

Mágneses magrezonancia (NMR) módszerek fejlesztése és alkalmazása: molekulák szerkezetmeghatározása és biomolekuláris kölcsönhatások jellemzése

E. KÖVÉR Katalin*

Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Debrecen 4032, Egyetem tér 1.

A mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia egyedülálló potenciálját kémiai szerkezeti problémák megoldására a kémikusok már néhány évvel a jelenség első észlelése (F. Bloch, E. M. Purcell, 1946) után felismerték. Széles körű gyakorlati alkalmazására – a módszer viszonylagos kis érzékenysége miatt – viszont még sokáig nem került sor. Az érzékenység növelésében áttörést eredményezett az impulzus Fourier-módszer bevezetése, a stabil szupravezető mágnesek megjelenése, majd a hűtött mérőfejek alkalmazása az ezredforduló környékén. Mindezekkel párhuzamosan a mai napig töretlenül folynak NMR méréstechnikai fejlesztések, amelyek hajtóereje az elmúlt évtizedek alatt mit sem változott: elsődleges cél az érzékenység és a spektrális felbontás javítása, valamint a spektrumok kiértékelését zavaró jelek, nem kívánt moduláló hatások kiszűrése, ezáltal az alkalmazások kiterjesztése biomolekulák szerkezetének vizsgálatára.

E célkitűzésekhez kapcsolódva kutatócsoportunk az elmúlt évtizedekben jelentős eredményeket ért el olyan új NMR módszerek fejlesztésében, amelyek alkalmasak a molekulák szerkezeti és dinamikai paramétereinek érzékeny, pontos és megbízható meghatározására, valamint felhasználhatók komplex molekuláris kölcsönhatások atomi szintű vizsgálatára is. Hogy ezekről az eredményekről itt beszámolhatok köszönettel tartozom azoknak, akik ehhez a feltételeket – az NMR szerkezetkutatások Debrecenben történő meghonosítása révén – biztosították.

A debreceni NMR története 1971-re nyúlik vissza, amikor néhai Bognár Rezső akadémikus felismerve az NMR spektroszkópia alkalmazásának jelentőségét kémiai szerkezeti problémák megoldására megbízta fiatal kollégáját, Szilágyi Lászlót – aki akkor tért vissza strasbourgi tanulmányútjáról, ahol a későbbi Nobel-díjas Jean-Marie Lehn laboratóriumában mélyítette el ismereteit az NMR módszer területén – a laboratórium megszervezésével és működtetésével. Így 1971-ben megkezdte működését az ország első 100 MHz-es NMR spektrométere Debrecenben. A következő mérföldkő a debreceni NMR történetében 1981 volt. Ekkor helyezték üzembe az ország első szupravezető mágnessel üzemelő spektrométerét, ami Bognár Rezső, Makleit Sándor, Nánási Pál és Lipták András professzorok, a Szerves Kémiai és Biokémiai Tanszék akkori vezetőinek támogatásával került beszerzésre. Azt követően 1995-ben következett be jelentős előrelépés a debreceni NMR laboratórium műszerállományban az ország első 500 MHz-es spektrométere üzembe helyezésével. A spektrométerek 2008-ban történt jelentősebb felújítása tette lehetővé, hogy a debreceni NMR laboratórium egy FP7-es pályázat keretében négy éven keresztül európai mérésszolgáltató központként

is működött. A debreceni NMR 40 éves történetéről részletesebben olvashatnak a Magyar Kémiai Folyóirat számára készített összefoglaló tanulmányban.¹

1981-ben, Batta Gyulával gyakorlatilag egyidőben kapcsolódtam be az NMR laboratórium kutató- és oktató munkájába, és attól kezdve foglalkozom NMR módszerek fejlesztésével és azok különböző szerkezeti problémák megoldására történő alkalmazásával.

Az NMR spektroszkópia sikere elsősorban annak tulajdonítható, hogy a molekulák szerkezetéről és mozgási jellemzőiről folyadék fázisban, atomi felbontásban képes egyidejűleg információt adni. Ezen sajátságok vizsgálata számos NMR paraméter mérésével történik, amelyek meghatározására egy- és többdimenziós NMR módszerek sokaságát dolgozták ki napjainkig. Ezen módszerek halmaza egy nyitott halmaz, amely egyrészt új módszerekkel, valamint a meglévők továbbfejlesztésével bővíthető. Az elmúlt évtizedek alatt ezt a halmazt néhány elemmel – új kísérletekkel – mi is gazdagítottuk.

A metodikai fejlesztések elsődleges célja az NMR paraméterek pontos, megbízható és lehetőleg gyors meghatározása. Ezzel összhangban kutatócsoportunkban olyan új kísérleteket terveztünk/tervezünk, amelyek az érzékenység növekedését, a spektrális felbontás javulását, a nem kívánt, zavaró kölcsönhatások kiküszöbölését, az összes hasznos jel (mágnesezettség) detektálását, valamint a spektrumok kiértékelését zavaró jelek hatékony kiszűrését eredményezik. Mindezt a kísérleteket felépítő szekvencia-építőelemek (modulok) megfelelő összekapcsolásával, tervszerű kombinálásával értük el.

Az elmúlt 30 évben a módszerfejlesztési kutatásokat három fő területen végeztük:

1. Új, érzékeny módszereket dolgoztunk ki az NMR szerkezeti paraméterek: skaláris spin-spin csatolási állandó, valamint maradék dipoláris csatolási állandó pontos mérésére.
2. Az NMR relaxációs dinamikai módszert továbbfejlesztve új kísérleteket dolgoztunk ki az NMR dinamikai paraméterek meghatározására: a heteronukleáris relaxációs sebességek, relaxációs interferencia kölcsönhatások vizsgálatára, valamint homo- és heteronukleáris NOE mérésére.
3. Az utóbbi években új, érzékeny módszereket fejlesztettünk ki és vezettünk be a molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára.

