



TDK dolgozat

*Lizozim fehérje vizsgálata
NMR-spektroszkópiával*

Ágner Dorina

Konzulensek: Bokor Mónika (MTA, Wigner Fizikai Kutatóközpont)
Simon Ferenc (BME, Fizika tanszék)

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
2014

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
1. Bevezetés és motiváció	2
2. Elméleti és technikai háttér	4
2.1. NMR-spektroszkópia	4
2.2. Lizozim fehérje, minták	7
3. Kísérleti technika	9
3.1. Az NMR spektrométer	9
3.2. Mérőfej	10
3.3. Hangolás	11
3.4. Kiértékelés	13
4. Eredmények és értelmezésük	14
4.1. Korábbi eredmények	14
4.2. ^{23}Na NMR mérések, 100 <i>mM</i> -os NaCl oldaton	15
4.3. ^{23}Na NMR mérések, 150 <i>mM</i> -os NaCl oldaton	19
4.4. ^1H NMR mérések	22
4.5. Összehasonlítás más fehérjékkel	24
5. Összefoglalás	27
Köszönetnyilvánítás	28
Irodalomjegyzék	29

1. Bevezetés és motiváció

A fehérjekutatás a modern orvosi és biológiai kutatások élvonalában helyezkedik el. Az élő szervezet működésében a fehérjék a sejtekben lejátszódó összes folyamatban részt vesznek, például a sejt életbentartásában, a sejten belüli transzportfolyamatok lebonyolításában, illetve a sejt és környezete közötti információáramlás megvalósításában.

Számos betegség fordul elő bizonyos fehérjék kóros szerkezeti változásának következtében, ilyenek például az időskori neurodegeneratív megbetegedések (Alzheimer-kór, Parkinson-kór) vagy a Prion-betegség (Creutzfeldt-Jakob kór). A fehérjék szerkezete számára meghatározó a környezetük pH értéke és ion koncentrációja, illetve a fellépő iontranszport.

A fehérjekutatás számára rendelkezésre álló módszerek közül az NMR-spektroszkópia kiemelkedik. Ennek oka, hogy NMR-spektroszkópia révén a fehérje makromolekulák szerkezete nagy pontossággal meghatározható. E módszer kidolgozásáért kapta Kurt Wüthrich a 2002-es kémiai Nobel díjat.

A fehérje szerkezetmeghatározás elsősorban a molekulákban megtalálható proton-proton kölcsönhatás erősségének mérésén alapul. A közvetlen szerkezetmeghatározáson túl, jelenleg a kutatások jelentős része a fehérjék és környezetük kölcsönhatására fókuszál. Úgy modellezik a fehérjék extracelluláris környezetben való viselkedését, mintha a fiziológias sóoldat koncentrációjának megfelelő vizes NaCl-oldatban tennék ezt.

Mind a ^{23}Na , mind a ^{35}Cl az NMR módszer számára nehezebben vizsgálható atommagok közé tartoznak¹. Ezért is ritkábban találkozunk e magokon végzett NMR vizsgálatokkal, annak ellenére, hogy ez adhat egyedül információt az ionok mozgásáról a fehérje környezetében.

A TDK dolgozatomban bemutatott vizsgálatokat az motiválta, hogy a sóionok dinamikájáról fehérje környezetében olyan új információkhoz jussunk, melyeket más módszerrel nem lehet hatékonyan vizsgálni. Ezért egy modellfehérje rendszer környezetében vizsgáltam Na^+ ionok mozgási dinamikáját a hőmérséklet függvényében. A választott protein a tojásfehérjében található lizozim, melyen ilyen módszerrel eddig még senki sem végzett vizsgálatokat. A fehérje jelentőségét a 2.2. fejezetben taglalom.

A különböző hőmérsékleteken mozgékony környezetben, vagyis nem szilárd fázisban lévő vízmolekulákkal és/vagy mozgó fehérje-molekulacsoportokkal körülvett Na^+ ionok mennyiségéből következtethetünk a fehérje és a Na^+ ion közti kölcsönhatás erősségére.

A dolgozatban bemutatom az NMR-spektroszkópia alapjait, a saját eredményeimet

¹A ^{23}Na és a ^{35}Cl ún. NMR-érzékenysége 7 [1], illetve 3 [2] százaléka a protonénak azonos atommag koncentráció mellett.

és értelmezésüket. A jelen méréseket tervezem a jövőben más fehérje rendszereken végzett vizsgálatokkal folytatni (akár szerkezetileg károsodott fehérjéket használva).

2. Elméleti és technikai háttér

2.1. NMR-spektroszkópia

Az NMR-spektroszkópiát (*magmágneses rezonancia spektroszkópia*) napjainkban széles körben alkalmazzák fizikai, kémiai, biológiai és orvosi területeken, például gyógyszerkutatásra vagy orvosi célú képalkotásra [3].

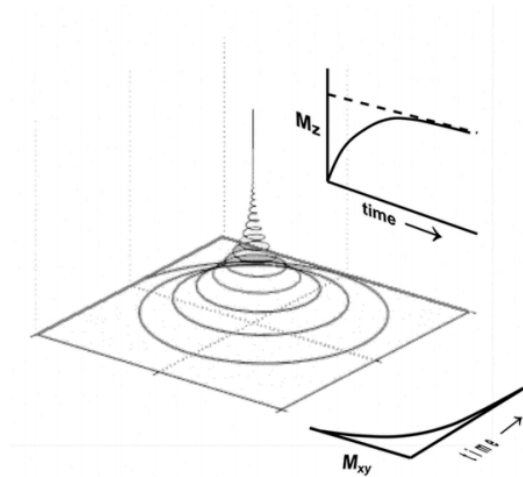
A módszer lényege, hogy a mintát egy nagy statikus mágneses térbe (B_0) helyezve, a benne található NMR aktív magok mágneses momentumai a B_0 tér körül Larmor-precessziót fognak végezni. Ennek körfrekvenciája: $\omega_L = \gamma B_0$, ahol γ az ún. giromágneses faktor, ami mindig az adott magra jellemző. Ez utóbbi irodalmi értéke ^{23}Na -ra $\gamma = 2\pi * 11,26 \text{ MHz/T}$, így a mintát $B_0 = 7 \text{ T}$ -ás külső mágneses térbe helyezve, a mágneses momentuma $f_L = 78,83 \text{ MHz}$ -es Larmor-frekvenciával fog precesszálni.

A mágneses rezonancia keltéséhez egy, B_0 -nál sokkal kisebb, állandó nagyságú mágneses teret (B_1) alkalmazunk, melyet a fenti Larmor-frekvenciával forgatunk a B_0 irányára merőleges síkban. Egy NMR aktív magon, a B_1 tér által kiváltott forgatónyomaték járulékok a magok Larmor precessziójával szinkronban történő forgatásának köszönhetően összeadódnak, így kibillentik a mágneses momentumot az egyensúlyi helyzetéből. A magspinek kimozdulásának szöge a B_1 tér hattatásának időbeli hosszától függ.

A gerjesztés után egy lassabb relaxáció következik, amit detektálni tudunk. A mágnesezettség vektor mozgását az ún. Bloch-egyenletek (1) írják le, ez két különböző folyamatot jelent. Nekünk most csak a minden irányban jelen lévő exponenciális relaxáció a fontos. Az ezt jellemző két paraméter, T_1 és T_2 azokat a relaxációs időket jelentik, melyek szerint a mágnesezettség vektora relaxál a z , illetve az $x - y$ irányú egyensúlyi értékeihez [3]. Ezek a relaxációk láthatóak az 1. ábrán [4].

$$\begin{aligned}\frac{\partial M_z(t)}{\partial t} &= \gamma(M(t) \times B(t))_z - \frac{M_z(t) - M_0}{T_1} \\ \frac{\partial M_x(t)}{\partial t} &= \gamma(M(t) \times B(t))_x - \frac{M_x(t)}{T_2} \\ \frac{\partial M_y(t)}{\partial t} &= \gamma(M(t) \times B(t))_y - \frac{M_y(t)}{T_2}\end{aligned}\tag{1}$$

A B_1 teret egy, a mintát körülvevő szolenoid tekercs váltakozó ω_L feszültségével keltjük, melynek középvonala merőleges a B_0 tér irányára (z irány). Ezért később kizárólag az $x - y$ síkban tudjuk detektálni a gerjesztett mágneses momentum vektor megfelelő vetületeit (ennek ellenére tudjuk detektálni a z irányú komponenst is, megfelelő pulzusozatokkal gerjesztve a mintát). A detektálás azért lehetséges, mert a magspinek forgása



1. ábra. A mágnesszettség vektor relaxációja

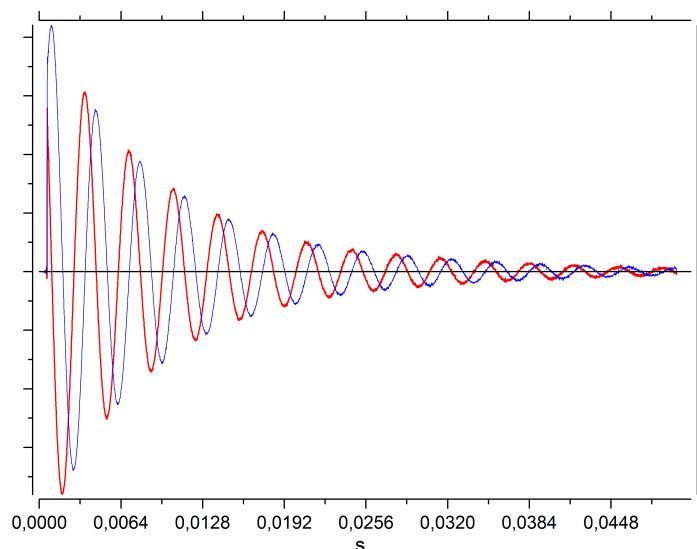
a tekercsben Larmor-frekvenciájú oszcilláló, ezért váltakozó feszültségű jelet indukálva a tekercsben, ennek az amplitúdóját mérjük. A gerjesztés után a mágneses momentum vektor visszarelxál az egyensúlyi helyzetébe, ez a folyamat az előző, pulzusszerű gerjesztésnél sokkal hosszabb ideig tart.

