

ANDRZEJ EJCHART

*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
e-mail: aejchart@ibb.waw.pl*

SPEKTROSKOPIA MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO W WYZNACZANIU BUDOWY BIAŁEK

WSTĘP

Pierwszy, pośredni pomiar momentu magnetycznego jąder wodoru w fazie gazowej w doświadczeniu Sterna-Gerlacha miał miejsce w 1933 r. Jednak bezpośrednia rejestracja sygnału magnetycznego rezonansu jądrowego w fazie skondensowanej została wykonana dopiero w roku 1945 przez F. Blocha, W. W. Hansena i M. Packarda oraz, niezależnie, przez E. R. Purcella, H. C. Torrey'a i R. V. Pounda. Doświadczenie to było początkowo uważane za jedną z wielu pojawiających się wówczas ciekawostek ze świata fizyki atomowej i zainteresowało jedynie nielicznych fizyków. Dopiero odkrycie przesunięć chemicznych w 1950 r. oraz sprzężeń spinowo-spinowych rok później uświadomiło środowisku naukowemu olbrzymie potencjalne znaczenie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) dla badań struktury cząsteczek. W kolejnych dziesięcioleciach nastąpił burzliwy jej rozwój, stymulowany z jednej strony różnorodnością zastosowań

tego typu badań, a z drugiej – stałym postępem technicznym, stwarzającym coraz szersze możliwości badawcze (BECKER i współaut. 1996). Dzięki temu spektroskopia NMR stała się obecnie metodą, która umożliwia otrzymanie informacji o strukturze cząsteczkowej na poziomie atomowym i może odgrywać ważną rolę w proteomice strukturalnej. Tym zagadnieniem został poświęcony niniejszy artykuł.

Docenienie ogromnego znaczenia prac opartych na spektroskopii NMR dla postępu wielu kierunków badań naukowych znalazło między innymi swój wyraz w przyznaniu szeregu nagród Nobla badaczom, którzy najbardziej przyczynili się do jej rozwoju (Felix Bloch i Edward R. Purcell – fizyka 1952, Richard Ernst – chemia 1991, Kurt Wüthrich – chemia 2002, Paul C. Lauterbur i Peter Mansfield – medycyna 2003; patrz art. W. FRONCISZA w tym zeszycie KOSMOSU).

SPEKTROSKOPIA NMR W BADANIU BIAŁEK – UWAGI WSTĘPNE

Jądra izotopów większości ważnych biologicznie pierwiastków, jak węgiel, azot, wodór czy fosfor, charakteryzują się wąskimi sygnałami w widmach NMR. Oddziaływania międzyjądrowe, które są czułe nawet na małe zmiany struktury i konformacji cząsteczki, wpływają na położenia, kształty i intensywności sygnałów (FRIEBOLIN 1999). Ponadto spek-

troskopia NMR stwarza możliwości otrzymania struktur o dużej dokładności w roztworach, co pozwala na porównywanie struktur białek otrzymanych w kryształach i roztworze lub na badania takich białek, które nie krystalizują.

Te ogromne możliwości badawcze spektroskopii NMR na razie nie znajdują odbicia w liczbie struktur dostępnych w bazach danych;

mniej niż 14% struktur białek zdeponowanych w Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) zostało wyznaczonych w oparciu o dane NMR. Szereg przyczyn spowodował taki stan rzeczy i warto wymienić podstawowe powody, które hamowały dotychczas szerokie wykorzystanie NMR w wyznaczaniu przestrzennych struktur białek (ZHUKOV i EJCHART 2003).

Jedną z nich jest niska czułość spektroskopii NMR. Obecnie typowa ilość białka potrzebna do badań NMR wynosi około $0,5 \mu\text{M}$ czyli o kilka rzędów wielkości więcej niż ilość potrzebna do pomiarów optycznych czy w spektrometrii masowej. Ponadto białko nie powinno agregować przy stężeniach rzędu 1 mM/l .

Pomiary NMR są czasochłonne. Białko musi być więc stabilne w roztworze w temperaturze pokojowej co najmniej przez kilkanaście dni.

Sygnały w widmach białek poszczególnych izotopów są silnie ponakładane. Na przykład w białku składającym się z 200 reszt aminokwasowych należy oczekiwać około 1200 sygnałów izotopu ^1H , 1000 sygnałów izotopu ^{13}C i ponad 200 sygnałów izotopu ^{15}N występujących w wąskich przedziałach częstości.