* A közlemény E. Kövér Katalin az MTA levelező tagja 2013. december 10-én tartott akadémiai székfoglaló előadásának szerkesztett változata.

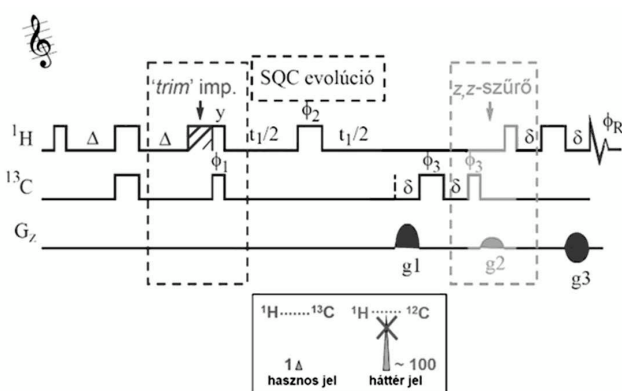
Az alábbiakban mindhárom témában elért eredményeinkről – egy-egy példán keresztül, a teljesség igénye nélkül – szeretnék ízelítőt adni.

I. NMR szerkezeti paraméterek – homo- és heteronukleáris spin-spin csatolási állandó mérése

Az NMR spektrumból kiolvasható két legfontosabb paraméter a *kémiai eltolódás és a spin-spin csatolási állandó*. A kémiai eltolódás a rezonanciajel helyét adja meg a spektrumban, értéke az atommag elektron (kémiai) környezetétől függően más és más lesz. A rezonanciajelek a magok között – kémiai kötésen keresztül – működő, elektron-közvetített spin-spin csatolásnak köszönhetően felhasadnak és finomszerkezettel rendelkező multipletteket adnak. A multiplett vonalainak távolsága (Hz-ben) adja meg a kölcsönhatás erősségét jellemző csatolási állandót.

A csatolási állandó (J) fontos információt ad a molekulák téralkatáról, azaz konformációjáról. A háromkötéses proton-proton csatolási állandó és a megfelelő torziós szög közötti összefüggést leíró, Martin Karplus által (1959-ben, még az NMR hőskorában) elméleti úton megalkotott egyenlet, hihetetlen népszerűsége tett szert a molekulaszervezeti kutatásokban. Az 1963-ban Journal of the American Chemical Society-ben közölt cikke a folyóirat történetében a 17. legtöbbet idézett közlemény.

Az elmúlt években több új, érzékeny, egy- és kétdimenziós NMR kísérletet fejlesztettünk ki a fontos szerkezeti információt hordozó homo- és heteronukleáris csatolások pontos és gyors meghatározására, és különböző bonyolultságú molekulán végzett mérésekkel bizonyítottuk a javasolt módszerek alkalmazhatóságát. A homonukleáris proton-proton csatolási állandó mérésére a gradiens TOCSY kísérlet fázisérzékeny változatát javasoltuk. A kísérlet eredményeként kapott tisztán abszorpciós fázisú multiplettek analízisével a csatolási állandó ($J_{H,H}$) értéke pontosan meghatározható.²

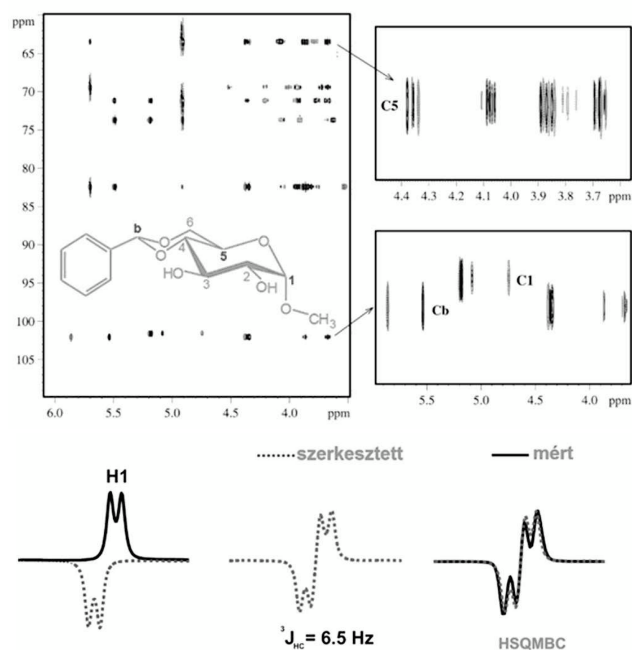


1. Ábra. A többkötéses heteronukleáris csatolási állandó mérésére kifejlesztett HSQMBC-kísérlet 'kottája'.

A heteronukleáris csatolási állandó ($^1J_{H,X}$) mérésére több módszert is kifejlesztettünk. Protonált X (például ^{13}C -H, ^{15}N -H) atom esetén a heteronukleáris eltolódás korreláció alapuló HSQC-TOCSY,³ illetve a homonukleáris eltolódás korreláció alapuló X(ω 1)-szerkesztett TOCSY gradiens kísérletek növelt-érzékenységu és fázisérzékeny változatait

javasoltuk.⁴ Az utóbbi években sikerült egy olyan – általánosabban alkalmazható – módszert is kidolgoznunk, amivel mind a protonált, mind a nem-protonált heteroatomok többkötéses (távolható) csatolásai egyaránt mérhetők.⁵ A javasolt HSQMBC (*Heteronuclear Single Quantum Multiple Bond Correlation*) kísérlet tulajdonképpen a HSQC kísérlet többkötéses heteronukleáris csatolásokra optimalizált megfelelője. A kísérlet 'szekvencia-kottája' az 1. ábrán látható.