A mintát különböző hosszúságú pulzusokkal, vagy pulzussorozatokkal gerjesztve, majd a relaxációt figyelve információkat szerezhetünk például a magok sűrűségéről az anyagban, a környezetükről és a szomszédos kötésekről. A különböző pulzussorozatoknak köszönhetően a következő paramétereket tudjuk mérni.

FID

Az ún. FID jel (*Free induction decay*) mérésekor egy 90° -os pulzussal gerjesztjük a mintát, majd magára hagyjuk. Ekkor a spinek a B_0 -val merőleges helyzetbe kerülnek, így az $x - y$ irányú komponens T_2 relaxációs idejű exponenciális relaxációját mérhetjük. A mérésben kapott, exponenciálisan lecsengő jel oszcillációkat tartalmaz, amennyiben a gerjesztés frekvenciája nem egyezik meg a magra jellemző Larmor frekvenciával. A B_0 mágneses tér inhomogenitása miatt a különböző magspineket dekoherenssé válnak, így kioltatják egymás hatását. Az utóbbi miatt módosuló relaxációs időt (az ún. reverzibilis relaxációs időt) jelölik T_2^* -gal.

Belátható, hogy a két időmérésből komplex Fourier-transzformációval előállíthatjuk az NMR-jel frekvencia spektrumát.



2. ábra. Egy mért FID jel, a képen a piros vonal a jel valós, a kék pedig a képzetes összetevője. Vegyük észre, hogy a két oszcilláló jel fázisa közti különbség éppen $\pi/2$.

Spin-echo

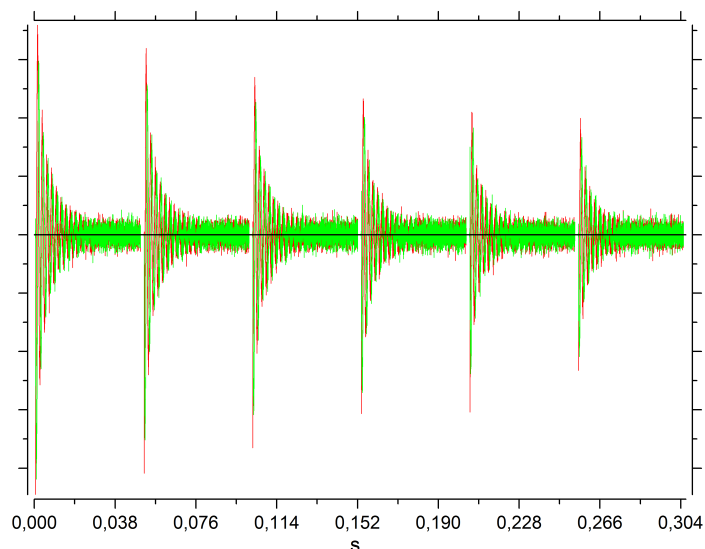
A korábban említett dekoherencia kiküszöbölésére találták ki az ún. spin-echo pulzusszekvenciát, ami egy 90° -os és egy τ időközesséssel alkalmazott 180° -os pulzusból áll. Ezek után, szintén τ idővel később detektálunk. A 90° -kal elfordított spinek τ idő elteltével valamekkora dekoherenciát szenvednek, ezután a 180° -os pulzussal megfordítjuk a spinek irányát, aminek köszönhetően éppen τ idővel később a spinek ismét egy irányba fognak állni. A spin-echo pulzusszekvencia segítségével már például T_2 értéke is mérhetővé válik.

A relaxációs idők mérése

Különböző technikákkal mérni tudjuk még a T_1 és a T_2 relaxációs időket is.

T_2 értékének meghatározására a legmegfelelőbb módszer a CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) pulzus-sorozat alkalmazása. Ennek lényege, hogy az első, x irány menti 90° -os pulzus után felváltva y irányú 180° -os pulzusok követik egymást. A 180° -os pulzusok célja a FID-nél fellépő dekoherencia kiküszöbölése, az eltérő irányok oka pedig a pulzusok hosszának hibája, ugyanis ha nem pont 180° -kal forgatjuk a spineket, de mindig ugyanabba az irányba, amelyben detektálunk, akkor ez a hiba felhalmozódik. A 180° -os forgatások után mérjük a minta válaszában amplitúdóját, ezekből megrajzolható az x irányú lecsengés, és meghatározható a T_2 relaxációs idő.

A z irányú exponenciális lecsengés T_1 paraméterének mérésére találták ki az ún. *inversion recovery* módszert. A mintát először egy 180° -os pulzussal gerjesztjük, majd τ idő után egy 90° -os pulzussal kiolvassuk a kapott FID jel amplitúdóját. A mérést különböző

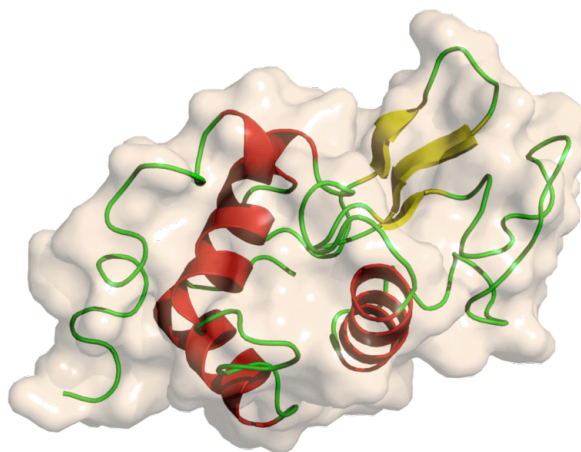


3. ábra. Egy mért CPMG pulzussorozat, az ábrán a piros vonal a jel valós, a kék pedig a képzetes összetevője.

τ értékek mellett elvégezve megrajzolhatjuk a z irányú lecsengést, erre egy exponenciális függvényt illesztve megkapjuk T_1 értékét.

2.2. Lizozim fehérje, minták

A lizozim egy enzim, a 4. ábra a térszerkezetét mutatja be. Nagy mennyiségben található meg a tojásfehérjében, az első lizozim enzimet is ennek vizsgálata során fedezték fel (Alexander Fleming, 1922-ben). Ezen felül jelen van a testnedvekben, például a könnyben, a nyálban és az anyatejben, illetve egyes állatokban és növényekben is.



4. ábra. A lizozim enzim térszerkezete [5]

A lizozimnak antibakteriális és fungicid tulajdonságai vannak és széleskörűen használják mind biokémiai, mind gyógyszerészeti alkalmazásokban. Ez utóbbi területen kiterjedten használják gram-pozitív baktériumok elpusztítására, valamint meglévő immunvédelem támogatására bakteriális fertőzések legyőzésében. Antibakteriális tulajdonságai miatt a lizozim az élelmiszeriparban is hasznosítható az élelmiszerek megromlásának megelőzésére.

TDK munkám során a tyúk tojásfehérjében található lizozim enzimet vizsgáltam.

NaCl vizes oldatában a Na^+ és a Cl^- ionok 0°C alatt eutektikumokat képeznek a vízmolekulákkal. Ezen oldat fagyáspontja ($-21,08^\circ\text{C}$) [6].

Fehérje és só vizes oldatát 0°C alá lehűtve a Na^+ ionok egy része a fehérje hidratációs burkában koncentrálódik. Ez a mennyiség attól függ, hogy mennyi nátriummal tud kölcsönhatásba lépni a fehérje. A hidrátburok jellemzően csak -50°C körül fagy meg, így a fehérjével kölcsönható ionok eddig a hőmérsékletig mozgékony környezetben vannak, így tudjuk detektálni is őket². A fehérjével kölcsönhatásban nem lévő, "szabad" Na^+ ionok az őket hidratáló vízmolekulákkal eutektikumokat képeznek, melynek fagyáspontja -21°C . A kétféle (fehérjéhez kötött és szabad) Na^+ ion környezetének eltérő fagyáspontját figyelembe véve következtethetünk a fehérjével kölcsönható ionok mennyiségére.

A mozgékony vízmolekulák által körülvevett Na^+ ionok NMR-spektruma nagyságrendekkel keskenyebb, mint a szilárd környezetben lévőké (ennek segítségével tudjuk elkülöníteni a még folyékony környezetben lévő ionokat a már megfagyottaktól), így a keskeny spektrumot adó ^{23}Na NMR-jelet kb. -70°C és $+25^\circ\text{C}$ között felvéve meghatározható a fehérjéhez kötődő és a szabad nátriumionok mennyisége.

Az általam használt oldatok 50 mg/ml lizozimot és mintánként változó mennyiségű NaCl-ot és desztillált vizet tartalmaznak. A lizozim molekulatömege 14307 g/mol , az 50 mg/ml lizozimkoncentráció így $3,49\text{ mM}$ koncentrációnak felel meg.

100 mM -os sóoldatban az átlagosan egy fehérjére jutó Na^+ ionok száma 29 db , 150 mM -os oldatban pedig 43 db . A későbbiekben, a mérésekből megállapítható, hogy ezekből átlagosan mennyivel hatott kölcsön a használt lizozim fehérje.