PODSTAWY SPEKTROSKOPII NMR

Izotopy posiadające jądra obdarzone spinami i związanymi z nimi momentami magnetycznymi są magnetycznie czynne i mogą być obserwowane w spektroskopii NMR. Jądra, których spiny są równe $1/2$, mają jedynie momenty magnetyczne i ich sygnały są wąskie. Natomiast jądra, których spiny są większe od $1/2$ mają również momenty kwadrupolowe, które oddziałując silnie z lokalnymi gradientami pola elektrycznego powodują silne poszerzenia sygnałów. Dlatego, o ile dany pierwiastek posiada kilka magnetycznie czynnych izotopów, do badań NMR wybiera się izotop o spinie $1/2$, nawet jeśli jego zawartość w naturalnym składzie izotopowym jest mała. Jako przykład może służyć azot. Pomimo tego, że w przyrodzie dominuje izotop ^{14}N o spinie 1 (ponad 99%), to w spektroskopii NMR powszechnie wykorzystuje się izotop ^{15}N o spinie $1/2$, którego naturalna zawartość wznosi zaledwie 0,37%. Częstość rezonansowa jąder umieszczonych w stałym, silnym, jednorodnym polu magnetycznym B_0 jest dana wyrażeniem (VAN DE VEN 1995):

$$f = \gamma B_0(1 - \sigma)/2\pi$$

Bardzo silny sygnał rozpuszczalnika jakim jest dla białek woda utrudnia obserwację widm ^1H NMR, zwłaszcza ważnego diagnostycznie obszaru sygnałów H_α .

W dużych białkach sygnały ulegają poszerzeniu tracąc strukturę subtelną ze względu na wolniejszą reorientację dyfuzyjną.

Więzy strukturalne otrzymane z widm NMR zazwyczaj są niejednoznaczne, co pozostawia pewną dowolność w ich interpretacji.

Obecnie większość tych niekorzystnych właściwości widm NMR zostało przewyżczonych dzięki ogromnemu postępowi jaki dokonał się w budowie spektrometrów, zastosowaniu nowych technik pomiarowych, znakowaniu izotopowym oraz procedurach komputerowych służących do otrzymania więzów strukturalnych i wykorzystaniu ich w obliczeniach strukturalnych. Dzięki temu liczba zdeponowanych w PDB struktur białek otrzymanych w oparciu o dane NMR w ostatnich latach rośnie lawinowo.

W wyrażeniu tym γ jest stosunkiem magnetycznym charakteryzującym dany izotop, zaś σ jest stałą ekranowania, silnie zależną od rozkładu gęstości elektronowej w pobliżu jądra, a więc zależą od lokalnej struktury cząsteczki; zwykle jest ona rzędu 10^{-4} – 10^{-5} . W praktyce zamiast stałych ekranowania używa się łatwiejsze do wyznaczenia przesunięcia chemiczne δ , które są różnicami pomiędzy sygnałami interesujących jąder a jądrami umownego wzorca, wyrażonymi w postaci bezwymiarowych wielkości:

$$\delta = 10^6(f - f_{ref})/f_{ref} \approx 10^6(\sigma_{ref} - \sigma)$$

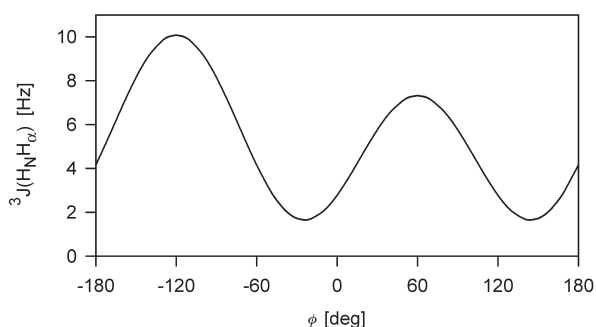
Czynnik 10^6 jest wprowadzony dla wygody i dlatego przesunięcia chemiczne są wyrażone w częściach na milion – ppm. Częstości rezonansowe jąder w NMR dla dostępnych obecnie wartości pól magnetycznych (4,7–21,1 T) są rzędu MHz. Na przykład, dla pola $B_0 = 11,7 \text{ T}$ wartości te wynoszą: $f(^1\text{H}) \approx 500 \text{ MHz}$, $f(^{13}\text{C}) \approx 125,7 \text{ MHz}$ i $f(^{15}\text{N}) \approx 50,7 \text{ MHz}$.

Czułość pomiaru NMR wyrażona jako stosunek sygnału do szumów S/N jest dana przez:

$$S/N = \gamma_i \gamma_d^{3/2} B_0 N^{1/2} / T$$

gdzie γ_i i γ_d są odpowiednio stosunkami magnetogirycznymi jąder pobudzonych początkowo i jąder podlegających detekcji, o ile są one różne. Dlatego pomiary zaczynające się i kończące na jądrach o największej wartości γ (zazwyczaj są to jądra ^1H) charakteryzują się największą czułością. N jest liczbą spójnie dodanych identycznych rejestracji, z czego wynika, że n -krotne zwiększenie S/N wymaga wydłużenia całkowitego czasu pomiaru n^2 razy. Zwiększenie pola magnetycznego i obniżenie temperatury również poprawia czułość pomiaru (VAN DE VEN 1995).