A kiemelt szekvencia építőelemeknek (tisztító 'trim' impulzus, z,z-szűrő) köszönhetően a kísérlet hatékonyan elnyomja a nem kívánt, nagy intenzitású 'háttér' protonjelet. Ez szén esetén – figyelembe véve az NMR-aktív szén-13 izotóp 1%-os természetes izotópgyakoriságát – a hasznos jelnek közel 100-szorosa. A módszer további előnye, hogy a kísérlet eredményeként többnyire tisztán abszorpciós fázisú multipletteket kapunk, amikből a meghatározni kívánt csatolási állandók a multiplettek manuális vagy számítógépes illesztésével pontosan kiolvashatók. Továbbá a multiplettek fázismintázata alapján a csatolás előjele is meghatározható, amint ezt a 2. ábrán egy glükóz-származék példáján szemléltetem.

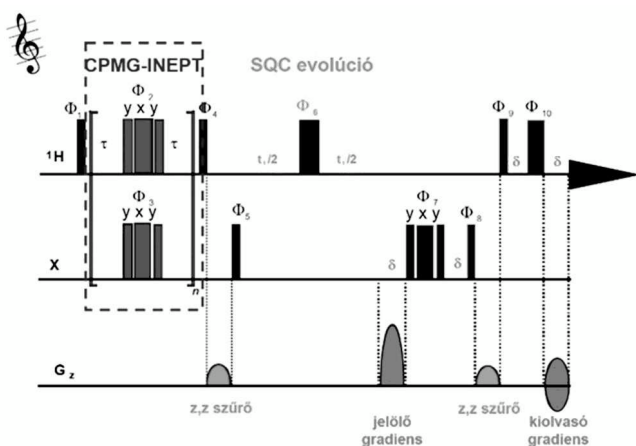


2. Ábra. Heteronukleáris $^1J_{H,X}$ csatolási állandó mérése egy glükóz-származékon. A H1-C5 HSQMBC-multiplett analízisével meghatározott csatolási állandó, $^3J_{H1,C5} = 6.5$ Hz.

A kinagyított két spektrumrészleten jól látható az egy- és többkötéses korrelációs csúcsok finomszerkezete (a különböző fázisú jelek különböző színnel vannak jelölve). A szerkesztett (számított) és mért HSQMBC-multiplettek jó egyezése igazolja a meghatározott csatolási állandó pontosságát és megbízhatóságát.

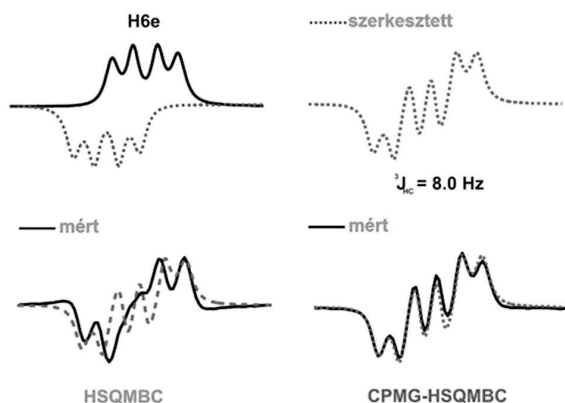
Összetettebb ^1H multiplettek és nagy proton-proton csatolás esetén – ez szénhidrátoknál gyakran előfordul – azt tapasztaltuk, hogy a HSQMBC-multiplettek a proton-proton csatolás evolúciója miatt torzulnak, és emiatt a heteronukleáris csatolási állandó mérése bizonytalaná válik. Ennek kiküszöbölésére a HSQMBC kísérletet egy új

szekvencia-elem (CPMG-INEPT) beépítésével módosítottuk (3. ábra). A CPMG-INEPT blokk hatékonyan elnyomja a zavaró proton-proton csatolási evolúciót, ugyanakkor fenntartja az aktív heteronukleáris csatolás fejlődését.⁶



3. Ábra. A többkötéses heteronukleáris csatolási állandó mérésére kifejlesztett CPMG-HSQMBC-kísérlet 'kottája'.

A CPMG-HSQMBC kísérlet eredményeként tisztán abszorpciós fázisú multipletteket kapunk összetett, többszörös proton-proton csatolással bíró ¹H multiplettek esetén is. Ezt a 4. ábrán az előző glükóz-származék H6e-hez tartozó dupla dublett példáján szemléltetem.



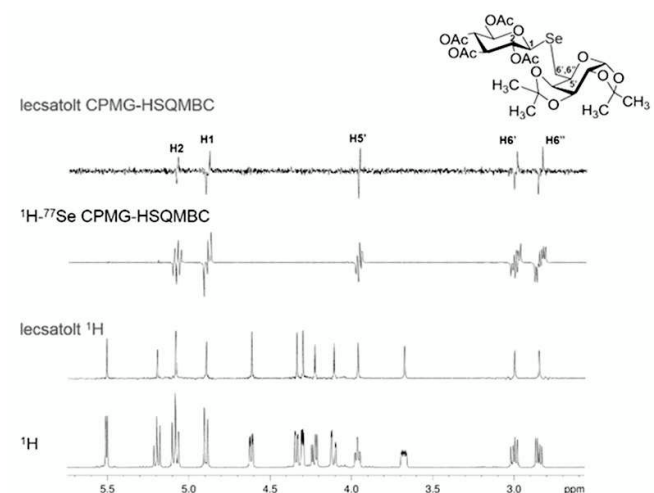
4. Ábra. H6e-hez tartozó torzult HSQMBC- és tiszta fázisú CPMG-HSQMBC multiplettek összehasonlítása.

