. Hasonlónak bizonyult az *elhasított* szerpinmolekula spektruma a *kovalens* szerpin-enzim végtermékhez is. Viszont a hasított szerpinmolekula spektruma egyáltalán nem egyezett az aktív szerpinével, de ami fontosabb, a Michaelis komplexével sem! Ebből kiderült, hogy a feltételezett mechanizmus valóban megfelel a korábbi hipotéziseknek.

C1r és rokonai: molekulakomplexek és moduljaik

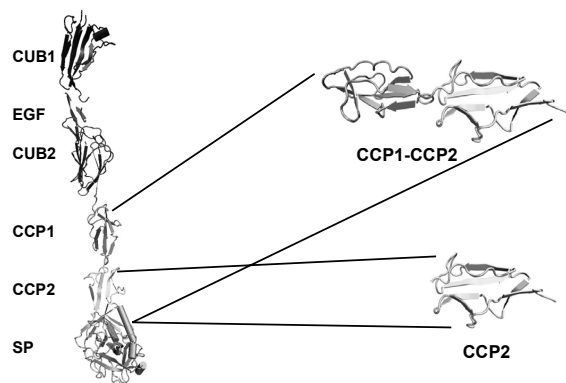
C1r és a rokonai: C1s, MASP-1,-2,-3

Moduláris szerkezetük egyforma...



A C1r és rokon proteázai az immunrendszer aktiválásában vesznek részt. Nagyméretű, moduláris szerkezetükben egyforma proteázok, összetett molekuláris komplex alkotóelemei. Megfelelő részletességű szerkezeti információ egyik ismert szerkezetvizsgáló módszerrel sem nyerhető.

A modulok szerkezetvizsgálata NMR technikával



Megoldás: az egyedi fehérje-régiók szerkezete fiziológias körülmények között információt adhat legalább a régiók orientációjáról és flexibilitásáról a komplexben. Az NMR technika erre a célra különösen alkalmas lehet.

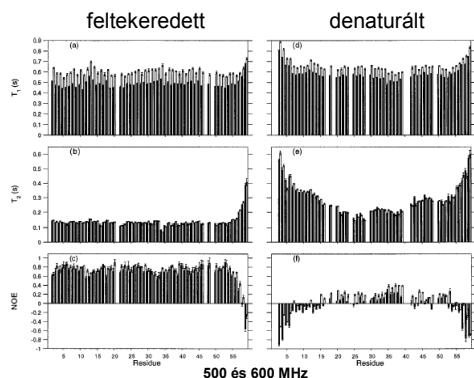
NMR relaxációs folyamatok időállandója sok tényezőtől függ, többek között a molekulák mozgékonyaságától is. Ezért jól használható a fehérjén belüli mozgások jellemzésére.

NMR relaxáció

- A relaxáció révén a mágneses gerjesztettség visszatér az egyensúlyba (T_1), vagy a spontán rendezetlenségbe (T_2 , entrópia).
- A két relaxációs folyamat aránya összefügg a molekula méretével (rotáció).
- T_1 nő a biomolekula növekvő méretével, míg T_2 csökken azzal.
- A „steady-state” ^1H - ^{15}N NOE az N-H kötési vektor mozgásának változását méri, növekvő értéke a kötés fokozott merevségét jelzi.

Egy SH2 domén fehérje analízise relaxációs adatokkal. Az ábrán egyes aminosavakhoz tartozó relaxációs idők találhatók, külön a természetes, külön a denaturált fehérjére. A spin-rács relaxációs folyamatok (T_1) nem különböznek lényegesen. A spin-spin relaxációs idők (T_2) viszont megnöttek a denaturált fehérje végein. Ez a különbség tükröződik a NOE kísérletben is.