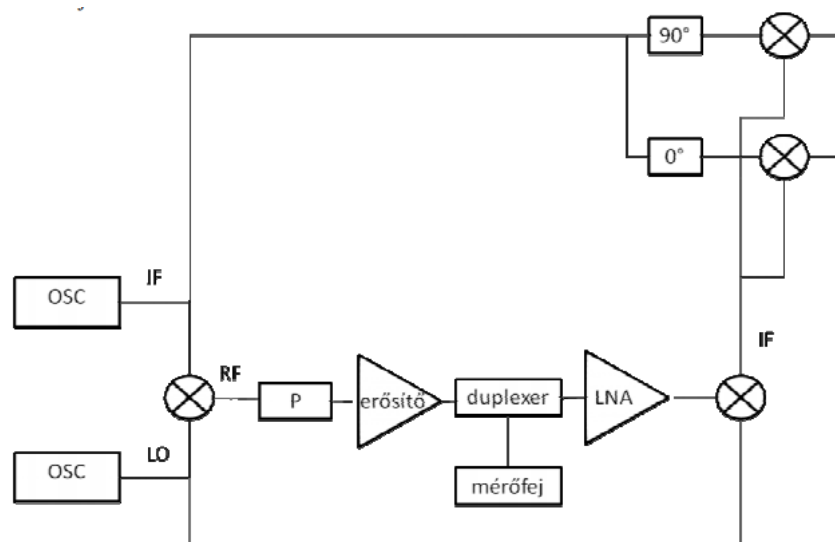
²Amennyiben nem mozgékony környezetben vannak, az NMR-jelük annyira kiszélesedik, hogy speciális NMR-kísérletek kellenének ahhoz, hogy detektálni tudjuk ezeket.

3. Kísérleti technika

3.1. Az NMR spektrométer

A méréseimet egy protonra 300 MHz-es, 7 T-ás NMR berendezéssel végeztem, minden esetben oldat mintát vizsgálva. A műszer a BME Fizika tanszékén található.

Az NMR berendezés lényegében egy nagy érzékenységű adóvevő, ami kibocsájt egy nagyenergiájú impulzust, majd detektálja a minta kis energiás választ, ezért fontos összetevője az ún. heterodin technika [7]. Ennek lényege, hogy a detektált jelek frekvenciája az adóvevőben a vivőhullám frekvenciájától függetlenül állandó. Ezzel a technikával egy szélessávban működő rádió adóvevő építhető anélkül, hogy minden szűkebb frekvenciasávra külön eszközt kéne használni. A megoldás az, hogy az információt adott, szűk sávban mozgó frekvenciájú (*IF - intermediate frequency*) jelbe kódolják. Ezt a jelet egy mixer segítségével összekeverik egy szélessávban hangolható lokál-oszcillátor (*LO - local oscillator*) jelével. A mixer kimenetén megjelenik a fenti két jel összege, illetve különbsége, ezek alkotják az ún. RF (*radiofrequency*) frekvenciát, amit az adó kisugároz. A vevőben az adott frekvenciasávra való ráállás a megfelelő LO frekvencia kiválasztását jelenti, ezzel a vevő a bejövő RF jelet újra összekeveri, így előállítva az IF jelet, amit detektálhatunk. Az 5. ábra a berendezés blokkvázlatát mutatja, melyen P a pulzusgenerátor, amely az RF jelet pulzusokkal modulálja, az erősítő egy teljesítményerősítőt takar, LNA pedig egy kis-zajú előerősítő (low noise amplifier).



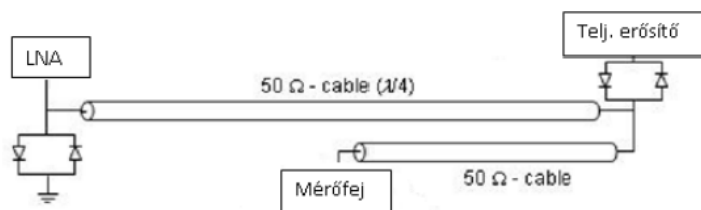
5. ábra. A heterodin elven működő NMR berendezés blokkvázlata

A detektált jelünk tehát egy kis amplitúdójú rádiófrekvenciás feszültség-impulzus. Ezt

a jelet komplex vektorként felfogva látható, hogy a teljes NMR-jelet akkor állíthatjuk elő, ha mérjük a meghajtó oszcillátorhoz fázisban, és 90° -ban eltolt komponensek amplitúdóit is. E két jel szimultán mérését nevezzük kvadratúra detektálásnak, melynek megvalósítása a blokk-diagrammon is látható 90° -os fázistolóval lehetséges.

A duplexer feladata, hogy a minták besugárzásakor több 100 V -os feszültségimpulzusokat a teljesítményerősítőtől a mintára küldjön, majd a minta néhány μV -os, tekercsben indukált válaszát a kis-zajú előerősítőbe küldje. Ezt a 6. ábrán mutatott két diódapárral és egy ún. $\lambda/4$ -es kábelt alkalmazó duplexerrel érhetjük el (λ az RF sugárzás hullámhossza).

Az elrendezés lényege, hogy a teljesítmény erősítő utáni diódapár kinyit, miközben a mérőfej besugárzása történik. Ugyanekkor a másik diódapár a föld felé van nyitva, ezért az LNA is földre kerül, tehát védett a nagyenergiájú impulzusokkal szemben. Mindkét diódapár lezár, amikor a magok gyenge NMR-jelét detektáljuk, ekkor a jel teljes egészében az LNA-ba jut.

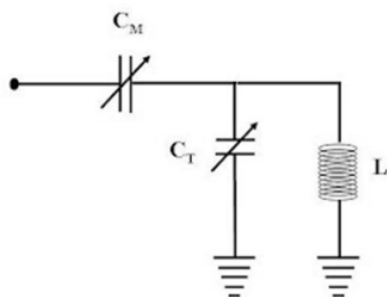


6. ábra. A duplexer működése

3.2. Mérőfej

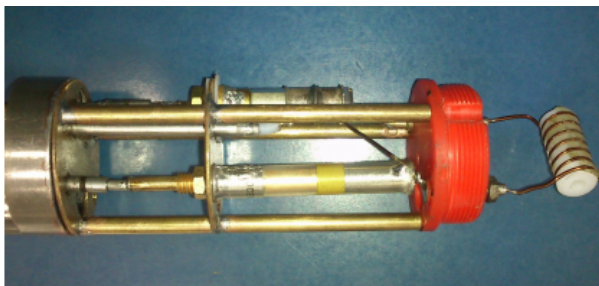
Méréseimet az NMR aktív magok közül főleg ^{23}Na -on végeztem, de mértem esetenként ^{35}Cl -on, és protonon is. A mérőfej, amit használtam, egy kifejezetten ^{23}Na -ra, illetve ^{35}Cl -ra tervezett eszköz (Karsa Anita építette, az MSc szakdolgozata során [8]). Ez azért fontos, mert a különböző magok, különböző Larmor-frekvenciáin való mérésekhez más-más áramköröket használnak. Az általam is használt mérőfej látható a 8. ábrán, a felépítését pedig a 7. ábra mutatja be.

A gerjesztésnél és a detektálásnál is fontos, hogy a jelek hatékonyan jussanak el a berendezésből a mérőfejbe, és fordítva. Adott hullámimpedanciájú vezetékben akkor terjed megfelelő hatékonysággal az energia, amennyiben a lezárás egy, ezzel megegyező nagyságú valós impedancia. Leggyakrabban $50\ \Omega$ hullámimpedanciájú (BNC) kábeleket alkalmaznak az NMR berendezésekben, tehát a mérőfej valós impedanciáját is ekkorára tervezték. Ez egy rf rezgőkörrel valósítható meg egyszerűen, a valós $50\ \Omega$ impedancia pedig a kondenzátorok kapacitásainak változtatásával állítható be.



7. ábra. Az NMR mérőáramkör felépítése

Az ábrán is látható C_T az ún. tuning ("hangoló") kapacitás, mellyel a mérés frekvenciáját állíthatjuk be, a C_M ún. matching ("illesztő") kapacitással pedig a fellépő reflexiót csökkenthetjük. Az áramkörben található tekercs nálunk egy szolenoid tekercs, de gyakran használnak az NMR-spektroszkópiában ún. "saddle coil" tekercseket is (például a gyári mérőfejekben is ilyenek találhatóak).



8. ábra. A ^{23}Na -NMR mérésekhez használt mérőfej

A munkám során segítettem egy protonra tervezett mérőfej összerakásában is. Céлом a hangolhatóság elérése volt, ennek érdekében különböző kapacitású C_T és C_M kondenzátorokat, illetve különböző átmérőjű és menetszámú tekercseket próbáltam ki.

3.3. Hangolás

Az előző fejezetben bemutatott mérőfejet minden mérés elején hangolni kell, a mérendő magnak megfelelően. Ha ezt nem tesszük meg, nem tudunk egy FID jelet sem detektálni. Ennek érdekében fontos, hogy a rezgőkör reflexiója a Larmor-frekvenciánál legyen minimális, azaz hogy a valós impedancia 50Ω legyen, az imaginárius pedig 0Ω . Alacsonyabb hőmérsékleten elhangolódhat az áramkör, ezzel meghamisítva a hőmérsékletfüggő méréseket. Tehát ahhoz, hogy megfelelően tudjuk használni a berendezést, minden hő-

mérsékleten meg kell ismételni a hangolást.

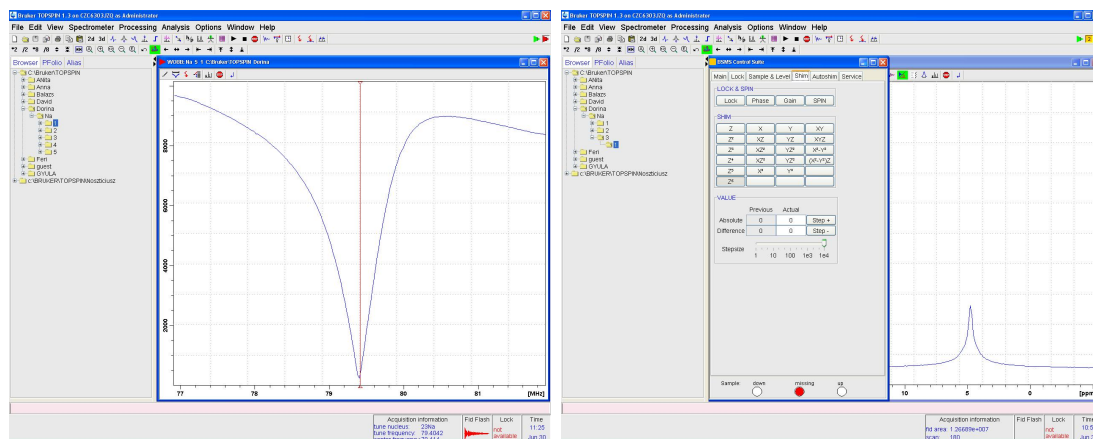
Technikailag a C_T és C_M kondenzátorok kapacitásainak változtatásával valósítható meg a hangolás. A használt NMR-konzolt vezérlő gyári program (*TopSpin*) "wobb" parancsának elindítása után a 9. ábrán bemutatott képet fogjuk látni, a beszívás, amit a görbén látunk, a reflexió minimumát adja meg.