A módszer széleskörű alkalmazhatóságát számos különböző bonyolultságú molekula (szacharóz, sztrichnin, tengeri baktériumból izolált makrolid) proton-szén (illetve egyéb molekulák proton-nitrogén, proton-foszfor) csatolásainak meghatározásával bizonyítottuk. További módosításoknak köszönhetően olyan magok heteronukleáris csatolásai is mérhetők, amelyek kémiai eltolódása erősen hőfokfüggő (mint például ⁷⁷Se).⁷

Kutatócsoportunkban, Szilágyi László és munkatársai által szintetizált tio- és seleno-glikozidok enzimgátló aktivitásuknak köszönhetően alkalmasak lehetnek szénhidrát alapú kemoterapeutikumok, szintetikus vakcinák kifejlesztésére. A Se jelenléte ezekben a molekulákban olyan NMR szerkezetvizsgálati lehetőségekre ad módot, amelyek a megfelelő O- vagy S-analógokban nem lehetségesek.

Kísérleti adatok valamint elméleti, *ab initio* számítások alapján kimutattuk, hogy a ⁷⁷Se-¹H spin-spin csatolási állandók szélesebb skálán változnak, és érzékenyebbek a konformációra, mint az ¹H-¹H vagy ¹³C-¹H csatolások, így alkalmasak Se-glikozidok és származékaik konformációs analizisére.^{8,9}

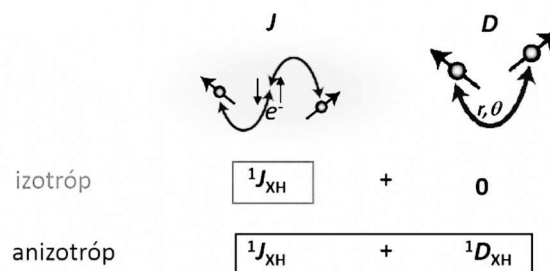
A CPMG-HSQMBC multiplettek analizisét bonyolítja az azonos- és ellenfázisú jelek szuperpozíciója miatt esetenként fellépő jelkioltás. A proton-proton csatolás okozta – a jelek azonos fázisú felhasadását eredményező – jelfelhasadás megszüntetésére szélessávú ¹H-lecsatolást alkalmaztunk.¹⁰ A lecsatolt CPMG-HSQMBC kísérlet eredményeként kapott ellenfázisú dublettből a heteronukleáris csatolási állandó egyszerűen és pontosan meghatározható (5. ábra).



5. Ábra. Seleno-diglikozid proton-csatolt és szélessávú proton-lecsatolt ¹H és CPMG-HSQMBC spektrumai.

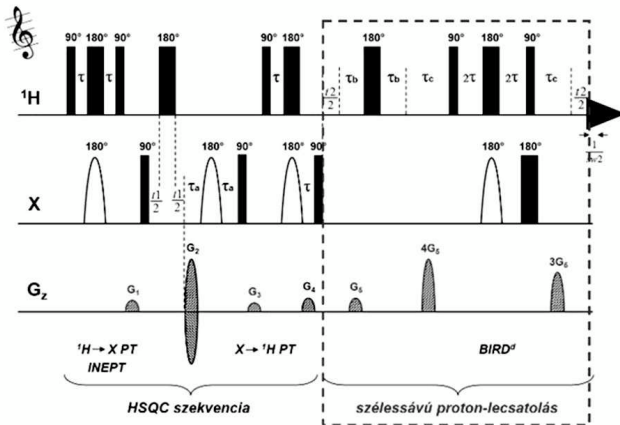
Az utóbbi időkben az NMR spektroszkópia eszköztára tovább bővült a gyengén orientált (pl. folyadékkristályos) rendszerekben mérhető maradék dipoláris csatolásokkal (RDC). A szerkezeti és dinamikai információt hordozó RDC fontos szerepet tölt be biomolekulák – fehérjék, szénhidrátok, nukleinsavak – szerkezetfinomításában.

A távolság (*r*) és orientáció (*θ*) függő dipoláris csatolást a molekulák mozgása skálazza. Így izotróp közegben – teljesen rendezetlen mozgás esetén – a dipoláris csatolás nullára átlagolódik, míg anizotróp fázisban a molekulák részlegesen rendezett mozgása miatt a dipoláris csatolás átlaga nullától különbözik, és a skaláris csatolás nagyságát növeli illetve csökkenti (6. ábra).



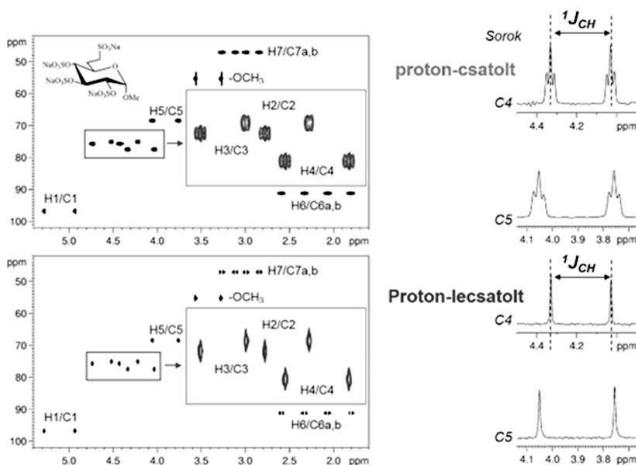
6. Ábra. Skaláris (*J*) és dipoláris (*D*) csatolás izotróp és anizotróp fázisban.