Istnieją dwa typy oddziaływań pomiędzy spinami jądrowymi: przez wiązania chemiczne i przez przestrzeń. Oddziaływanie przenoszone przez wiązania chemiczne, zwane oddziaływaniem lub sprzężeniem spinowo-spinowym, przeważnie ma zasięg nie przekraczający czterech wiązań. Prowadzi ono do pojawienia się rozszczepień sygnałów sprzężonych jąder. Jego wartość, zwana stałą sprzężenia J , zależy od rodzaju pierwiastków i wiązań chemicznych znajdujących się na drodze sprzężenia oraz ich wzajemnej orientacji co powoduje, że stałe sprzężenia zawierają informacje stereochemiczne (EJCHART 1999). Wicynalne stałe sprzężenia przez trzy wiązania, 3J , są szczególnie ważne, gdyż ich wartości zależą od kąta dwuściennego jaki tworzą te wiązania (Ryc. 1). Poza informacjami strukturalnymi, sprzężenia



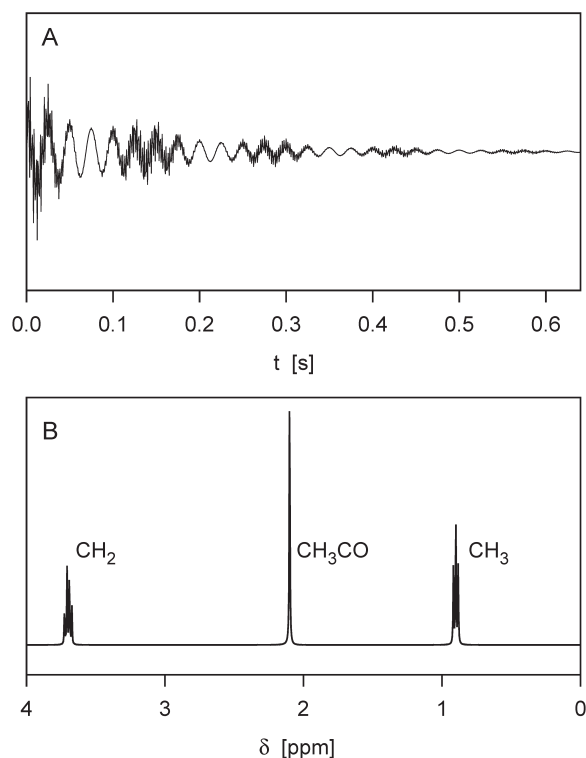
Ryc. 1. Zależność wicynalnej stałej sprzężenia spinowo-spinowego pomiędzy protonami amidowymi H_N i protonami H_α w białkach od kąta dwuściennego ϕ utworzonego przez wiązania $\text{H}_\text{N} - \text{N} - \text{C}_\alpha - \text{H}_\alpha$ po uwzględnieniu jego relacji w stosunku do kąta ($\phi = \phi - 60^\circ$) – jednego z kątów określających konformację szkieletu polipeptydowego. Zależność ta jest opisana krzywą Karplusa: $^3J(\text{H}_\text{N}, \text{H}_\alpha) = A \cos^2 \phi + B \cos \phi + C$, dla której w tym przypadku $A = +7,0$ Hz, $B = -1,4$ Hz oraz $C = +1,7$ Hz.

spinowo-spinowe są wykorzystywane do przeniesienia polaryzacji – techniki pozwalającej na zwiększenie czułości pomiaru NMR. Do tego celu najbardziej przydatne są sprzężenia heterojądrowe charakteryzujące się dużymi wartościami bezwzględnymi $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C}) > 120$ Hz i $^1J(^1\text{H}, ^{15}\text{N}) < -90$ Hz.