A hangolás helyességét befolyásolja a beszívás minimumának értéke, illetve a helyének távolsága a mérési frekvenciától. Természetesen ez utóbbiakat nem lehet 100 %-os pontossággal beállítani, de a lehető legfinomabb hangolásra kell törekedni.

Shimmelés

A mérésünk annál pontosabb, minél homogénebb B_0 mágneses teret alkalmazunk. Ezt torzíthatja például a mérőfej, valamint, hogy a berendezés saját mágneses tere sem teljesen homogén. Erre találták ki az ún. *shimmelést*, amely során a minta körül elhelyezett segédtekerccsekkel kisebb mágneses tereket hozunk létre, a homogénebb B_0 tér elérésének érdekében.

Az NMR berendezésünkben gyárilag megtalálhatóak a kiegyenlítő (shimmelő) tekercek, melyekkel a tér 20 különböző irányában befolyásolhatjuk a B_0 mágneses teret. A tekerceken folyó áramokat szintén a *TopSpin* programban tudjuk változtatni. A mintára bizonyos időközönként 90° -os pulzusokat küldve, és a spektrumot figyelve végezzük a shimmelést. A B_0 tér akkor lesz a minta körül optimális, amikor a spektrum félérték-szélessége a lehető legkisebb értéket veszi fel, illetve nem látunk rajta zajokat.



9. ábra. A bal oldali képen a hangolás során mért reflexió, a jobb oldalin pedig a shimmelés hatására kialakuló keskeny NMR-jel látható.

Shimmelni a mérőfej NMR berendezésbe helyezését követően egyszer kell. Ha a mintát kicseréljük, vagy egyéb okból elmozdítjuk a mérőfejet, a shimmelést meg kell ismételni,

mivel a B_0 teret erősen befolyásolja a minta környezete és pontos helyzete. Shimmelés nélkül a tipikus NMR-jel szélesség 1 ppm , ami a ^{23}Na -ra 80 Hz -et jelent. A shimeléssel ezt kb. $0,2\text{ ppm}$ -re tudjuk levinni (16 Hz) rutinszerűen.

3.4. Kiértékelés

A kiértékelés során a T_1 és T_2 relaxációs időket, az NMR-jelalakot, valamint az NMR-jelek nagyságát (intenzitását) szeretnénk meghatározni.

A T_1 és T_2 esetében valamilyen időfüggő paraméter függvényében értékeltünk ki NMR spektrumokat, ezért e két érték is közvetlenül idő dimenzióval adódik, tehát nem igényelnek további kalibrációt.

Egy FID jelből Fourier-transzformációval előállított frekvencia spektrumból két fontos adat nyerhető. Az egyik a félértékszélesség, amit függvényillesztéssel, vagy, egy kevésbé pontos módszerrel, leolvasással kaphatunk meg. A másik pedig a görbe alatti terület nagysága (integrálja).

A megfelelő amplitúdó értékek meghatározásához a nyers FID adatsorokat korrigálni kell, ezek az adatok a kiértékelésben és az összehasonlításban is fontos szerepet játszanak. Meghamisíthatja a mérést, ha a detektált jelet erősítettük, vagy több mérést végeztünk, és azok összegét (vagy átlagát) tekintettük (főleg abban az esetben, ha egyes méréseknél ezek az értékek különbözőek voltak), az amplitúdó nagysága ezekkel egyenesen arányos. A fenti paramétereket a mérés során kell beállítani, de utólag is könnyen kiolvashatóak, az adott méréshez tartozó paraméterfájlból. A mért amplitúdó értéke fordítottan arányos a hőmérséklettel, és egyenesen arányos a mintában lévő ionok számával is, így ezekkel is korrigálni kell az adathalmazt. Az utóbbi esetén a 0°C felett mért FID jelek amplitúdójának átlagával normálunk (ezekben az összes rezonáns mag jele látható), hogy a minta nagyságától és a koncentrációtól független adathalmazt kaphassunk. A korrigálás a fenti esetekben egy egyszerű osztást, vagy szorzást jelent, az arányosságoknak megfelelően. Mivel a minta válasza a gerjesztésre egy Larmor-frekvenciával oszcilláló jel, így a pontosabb amplitúdó érték leolvashatóságához, vagy illeszthetőségéhez minden FID jelet szükséges fázis-korrigálni is.

Továbbá szükséges a kapott jelet extrapolálni is, mivel a mérőműszer a gerjesztés után nem tud azonnal detektálni, így értékes milliszekundumok vesznek el, meghamisítva a leolvasott amplitúdók értékeit. Ezt a FID jelre történő függvényillesztéssel tehetjük meg. A nyers adatsor a legtöbb esetben zajos, ami zavarhatja az elemzést, viszont a zaj mértékét csúszó átlagolással nagy mértékben csökkenthetjük.

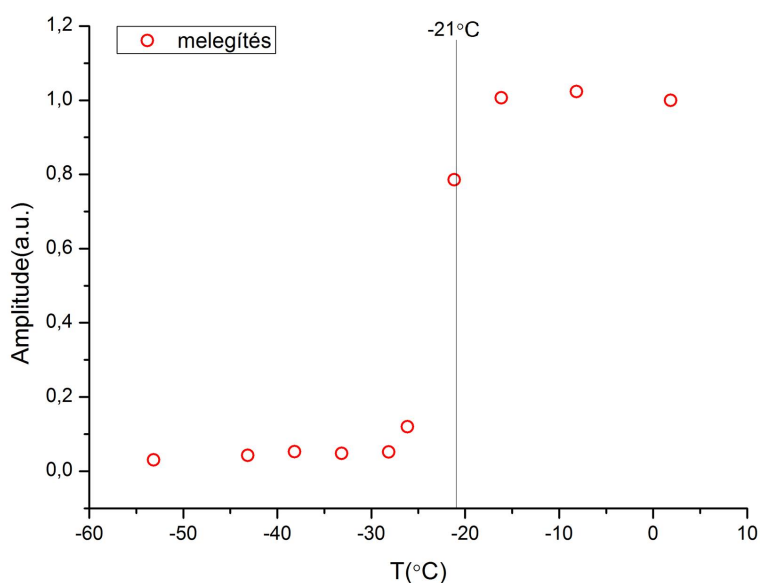
Az így kapott adatsorok már értelmezhetőek és összehasonlíthatóak.

4. Eredmények és értelmezésük

4.1. Korábbi eredmények

Referenciaként egy, fehérjét nem tartalmazó NaCl oldatot használtam, mégpedig 150 *mM*-osat. Ennek a hőmérsékletfüggő mérését előttem már elvégezte egy, már végzett hallgató-társam³, az ő méréseit és ábráit használom fel ebben a fejezetben [8], de ezeket a méréseket én is elvégeztem, a TDK munka betanulási fázisában.

A NaCl vizes oldatában az összes Na⁺ ion a vízben "szabadon" található, így képesek eutektikumokat képezni. Amikor hűtjük, az egész oldat megfagy -21°C körül, tehát alacsonyabb hőmérsékleteken nem tudunk *FID* jelet mérni (illetve a gyors exponenciális lecsengésből látszik, hogy ez már csak a megfagyott ²³Na magok NMR-jele). Az amplitúdó értéke lényegében 0 lesz (bár minimális zaj ekkor is látható), a spektrum pedig annyira kiszélesedik, hogy csak egy egyenest fogunk látni. A következő grafikonok ezen jelenségeket mutatják be.



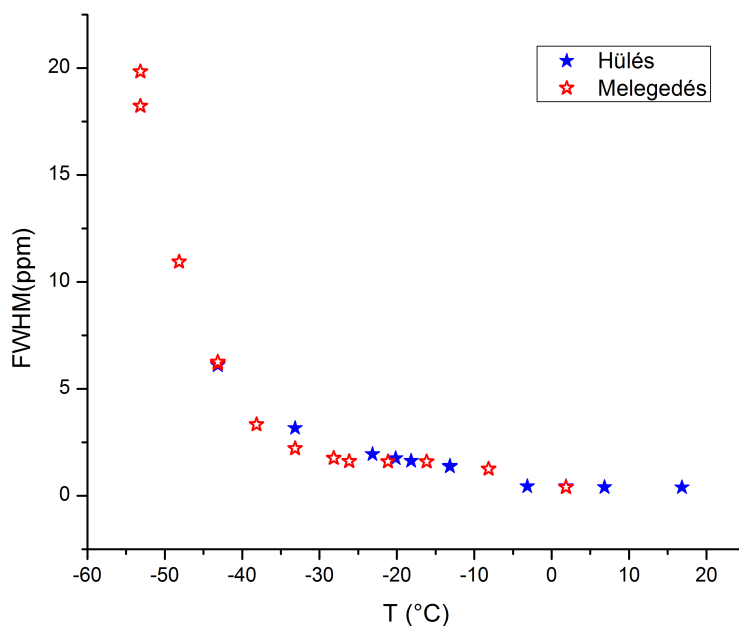
10. ábra. 150 *mM*-os NaCl oldat ²³Na-NMR jel amplitúdójának hőmérsékletfüggése, melegedés közben

A fenti ábrán a NaCl oldat amplitúdójának hőmérsékletfüggése látható. Jól megfigyelhető a korábban már leírt ugrás, az eutektikus hőmérséklet körül, valamint az, hogy

³Karsa Anita, a kutatócsoportunk tagja volt

alacsony hőmérsékleten közel *nulla* az érték, ami azt jelenti, hogy az összes ion szilárd fázisban ("merev környezetben") található.