Az egykötéses heteronukleáris skaláris és dipoláris csatolások mérésére általában a HSQC-kísérletek – F2- (detektálás) vagy F1- (indirekt) dimenzióban – X-csatolt változatait használják. Mindkét esetben nem kívánt, zavaró modulációk is fellépnek, amelyek bizonytalanná teszik az esetenként csak néhány Hz-nyi RDC effektus mérését.^{11,12} A proton-proton csatolás okozta extra jelfelhasadás kiküszöbölésére szélessávú proton-lecsatolást alkalmaztunk (7. ábra).^{13,14}



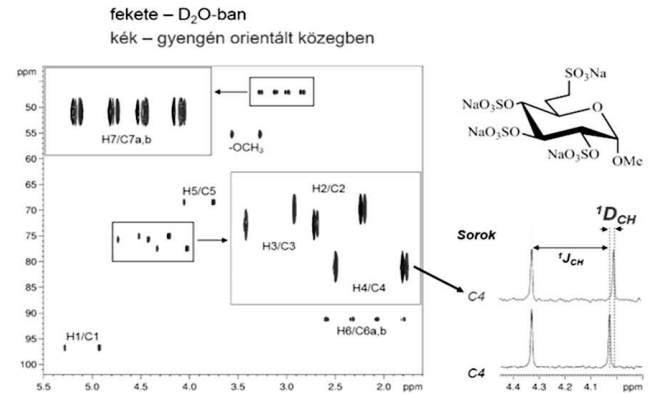
7. Ábra. Szélessávú proton-lecsatolt, detektálás ideje alatt (F2-dimenzióban) X-csatolt HSQC kísérlet 'kottája'.

A proton-lecsatolás eredményeként **éles dubletteket** kapunk, amikből a kívánt csatolási állandók ($^1J_{H,X}$) egyszerűen meghatározhatók (8. ábra), egyben lehetőséget adva az orientált közeg által előidézett kis RDC effektus ($^1D_{H,X}$) pontos mérésére is (9. ábra).

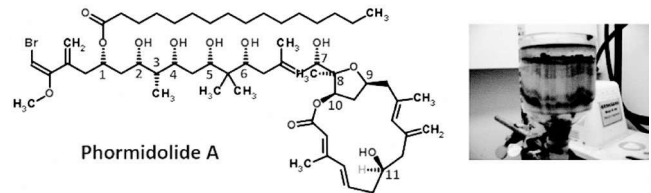


8. Ábra. Hagyományos, F2-dimenzióban ^{13}C -csatolt HSQC spektrum (fent), és a megfelelő szélessávú proton-lecsatolt HSQC spektrum (lent). Két szénatomhoz (C4, C5) tartozó multiplettek a 2D spektrumoktól jobbra láthatók.

Végezetül egy bonyolultabb szerkezetű, tengeri baktériumból izolált, polioli-típusú természetes vegyület – phormidolide-A (10. ábra) – NMR-paramétereken alapuló szerkezetmeghatározását mutatom be.

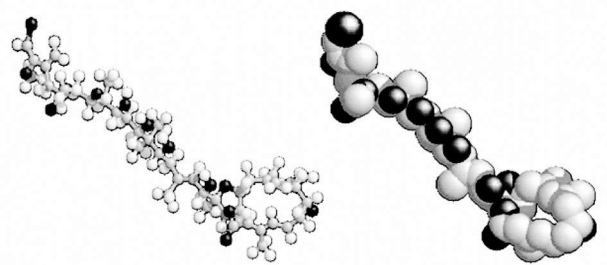


9. Ábra. Szélessávú proton-lecsatolt, F2-dimenzióban ^{13}C -csatolt HSQC spektrum izotróp (D_2O) és anizotróp közegben. Az RDC ($^1D_{\text{CH}}$) meghatározását a C4-szénatomhoz tartozó dubletten szemléltetem.



10. Ábra. Tengeri baktériumból (cyanobacteria) izolált, rákellenes hatással rendelkező makrolid.

Az előzőekben említett kísérletekkel mért homo- és heteronukleáris csatolások alapján sikerült megállapítanunk a molekulában található 11 királis szénatom relatív konfigurációját. A molekula háromdimenziós (3D) szerkezetének meghatározásához a skaláris csatolásokon kívül a ROESY-spektrum alapján becslött proton-proton távolságokat is felhasználtuk. A valamennyi NMR-korlát (kényszerfeltétel) felhasználásával számolt legkisebb energiájú szerkezet a 11. ábrán látható.

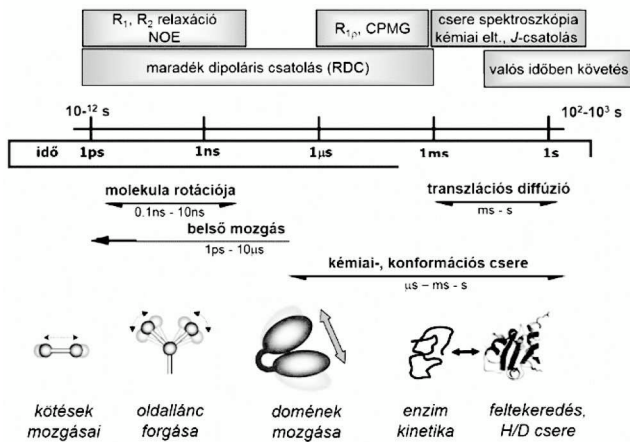


11. Ábra. Phormidolide-A NMR-korlátok alapján számított legkisebb energiájú 3D szerkezete.