Oddziaływanie dwóch spinów jądrowych przez przestrzeń, to oddziaływanie dwóch dipoli magnetycznych. Stała sprzężenia dipolowego, D , zależy od odległości pomiędzy oddziałującymi jądrami oraz od ich stosunków magnetogirycznych: $D_{ij} \sim \gamma_i \gamma_j r_{ij}^{-3}$. Typowe wartości stałych sprzężenia dipolowego, leżących blisko w przestrzeni jąder, mogą być o kilka rzędów wielkości większe niż stałe sprzężenia spin-spin. Na przykład, w białkach $D(\text{C}_\alpha, \text{H}_\alpha) \approx -24$ kHz lub $D(\text{N}, \text{H}_\text{N}) \approx 11,5$ kHz. Jednak w odróżnieniu od sprzężeń spinowo-spinowych, sprzężenia dipolowe, których efektywne wartości zależą od orientacji wektora r_{ij} względem kierunku pola B_0 , w izotropowych roztworach zostają uśrednione do zera i nie powodują rozszczepień sygnałów w widmach NMR. Pomimo tego, oddziaływania dipolowe w roztworach izotropowych są odpowiedzialne za powstanie jądrowego efektu Overhausera (NOE). NOE przejawia się w widmie jako zmiana intensywności sygnału pochodzącego od jądra sprzężonego dipolowo z jądrem, którego stan równowagi termodynamicznej został zakłócony; wielkość tego efektu jest proporcjonalna do D^2 , czyli do r^6 . Zatem szybko malejący, ze wzrostem r , NOE zawiera informacje o odległościach międzyjądrowych (NEUHAUS i WILLIAMSON 1989).

Sprzężenia dipolowe można częściowo zachować w widmach NMR białek rozpuszczonych w roztworach anizotropowych. Ich obserwowane wartości (tak zwane resztkowe sprzężenia dipolowe), które zależą od stopnia orientacji cząsteczek białka przez czynnik anizotropowy, mają wartości znacznie mniejsze od maksymalnych. Wartości te, jak wspomniano wcześniej, zależą od orientacji wektora r_{ij} względem kierunku pola B_0 i stanowią nowy, cenny rodzaj więzów strukturalnych (EJCHART i GRYFF-KELLER 2000).

W standardowym impulsowym eksperymencie NMR, po wytworzeniu nierównowagowego stanu układu spinowego (przygotowanie) może nastąpić przekazanie oddziaływania pomiędzy różnymi spinami (mieszanie), po którym ma miejsce rejestracja sygnału stanowiącego odpowiedź układu spino-



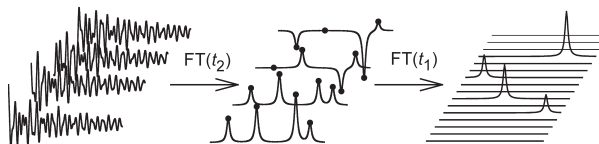
Ryc. 2. Sygnał zaniku swobodnej precesji jąder ^1H próbki zawierającej roztwór octanu etylu, $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ (A) oraz otrzymane z niego przez transformację fourierowską widmo NMR (B).

Położenia, struktura subtelna (rozszczerzenia) oraz względne intensywności sygnałów charakteryzują jednoznacznie poszczególne grupy jąder. Sygnał octanowej grupy metylowej jest singletem (brak sprzężeń z innymi, odległymi jądrami ^1H w cząsteczce) o względnej intensywności 3. Sygnały grup CH_2 i CH_3 etylu estrowego o względnych intensywnościach 2 i 3 są rozdzielone przez wycynalne sprzężenie spinowo-spinowe.

wego na zakłócenie (detekcja). Tak otrzymany sygnał nosi nazwę sygnału zaniku swobodnej precesji (FID) i jest funkcją czasu. Operacja transformacji Fouriera zamienia ten sygnał na równoważną mu funkcję częstości, czyli widmo NMR, które w takim przypadku jest nazywane widmem jednowymiarowym – 1D (Ryc. 2). W widmach 1D każde jądro jest scharakteryzowane przez położenie sygnału dane jego częstością lub przesunięciem chemicznym. W przypadku identycznych wartości przesunięć chemicznych kilku sygnałów, co często ma miejsce w widmach liczących setki sygnałów, ich jednoznaczne przypisanie poszczególnym jądrom zazwyczaj nie jest możliwe. Takie niejednoznaczności mogą być czę-

ściowo lub całkowicie usunięte przez zastosowanie technik wielowymiarowych.

W widmach dwuwymiarowych (2D), po okresie przygotowania, zakłócone spiny są po-



Ryc. 3. W pomiarze widma dwuwymiarowego otrzymuje się zbiór sygnałów FID tworzących macierz danych w dziedzinie czasu (t_1 , t_2).