Az is fontos, hogy -21°C felett a jel közel állandó, tehát a mintában lévő összes Na^+ ion jelét detektáljuk.



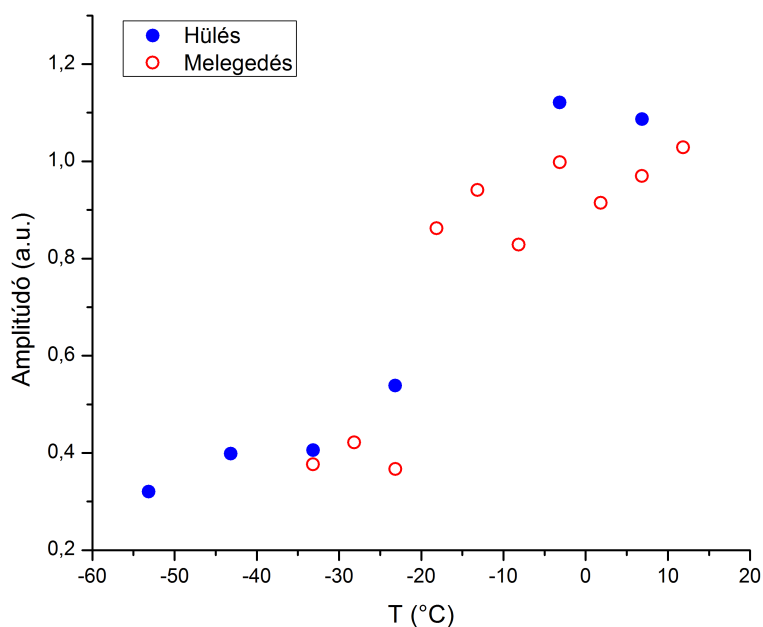
11. ábra. 150 *mM*-os NaCl oldat ^{23}Na -NMR jele félértékszélességének (FWHM) hőmérsékletfüggése

A 11. ábrán látható, hogy a félértékszélesség magas hőmérsékleten közel állandó, az eutektikus hőmérséklet alatt pedig az érték exponenciálisan nő, ami annyit jelent, hogy a spektrum kiszélesedik.

4.2. ^{23}Na NMR mérések, 100 *mM*-os NaCl oldaton

A minta készítésekor 100 *mM*-os sóoldatban oldottuk fel a fehérjénket, ennél a koncentrációnál a korábbi kalorimetriás kísérleti eredmények [9] szerint a fehérje képes kölcsönhatásba lépni az összes Na^+ ionnal, tehát nincsenek a vízben "szabadon" lévő ionok. Ezt hőmérsékletfüggő mérések úgy igazolják, hogy az eutektikus hőmérséklet (-21°C) körül nem látunk számottevő változást sem a mért FID jelek amplitúdójában, sem pedig a spektrumok félértékszélességében, hasonló törés csak -50°C körül lesz megfigyelhető,

ahol már a fehérje hidratburkát alkotó vízmennyiség is megfagy, vagyis nincs mobilis környezetű Na^+ ion. Általánosan teljesül, hogy a T_1 és a T_2 értékek sokkal kisebbek szilárdfázisban, mint folyadékfázisban.



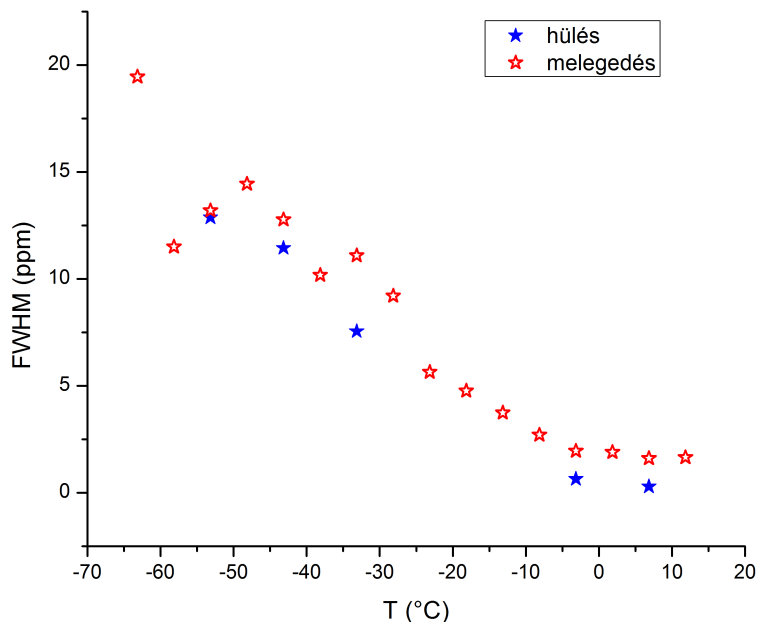
12. ábra. 100 mM-os, lizozimot tartalmazó sóoldat ^{23}Na -NMR jel amplitúdójának hőmérsékletfüggése

A használt minta össztömege 72,5 mg volt, 200 K és 285 K között végeztünk rajta méréseket, hűtés és fűtés közben is, a fázisátalakulások során bekövetkező hiszterézis miatt. A minta hűtésekor a legalacsonyabb hőmérséklet, melyen még leolvasható és illeszthető FID jelet tudtam mérni -53°C volt, melegítés közben pedig -33°C .

A 12. ábrán látható, hogy a tapasztalat nem teljesen felel meg a korábbi várakozásoknak. Az eutektikus hőmérsékleten ugyanis az amplitúdó-értékekben látható ugrás. Ebből arra következtethetünk, hogy a mintában a fehérje csak a Na^+ ionok egy részével tudott kölcsönhatni. Ezt az ionmennyiséget a fenti ábrából meghatározhatjuk.

Az összes Na^+ ion száma a 72,5 mg-os mintában $4,35 \cdot 10^{18}$ db, a -21°C és -50°C között mért relatív amplitúdóértékek átlaga (a hiszterézis miatt kiszóró pontoktól eltekintve) 0,38. Ez annyit jelent, hogy a mintában található összes Na^+ ion 38%-a volt ekkor mozgékony környezetben, vagyis a fehérjével kölcsönhatásban. Ez 100 mM-os NaCl koncentrációnál $1,66 \cdot 10^{18}$ db iont jelent. A 3,49 mM-os fehérjekoncentráció az oldatban

$1,52 \cdot 10^{17}$ db lizozimot jelent, tehát egy darab fehérje átlagosan 11 db Na^+ ionnal hatott kölcsön.

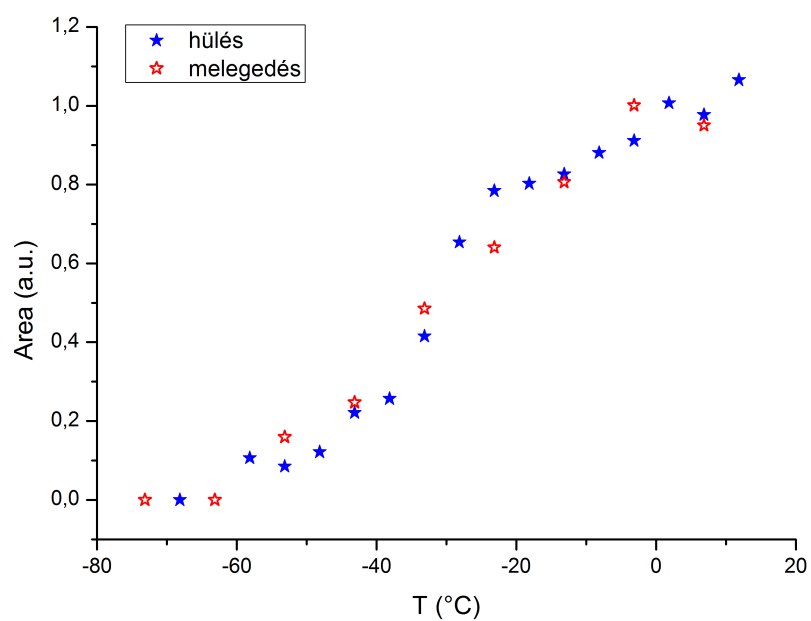


13. ábra. 100 mM-os, lizozimot tartalmazó sóoldat ^{23}Na -NMR jele félértékszélességének hőmérsékletfüggése

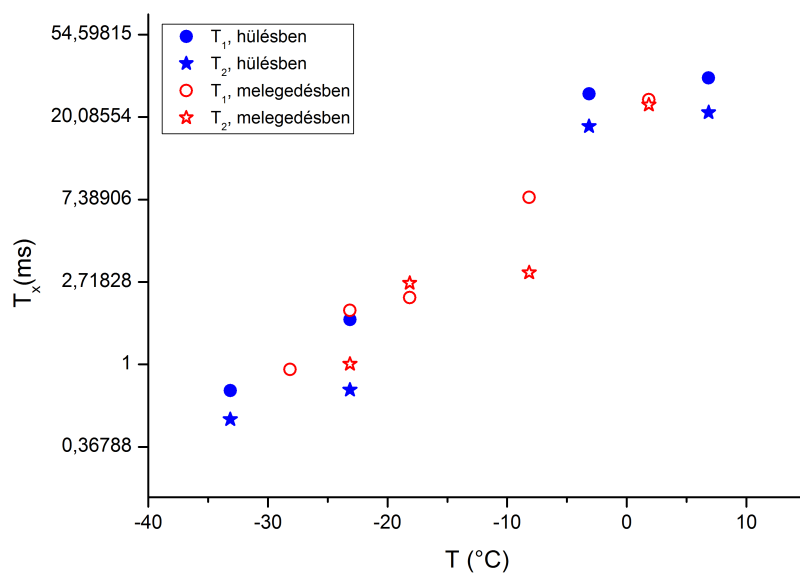
A félértékszélességet megvizsgálva azt találtuk, hogy 0°C -tól -50°C -ig lassan, fokozatosan szélesedik ki. Ez azt mutatja, hogy a Na^+ ionok mozgása - ha nem is áll meg drasztikusan -21°C -on - fokozatosan lassul.