II. NMR és dinamika kapcsolata

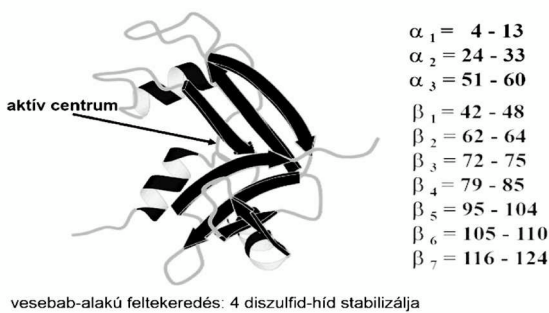
Az NMR módszer erőssége abban rejlik – és ebben vitathatatlanul verhetetlen –, hogy nemcsak a molekulák statikus szerkezetéről, hanem az igen széles (ps – perc/óra, 15 nagyságrend!) tartományban történő molekuláris mozgásokról is képes információt adni atomi szintű felbontásban. A különböző időablakban zajló molekuláris mozgások (dinamika) felderítése fontos adalékul szolgálhat például a felismerési folyamatok atomi/molekuláris szintű megértéséhez, vagy a fehérjék 3D szerkezetének

kialakulásának illetve megszűnésének – feltekeredésének/ kitékeredésének – megértéséhez. A tanulmányozni kívánt mozgás időskálájától függően más és más NMR módszert alkalmazunk a dinamika vizsgálatára (12. ábra).



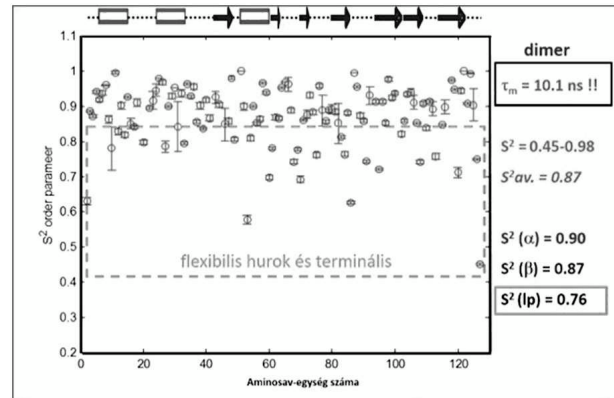
12. Ábra. A különböző molekuláris mozgások időablaka és a vizsgálatukra alkalmas NMR módszer(ek).

Mivel az NMR relaxáció forrása a molekulák véletlenszerű, rendezetlen (random) rotációja által keltett fluktuáló elektromágneses tér, így nem meglepő, hogy a ^{15}N - és/ vagy a ^{13}C -magok relaxációs idejét (sebességét) mérve – kiegészítve a kereszt-relaxációtól függő egyensúlyi $X\{^1\text{H}\}$ NOE-val, valamint a változatos CSA/DD relaxációs interferencia mérésekkel – képet kaphatunk egyrészt a molekulák globális és belső dinamikájáról, másrészt az anizotróp kémiai eltolódás (CSA) nagyságáról és orientációjáról is. A Lipari-Szabó féle NMR relaxációs dinamikai módszer kiterjesztésével¹⁵ meghatároztuk több fehérje, köztük a humán tumorterápiában ígéretesnek mutató hasnyálmirigy ribonukleáz (HP-RNáz) (13. ábra) biológiai funkciójához kapcsolódó mozgási és aggregációs sajátságait.^{16,17}



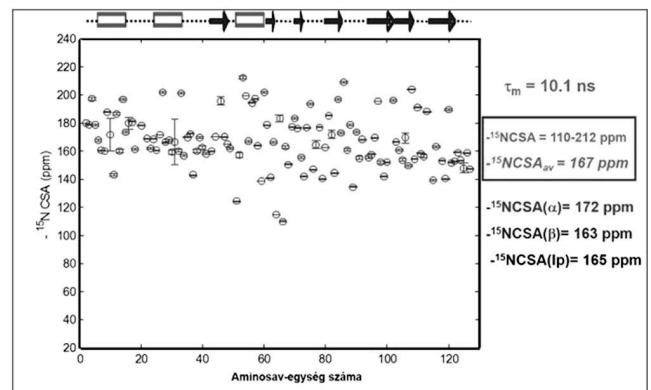
13. Ábra. Humán hasnyálmirigy ribonukleáz (HP-RNáz) NMR-szerkezete.

Az általunk kiterjesztett NMR relaxációs dinamikai modellt alkalmazva egyértelműen igazoltuk, hogy a különböző másodlagos szerkezeti elemek (α -hélix, β -redő) belső flexibilitása eltérő (14. ábra). A számított globális korrelációs idő ($\tau_m = 10,1$ ns) alapján valószínűsíthető, hogy a fehérje dimerizálódik, amit a diffúziós NMR (DOSY) és az ultracentrifugás mérések is megerősítettek.