Ewolucja powoduje modulację sygnału FID rejestrowanego w czasie t_2 częstościami występującymi podczas t_1 . Efektem jest zmienność intensywności i faz sygnałów pojawiających się w widmach NMR po serii transformacji fourierowskich względem t_2 . Dane znajdują się teraz w mieszanej dziedzinie (t_1 , ν_2). Zbiór i -tych punktów widm otrzymanych dla systematycznie rosnących wartości t_1 (\bullet) tworzy interferogram (analogiczny do sygnału FID) zawierający informacje o częstościach ewoluujących podczas t_1 . Seria transformacji fourierowskich względem t_1 wykonanych kolejno dla wszystkich punktów widma w dziedzinie ν_2 prowadzi do powstania widma dwuwymiarowego w dziedzinie częstości (ν_1 , ν_2), w którym każdy sygnał jest scharakteryzowany przez dwie częstości.

zostawione na pewien czas, w którym ewoluują z charakterystycznymi dla siebie częstościami (evolucja – t_1). W czasie mieszania częstości te mogą modulować oscylacje innych spinów rejestrowane podczas detekcji – t_2 . Równomierne zwiększanie czasu ewolucji prowadzi do zbioru widm 1D o różnych fazach modulacji występujących w nich oscylacji, w których pojawia się druga zależność od czasu – czasu ewolucji (oprócz występującej także zależności od czasu detekcji). Dwie kolejne transformacje Fouriera prowadzą w takim przypadku do widma, w którym każdy punkt jest scharakteryzowany przez dwie częstości (Ryc. 3). Jeżeli spiny podlegające ewolucji i detekcji należą do tego samego izotopu, to widmo nosi nazwę widma homojądrowego i zawiera dwa rodzaje sygnałów: znajdujące się na przekątnej sygnały diagonalne ($f_1 = f_2$), odpowiadające sygnałom pojawiającym się w widmie 1D, oraz pojawiające się poza przekątną sygnały korelacyjne, których współrzędne $f_1 \neq f_2$ odpowiadają częstościom oddziałujących spinów jądrowych. Charakter oddziaływania (spinowo-spinowe lub dipolowe) jest wybierany przez odpowiednią konstrukcję okresu mieszania. Jeżeli spiny podle-

gające ewolucji i detekcji należą do różnych izotopów, to widmo nosi nazwę widma heterojądrowego i zawiera jedynie sygnały korelacyjne. Takie postępowanie można uogólnić na trzeci i dalsze wymiary przez dodanie do sekwencji pomiarowej dodatkowych czasów ewolucji i mieszania. W widmach wielowymiarowych każdy sygnał korelacyjny jest scharakteryzowany przez dwie lub więcej częstości, co najczęściej pozwala usunąć niejednoznaczności występujące w odpowiednich widmach jednowymiarowych (VAN DE VEN 1995). Należy

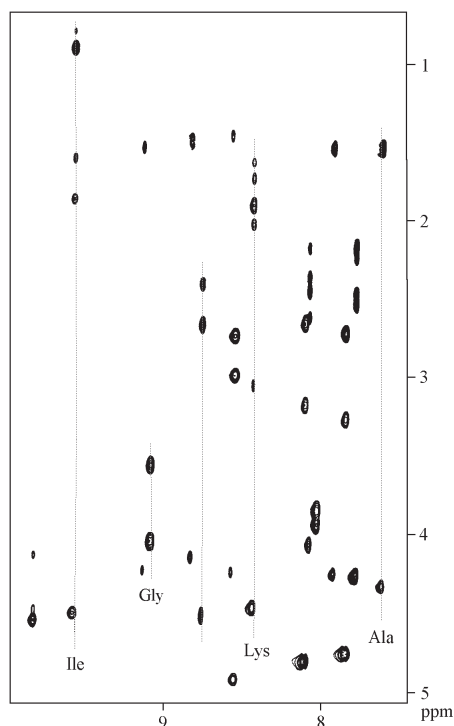
jednak uświadomić sobie poważny mankament widm wielowymiarowych. Aby zapewnić dostatecznie dobrą rozdzielczość w każdym z wymiarów, odpowiadające im czasy ewolucji muszą być dostatecznie długie. Ponieważ całkowita liczba pojedynczych pomiarów jest równa iloczynowi liczb inkrementów podczas każdego czasu ewolucji, więc całkowity czas pomiaru rośnie potęgowo z liczbą wymiarów widma, często przekraczając granice stabilności czasowej spektrometru.

METODY WYZNACZANIA BUDOWY PRZESTRZENNEJ BIAŁEK OPARTE NA SPEKTROSKOPII NMR

Wyznaczenie struktury przestrzennej cząsteczki białka z wykorzystaniem spektroskopii NMR składa się z trzech etapów. W pierwszym etapie dokonuje się przypisań możliwie największej liczby sygnałów w widmie lub widmach magnetycznie czynnych izotopów. Oznacza to, że sygnały są jednoznacznie identyfikowane z jądrami atomów o znanej lokalizacji w strukturze pierwszorzędowej. Następnie wykonuje się pomiary dostarczające informacje o więzach strukturalnych: odległościach międzyjądrowych (NOE) i kątach dwuściennych (sprzężenia spinowo-spinowe). Ostatnim etapem jest obliczenie takiej struktury przestrzennej cząsteczki, w której spełnione są otrzymane doświadczalnie więzy strukturalne (DYSON i WRIGHT 1994). Metody stosowane