A korábbi kísérleti eredmények szerinti várakozásokat szintén igazolja, ha megvizsgáljuk a spektrumok alatti területek nagyságának hőmérsékletfüggését. Ezen látható az eutektikus hőmérsékleten a jellegzetes törés. Ami az eddigi ábrákon kevésbé volt megfigyelhető, az a fehérje hidrátburkát adó vízmennyiség fagyáspontja, -58°C -ig ugyanis látunk folyadék környezetben lévő Na^+ ionra utaló, keskeny spektrumot, alacsonyabb hőmérsékleten viszont ez már teljesen eltűnik. Ez a tapasztalat azért érdekes, mert a fehérje hidrátburkának olvadáspontját kb. -50°C -ra vártuk.

Mivel oldatokról van szó, így a T_1 és T_2 értékeknek egymással hasonlóknak kell lenniük, ez valóban teljesül. A relaxációs idők jelentősen lecsökkennek (az exponenciális lecsengés gyorsabb lesz), mire eléri az eutektikus hőmérsékletet. A 15. ábrán logaritmius skála szerint ábrázolva a relaxációs időket látható, hogy a jellegük lineáris és a fenti csökkenés így exponenciális.



14. ábra. 100mM-os. lizozimot tartalmazó sóoldat ^{23}Na -NMR spektrum alatti területének hőmérsékletfüggése

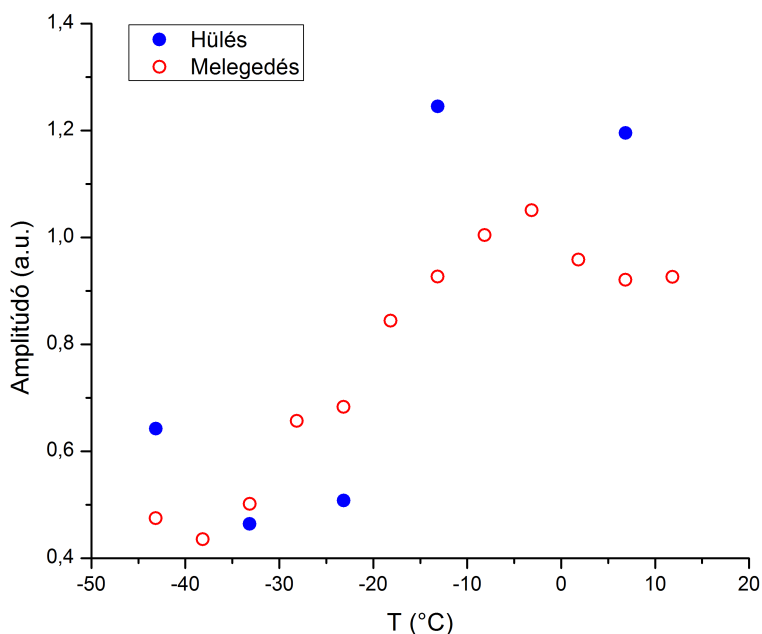


15. ábra. 100 mM-os, lizozimot tartalmazó sóoldat ^{23}Na -NMR relaxációs időinek hőmérsékletfüggése

4.3. ^{23}Na NMR mérések, 150 mM-os NaCl oldaton

Az előző fejezet mintájától eltérően, ha 150 mM-os NaCl oldatba ugyanolyan koncentrációban (50 mg/ml) lizozimot keverünk, akkor itt a fehérjével kölcsönható Na^+ ionok mellett már lesznek "szabad" ionok is. A kapott hőmérséklet-amplitúdó, és hőmérséklet-félértékszélesség grafikonokon már két töréspontot is megfigyelhetünk, egyet az eutektikus hőmérséklet (-21°C) közelében, egyet pedig -50°C körül, ahol a fehérje hidrátburka is teljesen megfagy.

A használt minta tömege 79 mg volt, 190 K-tól mértünk 285 K-ig, hűtés és fűtés közben is, a hiszterézis miatt.



16. ábra. 150 mM-os, lizozimot tartalmazó sóoldat ^{23}Na -NMR jel amplitúdójának hőmérsékletfüggése

A 16. ábrán látható, hogy a hűtés közben mért amplitúdó értékekben jelentős a csökkenés az eutektikus hőmérséklet környékén, viszont a melegedés közben mért értékekben ez a változás lassú. A jelenséget okozhatja a hiszterézis, illetve előfordulhat, hogy a mérés közben nem vártunk elég időt a hőmérsékleti egyensúly beállítására, így nem tudott az összes ion környezetét jelentő vízmennyiség felolvadni.

Az előző mintához hasonlóan, a 150 mM NaCl koncentrációjú, lizozimos minta esetén is megállapíthatjuk az egy fehérje által átlagosan megkötött ionok számát. Az oldatban

található összes ion száma $7,11 \cdot 10^{18}$, mivel a minta össztömege 79 mg . A -21°C alatt is mobil Na^+ magok az oldatban lévő összes mag 48%-át alkotják (a relatív amplitúdó-érték 0,48). Az oldat fehérjekoncentrációja megegyezik az előzőleg vizsgált mintáéval, így most $1,65 \cdot 10^{17} \text{ db}$ lizozim molekula található az oldatunkban (a két oldat tömege nem azonos). Ebben az esetben összesen $3,39 \cdot 10^{18} \text{ db}$ Na^+ ion maradt mobil, tehát egy darab fehérje átlagosan 20 db Na^+ ionnal hatott kölcsön. Ez tekinthető a fehérje maximális Na^+ ionkötő képességének.

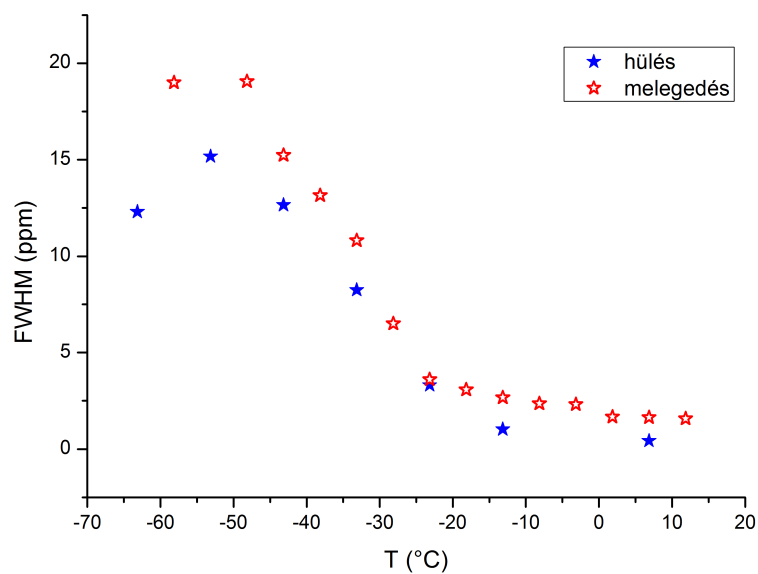
A következő táblázat tartalmazza a Na^+ ionok egy darab lizozimra vonatkoztatott számát a különböző koncentrációjú sóoldatokban összesen, a fehérjével kölcsönhatásban, illetve a kettő arányát.

Koncentráció	Oldatban(db)	Kölcsönhatásban(db)	A kettő aránya
100 <i>mM</i>	29	11	38 %
150 <i>mM</i>	43	20	48 %

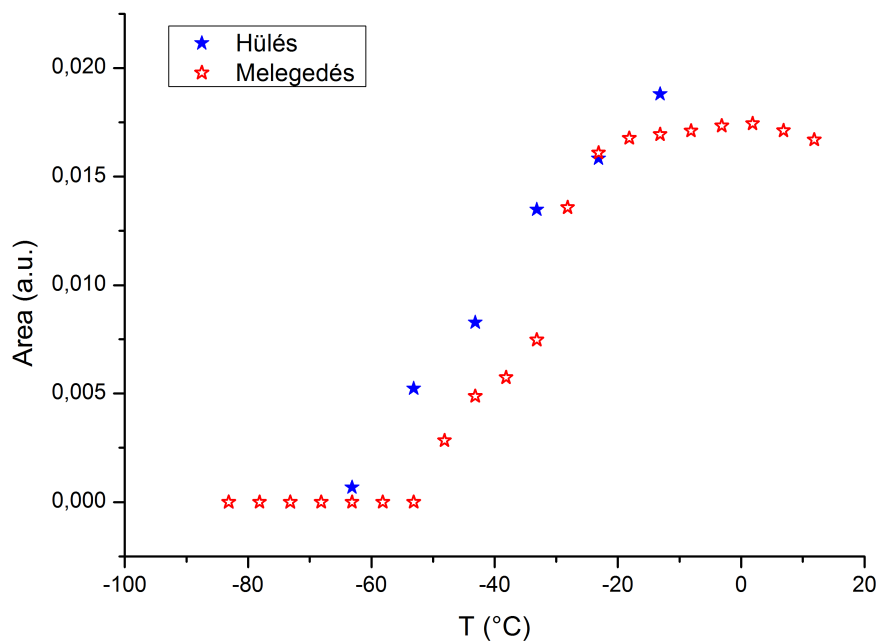
A korábbi várakozások szerint a 100 *mM*-os oldatban lévő összes Na^+ ion a fehérjével hat kölcsön, illetve a 150 *mM*-os koncentrációjú sóoldattal összekevert fehérje környezetében ugyanannyi ion helyezkedik el, mint a másik oldatnál. A tapasztalat szerint viszont a 150 *mM*-os oldatban feloldott fehérjék kb. kétszer annyi Na^+ ionnal hatottak kölcsön, mint a 100 *mM*-os oldatbeliek. Fontos megemlíteni, hogy a nagyobb koncentrációnál a ténylegesen kölcsönható ionok száma közelít a kisebb koncentrációnál összesen jelenlévő darabszámhoz, vagyis a korábbi eredményeknek megfelelő várakozáshoz. Ebből arra következtethetünk, hogy a 150 *mM*-nál mért ionszám kb. a lizozim fehérje maximális ionkötő kapacitásának felel meg.