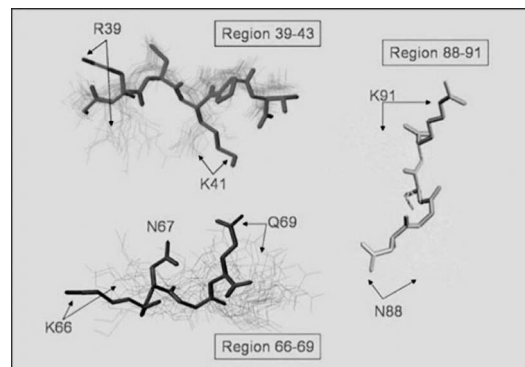
14. Ábra. Humán hasnyálmirigy ribonukleáz (HP-RNáz) ^{15}N -relaxációs sebességekből számolt rend paraméterei (S^2) az aminosav szekvencia mentén.

A ^{15}N CSA átlagértéke (-167 ppm) megfelel az irodalomban elfogadottnak, viszont a szekvencia függvényében jelentős különbségek figyelhetők meg (110-210 ppm tartományon belül változnak), valamint a másodlagos szerkezetekre kapott átlagértékek is jelentős eltérést mutatnak (15. ábra).



15. Ábra. Humán hasnyálmirigy ribonukleáz (HP-RNáz) ^{15}N CSA értékeinek változása az aminosav szekvencia függvényében.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a biológiai aktivitásért felelős hurok-régiók a μs -ms időskálán flexibilisek, egymásba alakuló konformerek sokaságával jellemezhetők (16. ábra). Feltehető, hogy a fehérjének ez a belső molekuláris mozgása – flexibilitása – fontos szerepet játszik a biológiai funkció alapjául szolgáló molekuláris felismerésben, továbbá valószínűsíti a konformáció szelektációs modellen alapuló felismerést.

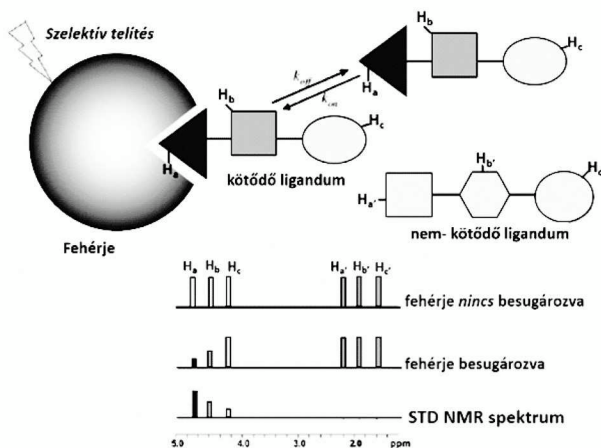


16. Ábra. A biológiai aktivitásért felelős hurok-régiók flexibilitása.

III. Molekuláris kölcsönhatások NMR vizsgálata

Az NMR spektroszkópia a molekuláris felismerésért felelős fehérje-ligandum kölcsönhatások vizsgálatának is rendkívül hatékony és sokoldalúan alkalmazható kutatási eszköze. Attól függően, hogy a ligandum kis affinitással (K_d nagyobb mint 10^{-5}), vagy nagy affinitással (K_d kisebb mint 10^{-8}) kötődik a fehérjéhez eltérő stratégiát kell alkalmazni a kötődés vizsgálatánál. Kis affinitású ligandumok – azaz gyenge kölcsönhatás – esetén, az ú.n. ligandum-detektáláson alapuló módszereket használjuk. Ilyenkor a nagy feleslegben alkalmazott ligandum jelen mérjük a fehérjével való kölcsönhatás eredményeként bekövetkező változást, például a jelintenzitás, relaxációs sebesség és/vagy diffúziós állandó változását. A ligandum detektáláson alapuló kísérletek legnagyobb előnye, hogy általában gyorsak, nem igényelnek költséges izotópjelzést, a fehérje méretére vonatkozólag nincs felső határ, sőt minél nagyobb fehérje annál nagyobb az effektus, és a vizsgálatokhoz többnyire kis ($10\text{-}50\ \mu\text{M}$) fehérje koncentráció is elegendő. A kísérletek eredményeként információt kaphatunk a ligandum kötésben résztvevő csoportjairól, a kötött ligandum biológiailag aktív konformációjáról, valamint a kölcsönhatás erősségéről, illetve annak specifikus vagy nem-specifikus jellegéről is.

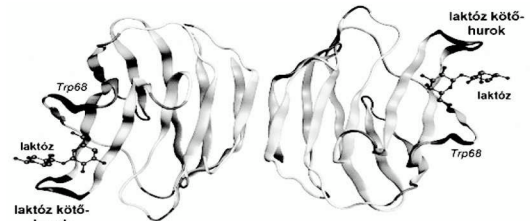
A ligandum-detektáláson alapuló módszerek közül a telítés-átviteli (STD) kísérlet messze a legnépszerűbb.¹⁸⁻²¹ A kísérlet lényegét a 17. ábrán szemléltetem. A fehérje proton-átmeneteit szelektíven besugározva (telítve), a telítés hatása a kölcsönhatás révén áttevődik a ligandumra is, és annak jelintenzitás változását eredményezi. Minél közelebb kerül a ligandum a fehérje kötőhelyéhez, illetve az ott lévő H-atomokhoz, annál erősebb lesz a telítés-átviteli effektus. A nem-kötődő ligandumra viszont nincs hatása a besugárzásnak. A kötődő ligandum jelintenzitás-változását differencia kísérlettel mérjük, ehhez két kísérletet végzünk – egyiket fehérje-besugárzással, a másikat pedig anélkül. A kísérletek eredményeként kapott két spektrum különbsége az STD-spektrum, amelyben csak az a ligandum ad jelet, amely kötődik a fehérjéhez.