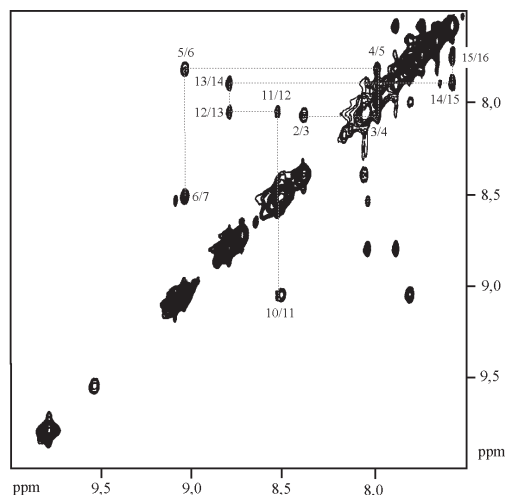
w pierwszych dwóch etapach są determinowane wielkością badanej cząsteczki, podczas gdy obliczenia struktury zależą od rodzaju, liczby i dokładności więzów strukturalnych.

Do badania małych białek, o masach cząsteczkowych nie przekraczających 10 kDa, najczęściej wystarczające jest wykorzystanie informacji zawartych w dwuwymiarowych widmach ^1H NMR (WÜTHRICH 1986). W identyfikacji sygnałów należących do protonów znajdujących się w resztach aminokwasowych, posiadających układy spinowe o określonej topologii, wykorzystuje się sprzężenia spinowo-spinowe (Ryc. 4). Natomiast sekwencyjne przypisanie układów spinowych – oparte na występowaniu NOE pomiędzy parami protonów znajdujących się w sąsia-



Ryc. 4. Fragment dwuwymiarowego widma ^1H NMR wykonanego dla wodnego roztworu heksadekapeptydu, w którym sygnały korelacyjne pojawiają się przy przesunięciach chemicznych wszystkich jąder tworzących układ spinowy; widmo takie nosi nazwę TOCSY (ang. total correlation spectroscopy).

Jest to technika najczęściej stosowana do identyfikacji i grupowania sygnałów należących do poszczególnych reszt aminokwasowych. Na osi odciętych odczytywane są przesunięcia chemiczne protonów H_N , a na osi rzędnych – przesunięcia chemiczne pozostałych protonów w danej reszcie aminokwasowej. Liniami przerywanymi zaznaczono korelacje dla kilku przykładowych reszt. Liczba i położenia sygnałów korelacyjnych charakteryzują budowę danej reszty aminokwasowej. Np. dla alaniny (Ala) przy przesunięciu chemicznym $\delta(\text{H}_\text{N}) = 7,58$ widać kolejno korelacje z H_α ($\delta = 4,28$) oraz H_β ($\delta = 1,49$).

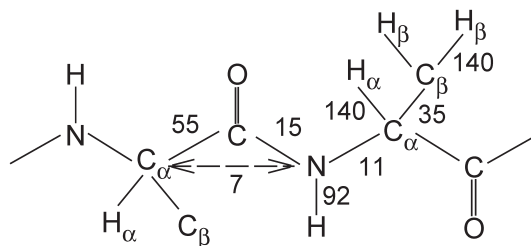


Ryc. 5. Fragment dwuwymiarowego widma ^1H NMR, w którym sygnały korelacyjne pojawiają się przy przesunięciach chemicznych par jąder oddziałujących dipolowo; widmo takie nosi nazwę NOESY (ang. nuclear overhauser effect spectroscopy).

Widmo wykonano dla heksadekapeptydu, którego widmo TOCSY przedstawiono na ryc. 4. Oprócz sygnałów diagonalnych leżących na przekątnej widma, widoczne są sygnały korelacyjne $\text{H}_\text{N}(i)/\text{H}_\text{N}(i+1)$ pozwalające określić położenie danej reszty aminokwasowej w sekwencji. Liniami przerywanymi zaznaczono dwa fragmenty przypisań sekwencyjnych.

dujących resztach aminokwasowych, najczęściej $\text{H}_\text{N}(i)/\text{H}_\text{N}(i+1)$ i $\text{H}_\alpha(i)/\text{H}_\text{N}(i+1)$ – kończy przypisania sygnałów ^1H (Ryc. 5). Doświadczalne więzy strukturalne otrzymuje się z obserwacji NOE pomiędzy protonami znajdującymi się w bardziej odległych resztach aminokwasowych oraz wicynalnych sprzężeń spinowo-spinowych $^3J(\text{H}_\text{N}, \text{H}_\alpha)$. Intensywności sygnałów korelacyjnych NOE są przeliczane na odległości międzyjądrowe, zaś wartości stałych sprzężenia spinowo-spinowego – na kąty dwusienne ϕ .