A félértékszélesség-hőmérséklet grafikonon látható egy törés, -21°C körül. Ennél magasabb hőmérsékleten közel állandó az érték, alacsonyabb hőmérsékleten viszont nagy meredekséggel szélesedik ki a spektrum-jel. A 100 *mM*-os mintánál a meredekség értéke jóval kisebb volt.

A 18. ábrán látható a spektrumok alatti terület hőmérsékletfüggése. Itt az utolsó hőmérséklet, ahol még folyadékra utaló jel látható, -53°C körül van. Tehát a lizozim fehérje hidrátburkában lévő vízmennyiség olvadáspontja 150 *mM*-os sóoldatban erre az értékre tehető, ami a várt értékkel (-50°C) jó közelítéssel megegyezik.

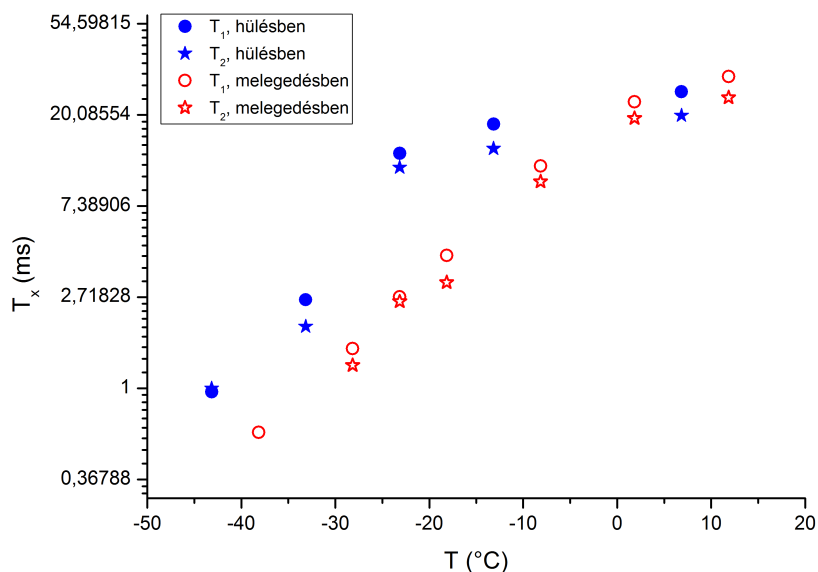


17. ábra. 150 mM-os, lizozimot tartalmazó sóoldat ^{23}Na -NMR jele félértékszélességének hőmérsékletfüggése



18. ábra. 150 mM-os, lizozimot tartalmazó sóoldat ^{23}Na -NMR spektrum alatti területének hőmérsékletfüggése

A relaxációs idők hőmérsékletfüggését vizsgálva jól megfigyelhető az értékek hiszterézise, illetve a korábban is említett kiszélesedésük is. A két paraméter által kirajzolt görbe jellege azonban egymáshoz nagyon hasonló, az elméleti várakozásoknak megfelelően (a folyadékokra ez jellemző). A T_1 és a T_2 értékeket logaritmikus skála szerint ábrázolva látható, hogy melegedés közben lineáris jeleget mutatnak, tehát a csökkenés exponenciális. A hűlésnél megfigyelhető eltolódás a hiszterézisnek tudható be.



19. ábra. 150 mM-os, lizozimot tartalmazó sóoldat ^{23}Na -NMR relaxációs időinek hőmérsékletfüggése

4.4. ^1H NMR mérések

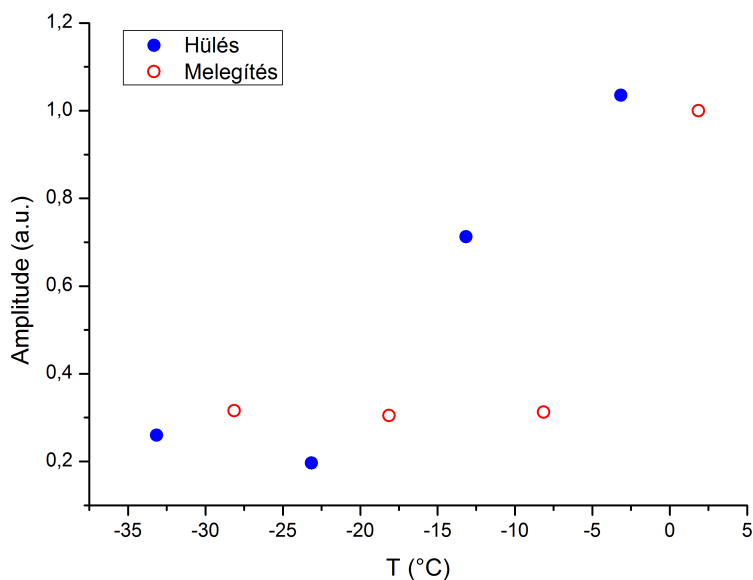
A protonos mérések jóval népszerűbbek az NMR-spektroszkópiában, mint a ^{23}Na -on végzettek. Ennek fő okai, hogy a ^1H -nél nagyságrendekkel nagyobb a mért jel⁴, illetve, hogy a proton gyakrabban fordul elő a vizsgálandó mintákban, mint a nátrium, ez például a 150 mM-os oldat esetén átlagosan 733-szor több H^+ iont jelent, mint Na^+ iont. Ezek a mérések tehát az általam korábban elvégzetteknél jóval egyszerűbbek, könnyebben kivitelezhetőek. A következő méréseket a ^{23}Na -ra vonatkozó kísérleti adatok ellenőrzéseként végeztem el.

A fenti mintákon megismétltem a méréseket, kevesebb mintavételezéssel, de ezúttal protonon mérve, nem ^{23}Na magon. Mivel csak magasabb hőmérsékleteken (kb. -34°C és

⁴A ^{23}Na magra nézve az érzékenység 0,0923, amennyiben az ^1H magra 1.

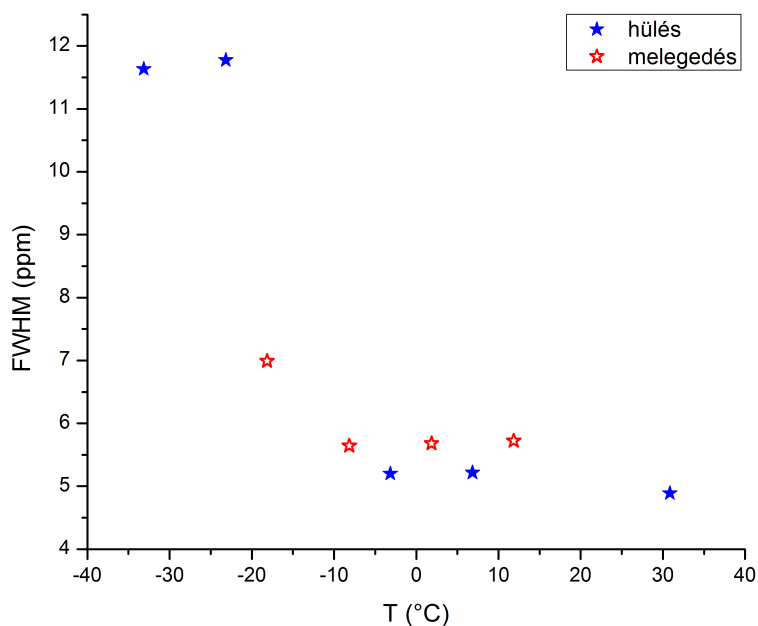
4°C között) végeztem méréseket, ezért a fehérje hidrátburkának a fagyáspontja nem látható. Az eutektikus hőmérséklet környéke viszont jól vizsgálható ezekből az adatsorokból is.

A 20. ábrán a 150 mM-os NaCl oldatot, és lizozim fehérjét is tartalmazó minta amplitúdójának hőmérsékletfüggése látható (hűtés és fűtés közben is).



20. ábra. 150 mM-os fehérjés oldat ^1H -NMR jel amplitúdójának hőmérsékletfüggése

Az előző mérésekhez képest az amplitúdó értékek nagyságrendekkel nagyobbak voltak. Ez nem látszik az ábrán, mivel normáltam az adatsort a 0°C felett mért, 100 %-nak megfelelő értékek átlagával, hogy összehasonlítható legyen a ^{23}Na magon mért értékekkel. A -21°C körüli töréspont ebben az esetben is megfigyelhető, ezt a mért FID jelekhez tartozó spektrumok félértékszélesség-hőmérséklet grafikonja is mutatja. Az alacsonyabb hőmérsékleteken is látható proton NMR jel, tehát ebből a mérésből is megállapítható, hogy a fehérje és annak közvetlen környezete mobil maradt. A fentiekhez hasonlóan itt is kiszámolható, hogy az összes víztartalom mekkora hányada maradt mozgékony, de ez az információ számunkra, jelen dolgozatban nem lényeges.



21. ábra. 150 *mM*-os fehérjés oldat ^1H -NMR jele félértékszélességének hőmérsékletfüggése

A -21°C feletti hőmérsékleteken látható folyamatos amplitúdó csökkenés egy protonos mérésnél magyarázható a vízben található, "szabad" Na^+ ionok körül lévő vízréteg vékonyodásával. Ez a hidrátburok addig vékonyodik, amíg kizárólag a nátrium közvetlen közelében lévő molekulák maradnak oldat formában, majd az eutektikus hőmérsékleten az ionnal együtt megfagynak.

Az összehasonlításból arra következtethetünk, hogy sokkal hatékonyabban lehet a fehérje környezetével való kölcsönhatását vizsgálni ^{23}Na NMR-spektroszkópiával, mint protonon végzett hasonló mérésekkel.