SH2 domén relaxációs analízise

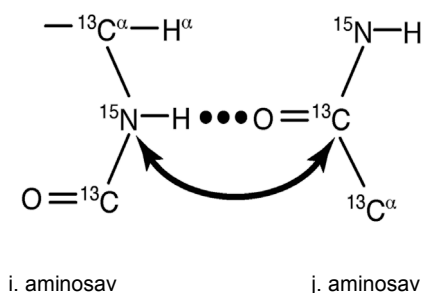


Hidrogén-deutérium kicserélődés

- A hidrogén-deutérium kicserélődési arány az amid protonok deutériumra cserélődését méri.
- A lassú amid proton kicserélődés az N-H csoportok oldószerrel szembeni védelmet mutatja.
- A kicserélődés jelentősen lecsökken, ha a hidrogénatom hidrogénkötésben vesz részt, különösen akkor, ha a kötés a molekula felszínén van.
- A hidrogén-deutérium kicserélődési arány számos tényezőtől függ, mint a pH, a donor csoport pK-ja, hőmérséklet, oldószer hozzáférhetőség.

NMR spektroszkópiával a fehérje konformációs flexibilitása más úton is vizsgálható. Ha a mintát nehézvízbe helyezzük, a protonok flexibilitástól függő sebességgel cserélődnek deutériumra. A deutérium eltolódása távol esik a protonokétól, így a cserereakció sebessége a jelintenzitás csökkenéséből kiszámítható.

^1H - ^{13}C korreláció fehérjékben

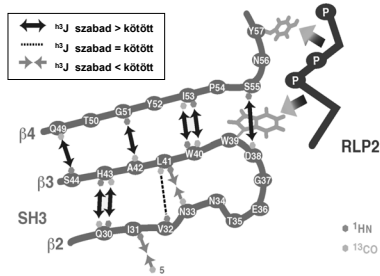


A fehérjéken belüli hidrogénhidak detektálása is lehetséges, mivel olyan atomok rezgései is csatolódnak, melyek között csak hidrogénkötés van!

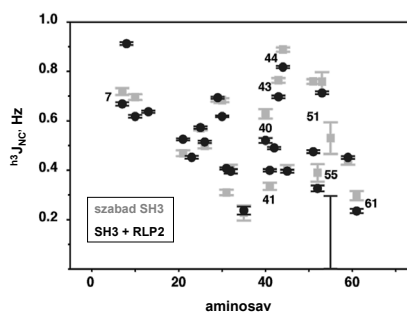
Ezt a jelenséget használták ki az SH3 fehérje domén vizsgálatánál. Azt találták, hogy a ligand (prolin gazdag RLP2 peptid) kötés hatására bizonyos hidrogénhidak megrövidültek, mások nem változtak. Ezek az eredmények összhangban vannak a fehérjére már ismert röntgen szerkezetekkel, és bizonyítják, hogy a ligandum „induced fit” mechanizmus szerint fejti ki hatását.

SH3 fehérje és az RLP2 peptid kölcsönhatása

•Kötés hatására megváltoztak az SH3 fehérje hidrogénhidjai.



Változások a $^3J_{NC}$ csatolásokban



A változásokat reprodukálhatóan lehet mérni, és nagyságuk összefüggésbe hozható a hidrogénkötések hossz-változásával.

Az NMR spektroszkópia kezd a biokémia nélkülözhetetlen fegyverévé válni – ezt azonban ma még hátráltatja az igen költségesnek számító technológia.

Összefoglalás

- Az NMR spektroszkópia egyre alkalmasabbá válik arra, hogy segítségével meghatározzuk...

- oldott fehérjék térszerkezetét
- képet kapjunk konformációs flexibilitásukról
- feltérképezzük kötőhelyeiket és kölcsönhatásaikat
- kövessük működésük kinetikáját akár *in vivo*

Az összefoglalás után álljon itt emlékeztetőül ez az ábra, amely 1978-ban, Oxfordban készült, amikor fehérje NMR spektroszkópiával kezdtem foglalkozni.

NMR történelem...