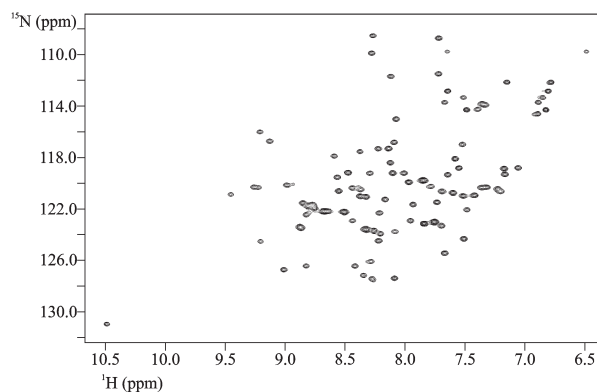
W widmach ^1H NMR białek o masach cząsteczkowych większych niż 10 kDa nasilają się dwa efekty; liczba sygnałów zwiększa się, a ich szerokości rosną na skutek coraz wolniejszej dyfuzji rotacyjnej cząsteczek. W rezultacie sygnały w dwuwymiarowych widmach ^1H NMR są zbyt silnie ponakładane, by można je było zidentyfikować i przypisać. W przypadku białek o masach cząsteczkowych do 30 kDa rozwiązaniem jest jednorodnie, podwójnie znakowanie izotopowe $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$. Pozwala to na wykorzystanie w widmach dwu i trójwymiaro-



Ryc. 6. Sieć heterojądrowych sprzężeń spinowo-spinowych, które są wykorzystywane w pomiarach widm 2D i 3D do pełnego przypisania sygnałów ^1H , ^{15}N i ^{13}C w białkach znakowanych jednorodnie izotopami ^{15}N i ^{13}C .

Na schemacie podano wartości bezwzględne stałych sprzężenia w hertzech.

wych, heterojądrowych sprzężeń spinowo-spinowych przez jedno lub dwa wiązania do identyfikacji i przypisań sekwencyjnych sygnałów ^1H , ^{15}N i ^{13}C jąder atomów tworzących szkielet białkowy (Ryc. 6). Przykład jednego z najczęściej stosowanych heterojądrowych widm 2D korelujących przesunięcia chemiczne ^1H i ^{15}N w grupach amidowych białek jest przedstawiony na Ryc. 7 (ZHUKOV 2001).



Ryc. 7. Widmo 2D korelujące przesunięcia chemiczne jąder ^1H (oś odciętych) i ^{15}N (oś rzędnych) grup amidowych przez stałą sprzężenia spinowo-spinowego $^1J(\text{N}, \text{H})$, które wykonano dla podwójnie znakowanego homodimerycznego białka S100A1 zawierającego 93 reszty aminokwasowe w podjednostce. Każda grupa amidowa jest na widmie reprezentowana przez jeden sygnał korelacyjny.

Ponadto znakowanie sygnałów korelacyjnych pochodzących od oddziaływań dipolowych $^1\text{H}/^1\text{H}$ częstościami sprzężonych z nimi heterojąder ^{15}N lub ^{13}C w widmach 3D i 4D, zwane re-

dagowaniem izotopowym, pozwala na usunięcie licznych degeneracji sygnałów ^1H występujących w widmach 2D (BAX i GRZESIEK 1993, CLORE i GRONENBORN 1998).

Jednorodne znakowanie $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ przestaje być wystarczające w białkach o masach cząsteczkowych przekraczających 30 kDa (KAY 2001). Wtedy pomocne stają się selek-

tywne lub segmentowe znakowanie izotopowe i częściowe lub całkowite deuterowanie białka (LIAN i MIDDLETON 2001). Częściowe znakowanie izotopowe zmniejsza liczbę sygnałów danego izotopu a deuterowanie osłabia wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania dipolowe powodując zwięźnienie sygnałów.

PERSPEKTYWY

Ciągle doskonalenie spektrometrów NMR, wynikające z postępu technologicznego w wielu dziedzinach, zwłaszcza zwiększenie stosowanych pól magnetycznych dzięki stosowaniu nowych materiałów nadprzewodnikowych oraz polepszenie czułości i stabilności pomiarów, będące konsekwencją nowych rozwiązań aparaturowych (np. chłodzenie cewki odbiorczej do temperatury kilkunastu K), stanowi jeden z ważnych powodów, dla których spektroskopia NMR pozwala na wyznaczanie struktur coraz większych białek i kompleksów białkowych. Inne, równie ważne powody, to nowopowstające techniki pomiarowe, pozwalające na coraz lepszą identyfikację sygnałów w wid-

mach NMR oraz coraz doskonalsze algorytmy komputerowe stosowane zarówno do automatycznego lub półautomatycznego przypisywania sygnałów i identyfikacji więzów strukturalnych, jak i obliczeń strukturalnych. Nie można tu pominąć coraz wydajniejszych metod podstawienia izotopowego, bez którego badanie białek o dużych masach byłoby niemożliwe. Ponieważ na wszystkich wymienionych polach obserwuje się stały postęp, należy zatem oczekiwać, że w najbliższych latach zarówno wielkość jak i liczba struktur białek wyznaczanych w oparciu o spektroskopię NMR będą szybko rosły.