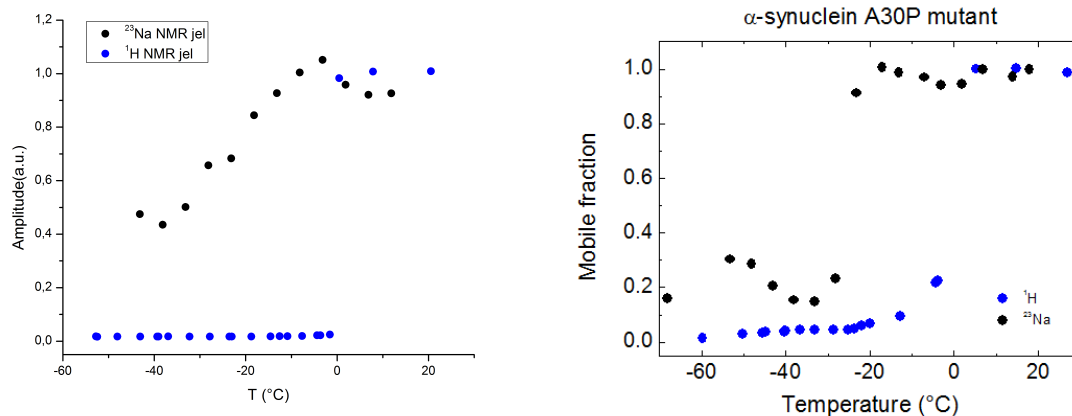
4.5. Összehasonlítás más fehérjékkel

Az eredményeimet összehasonlítottam más fehérjéken mért adatokkal [10]. A következő ábrákon bemutatott eredmények mind 150 *mM*-os sóoldatban feloldott fehérjéken lettek mérve, ^{23}Na -on, illetve protonon⁵. Az összehasonlításhoz használt fehérjék az ún. α – *synuclein* protein különböző mutációi.

A lizozim globuláris fehérje, míg az α – *synuclein* rendezetlen (*intrinsically disordered*). Vagyis a lizozim esetén a fehérjelánc stabil 3D szerkezetbe rendezett, az α –

⁵A lizozimot tartalmazó mintán mért ^1H -NMR jel amplitúdó értékek Bokor Mónika adatai.

synuclein fehérjelánca pedig nem rendelkezik meghatározott szerkezettel, sokféle konformáció létezhet egyidejűleg adott körülmények között. A rendezetlen fehérjék fajlagos oldószerrel érintkező felülete sokkal nagyobb, mint a globuláris fehérjéké.

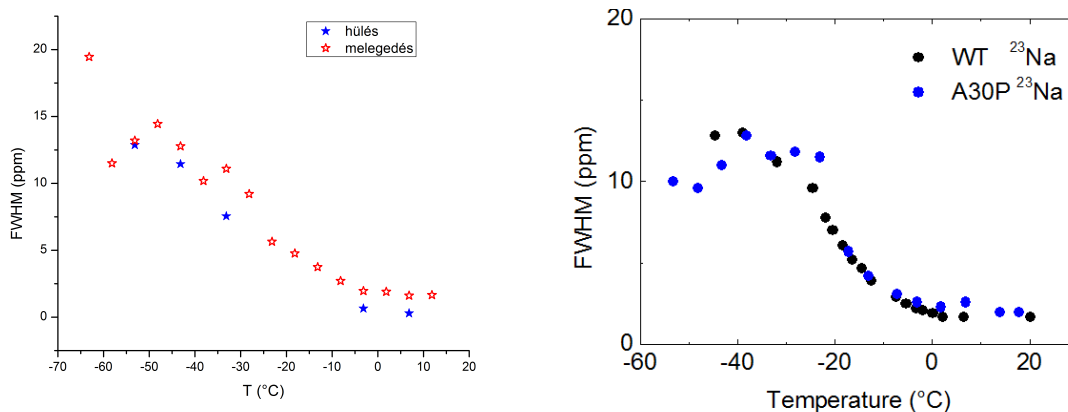


22. ábra. A bal oldali ábrán a lizozimot, a jobb oldalin pedig az α -*synuclein*-t tartalmazó mintákon mért adatsorok láthatóak [10]

A fenti ábrákon a két fehérje-típuson mind ^{23}Na magon, mind protonon mért FID adatsorok amplitúdóinak hőmérsékletfüggése látható. Az ábrákról leolvasható, hogy lizozimot tartalmazó mintában több Na^+ ion maradt mozgékony környezetben, -21°C alatt is, mint az α -*synuclein*-es oldatban, mivel az amplitúdó-értékek alacsony hőmérsékleten (kb. -50°C -tól -30°C -ig) az elsónél nagyjából kétszer akkorák, mint a másodiknál. Ez utóbbi a fehérjekoncentrációk különbségének tudható be, mivel a használt lizozimos oldat koncentrációja $3,49\text{ mM}$, míg az α -*synuclein*-é $2,75\text{ mM}$ volt (40 mg/ml -es koncentráció, és 14497 g/mol molekulatömeg mellett).

A ^1H adatsorok közül az α -*synuclein*-t tartalmazó mintán mért értékek a nagyobbak. Ez a fehérje rendezetlen jellegének tudható be, hiszen ennek az oldószerrel érintkező felülete nagyobb, így a körülötte lévő hidrátburok is.

Elmondható a két ábráról, hogy hasonló jellegűek, attól eltekintve, hogy a lizozimos minta ^{23}Na magon mért amplitúdóinál nem látható a hirtelen jelcsökkenés. (Ez utóbbi okát már korábban részleteztem.)



23. ábra. A bal oldali ábrán a lizozimot, a jobb oldalin pedig az α -synuclein-t tartalmazó mintákon mért adatsorok láthatóak [10]

A 23.ábra ugyanezen fehérjék Na magon mért spektrumainak félértékszélességét mutatja be. A jobb oldali ábrán ezúttal az α -synuclein fehérje két különböző mutációjára is szerepel. A két grafikon nagyon hasonló, különbség a spektrumok kiszélesedésének mértékében látható.

Az összehasonlítás alapján következtethetünk arra, hogy az általam mért, és korábban bemutatott adatok jó egyezésben vannak.

5. Összefoglalás

TDK munkám alatt a tojásfehérjében található lizozim fehérje viselkedését vizsgáltam, 100 *mM*-os és 150 *mM*-os NaCl oldatokban 3,5 *mM* koncentrációban feloldva, ^{23}Na NMR-spektroszkópiával. Arra a következtetésre jutottam, hogy a fehérje és a Na^+ ionok egymással kölcsönhatnak, és ennek erőssége függ a sóoldat koncentrációjától. Az általam is alkalmazott hőmérsékletfüggő mérések ezen kölcsönhatás jelenlétének, illetve erősségének meghatározására alkalmasak.

A vizsgálataim során megállapítottam, hogy egy lizozim molekula átlagosan a 100 *mM*-os oldatban 11 *db*, a 150 *mM*-os oldatban pedig 20 *db* Na^+ ionnal hatott kölcsön, illetve, hogy ez utóbbi a fehérje maximális ionkötő kapacitásának felel meg. Az elméleti várakozásoktól eltérően a használt kisebb koncentrációjú oldatban a lizozim nem érte el az előbbi, maximális darabszámot.

Végeztem méréseket ^1H NMR-spektroszkópiával is, ugyanezekben a mintákban. Ezekből azt a következtetést vontam le, hogy a fehérje környezetével való kölcsönhatásainak vizsgálatára alkalmas, érzékeny módszer az NMR-spektroszkópia. Az ^1H -NMR spektroszkópiával közvetett, a ^{23}Na -NMR spektroszkópiával pedig direkt információ nyerhető a fehérjének a Na^+ ionokkal való kölcsönhatásáról és mennyiségileg jellemezhető így az ionkötő képesség.

A dolgozatban összehasonlítottam a kapott eredményeket más fehérjéken végzett hasonló mérésekkel. Azt találtam, hogy a fehérjék viselkedése hasonló, az eltérések az egyes fehérjefajták egyedi különbségeiből adódtak.

Jelen méréseket tervezem a jövőben folytatni, más vad típusú, mutáns, vagy denaturált fehérjemintákban, esetleg összetettebb rendszereken is. A dolgozat tartalma ezen mérések tervezésének és kivitelezésének is alapjául fog szolgálni.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, Bokor Mónikának és Simon Ferencnek a sok segítséget a mérésekben és a dolgozat elkészítésében is.

Szeretném megköszönni Karsa Anitának, és Bokor Mónikának, hogy eredményeiket felhasználhattam a dolgozatomban.

Továbbá köszönöm Karsa Anitának, hogy lehetővé tette a nyári gyakorlatokat, illetve Békési Annának a közös munkát.

Irodalomjegyzék

- [1] <http://www.webelements.com/sodium/isotopes.html>.
- [2] <http://www.webelements.com/chlorine/isotopes.html>.
- [3] C.P. Slichter. *Principles of Magnetic Resonance*. Lecture Notes in Computer Science. Springer, 1990.
- [4] <http://mri-q.com/bloch-equations.html>, May 2014.
- [5] <http://en.wikipedia.org/wiki/Lysozyme>, 2014.
- [6] J. Lusk. Calibration of gas pressure using the mercury melting curve in conjunction with eutectic ice-salt mixtures. *Meas. Sci. Technol.* 1: 852-856, 1990.
- [7] Eiichi Fukushima and S.B.W. Roeder. *Experimental Pulse NMR: A Nuts and Bolts Approach*. Advanced book program. Addison-Wesley, 1993.
- [8] Karsa Anita. *²³Na and ³⁵Cl NMR of saline solutions*. 2014.
- [9] Kamasa Pawel et al. Unpublished results.
- [10] P. Matus, M. Bokor, P. Tompa, E. Hazy, and K. Tompa. Multinuclear nmr in buffered aqueous solutions of alpha-synuclein mutants. *European Biophysics Journal* 40: Suppl. 1 206-206., 2011.