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY IN THE DETERMINATION OF PROTEIN STRUCTURES

S u m m a r y

Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) is a method well suited to play an important part in proteomics programs. It provides structural information at the atomic resolution. Isotopes of biologically important elements, ^1H , ^{13}C , ^{15}N , and ^{31}P , display narrow resonance lines while the most abundant nitrogen (^{14}N) and carbon (^{12}C) isotopes are useless in the NMR studies of macromolecules. Internuclear interactions, modulated by even small structural and conformational changes, influence line shape and intensity of signals in NMR spectra. Last but not least, NMR provides high resolution structures in solution allowing to study those proteins that fail to crystallize or to compare differences between their crystal and solution structures. The pros and cons of NMR spec-

troscopy as a tool for the protein structure determination are discussed. Recently, the advance in the NMR equipment, spectral techniques and isotope labelling resulted in an enormous growth of the number of NMR-determined protein structures. Modern NMR-based procedure of structure determination comprises three stages: assignment of as many signals as possible in the spectra of NMR-active isotopes, identification of structural constraints, and calculation of a family of three-dimensional structures fulfilling experimental constraints. Approaches used at the first two stages depend on the size of the protein studied whereas the approach applied at the third stage depends on the type and number of identified constraints.

LITERATURA

- BAX A., GRZESIEK S., 1993. *Methodological Advances in Protein NMR*. Acc. Chem. Res. 26, 131-138.
- BECKER E. D., FISK C., KHETRAPAL C. L., 1996. *The Development of NMR*. [W:] *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*. GRANT D. M., HARRIS R. K. (red.). John Wiley, Chichester 1, 1-158.
- CLORE G. C., GRONENBORN A. M., 1998. *Determining Structures of Large Proteins and Protein Complexes by NMR*. [W:] *Biological Magnetic Resonance*. KRISHNA N. R., BERLINER L. J. (red.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 16, 3-26.
- DYSON H. J., WRIGHT P. E., 1994. *Protein Structure Calculation Using NMR Restraints*. [W:] *Two-Dimen-*

- sional NMR Spectroscopy. Application for Chemists and Biochemists. Second Edition.* CROASMUN W. R., CARLSON R. M. K. (red.). VCH Publishers Inc., New York.
- EJCHART A., 1999. *Scalar Couplings in Structure Determination of Proteins.* Bull. Pol. Ac.: Chem. 47, 1-19.
- EJCHART A., GRYFF-KELLER A., 2000. *Wpływ częściowego uporządkowania orientacji cząsteczek na ich widma NMR dużej zdolności rozdzielczej.* Wiad. Chem. 54, 949-969.
- FRIEBOLIN H., 1999. *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy.* Wyd. 3 poprawione. VCH Publishers Inc., Weinheim.
- KAY L. E., 2001. *Nuclear Magnetic Resonance Methods for High Molecular Weight Proteins: A Study Involving a Complex of Maltose Binding Protein and β -Cyclodextrin.* [W:] *Methods in Enzymology.* JAMES T. L., DÖTSCH V., SCHMITZ U. (red.). Academic Press, San Diego 339, 174-203.
- LIAN L.-Y., MIDDLETON D. A., 2001. *Labelling approaches for protein structured studies by solution-state and solid-state NMR.* Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 39, 171-190.
- NEUHAUS D., WILLIAMSON M. P., 1989. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis.* VCH Publishers Inc., New York.
- VAN DE VEN F. J. M., 1995. *Multidimensional NMR in Liquids.* VCH Publishers Inc., New York.
- WÜTHRICH K., 1986. *NMR of Proteins and Nucleic Acids.* Wiley, New York.
- ZHUKOV I., 2001. *Solution structure and backbone dynamics of CMTI-I (Met8Leu) and bovine apo-S100A1(α) proteins as studied by NMR spectroscopy.* Praca doktorska, IBB PAN, Warszawa.
- ZHUKOV I., EJCHART A., 2003. *NMR spectroscopy in structural proteomics. NMR-based protein structure determination.* Polimery 48, 28-34.