17. Ábra. A telítés-átviteli differencia (Saturation Transfer Difference, STD) kísérlet sémája.

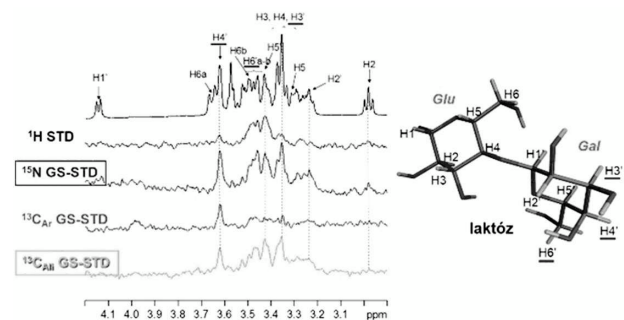
A klasszikus ^1H STD kísérletek alkalmazását megnehezíti vagy esetenként teljesen kizárja a hasonló kémiai szerkezetű ligandumok, vagy a ligandum és fehérje proton rezonanciajeleinek átfedése. Például több hasonló

ligandummal végezve kompetíciós titrálást, az STD jelek hozzárendelése és kvantitatív kiértékelése a jelátlapolás miatt nem adható meg egyértelműen. Amikor viszont a fehérje és a ligandum rezonanciajelei vannak átfedésben, akkor a hagyományos STD kísérlettel a fehérje átmenetei nem telíthetők szelektíven. Mindkét probléma megoldására javasoltunk megoldást: egyrészt izotóp-szelekciót,²² másrészt ^1H -($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$) csoport-szelektív (GS) telítésen²³ alapuló STD kísérletek kifejlesztésével. Ez utóbbi esetén egy olyan hatékony telítési módszert alkalmaztunk, amivel a ^{15}N - és/vagy ^{13}C - izotóppal jelölt fehérje valamennyi izotópjelölt-proton átmenete egyidejűleg és hatékonyan telíthető még abban az esetben is, amikor a ligandum rezonanciajeleivel teljes az átfedés. A módszer további előnye, hogy a 'közvetlen' (direkt) telítés révén a fehérje azon flexibilis kötő-régiói is hatékonyan telíthetők, amelyeknél a spin-diffúzió alapuló telítés a régió mozgékonyasága miatt nem hatékony. A GS-szekvencián alapuló telítés 'kémiai szelektivitása' – azaz a fehérje (^{15}N)-H, (^{13}C)-alifás illetve -aromás H-jeinek szelektív gerjesztése – lehetővé teszi a ligandum-fehérje kölcsönhatás révén kialakuló komplex szerkezeti jellemzőinek a fehérje oldaláról való feltérképezését és pontosabb megismerését is. A módszer alkalmazását a galektin 1 és laktóz kölcsönhatás vizsgálatának példáján keresztül szemléltetem (18-20. ábra).²⁴



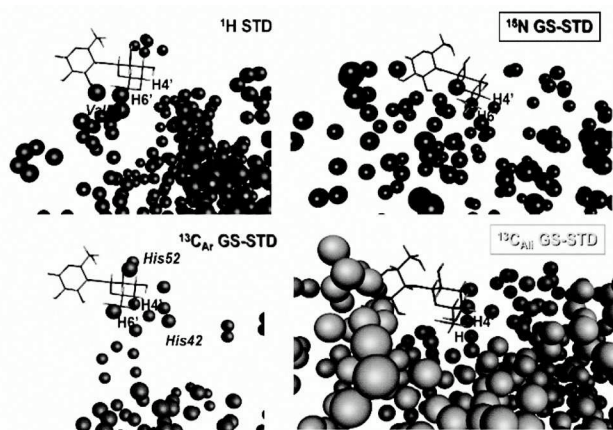
18. Ábra. Galektin 1 (Gal-1) β -galaktózid-kötő fehérjék csoportjába tartozik (29 kDa). Tumorelleses terápiában ígéretes célfehérjeként tartják számon. Martinek Tamás és munkatársai (Szeged) ^{15}N relaxációs mérések és molekula dinamikai szimulációk alapján bizonyították, hogy a laktóz kötőhurok flexibilis.

A ^{15}N - és ^{13}C -izotóppal jelölt fehérjén végzett STD-kísérletek eredményei a 19. ábrán láthatók. Megfigyelhető, hogy különböző fehérje telítési szekvenciát alkalmazva – metil-hidrogéneket, (^{15}N)-H/H₂-t, (^{13}C)-ArH-t, vagy (^{13}C)-alifásH-t telítve – a kapott STD-spektrumokban a jelek intenzitása jelentősen különbözik. Megállapítható továbbá, hogy a laktóz galaktóz egységén általában nagyobb a mért STD effektus, ami arra utal, hogy a diszacharid a galaktóz felőli részével kötődik a fehérjéhez.



19. Ábra. A Gal-1 és laktóz komplex ^1H STD és multinukleáris GS-STD spektrumai.

A különböző STD spektrumokban észlelt jelentős intenzitás különbségek magyarázatára a 20. ábrán az egyes kísérletekben érintett, besugárzott fehérje-protonok színes golyókkal vannak jelölve. Mint látható – összhangban a észlelt STD intenzitásokkal –, a fehérje döntően alifás oldalláncaival és NH/NH₂ csoportjaival vesz részt a kölcsönhatásban, azaz a Gal-1 – laktóz komplexben képződésében.



20. Ábra. A különböző STD kísérletek fehérjét érintő 'kémiai szelektivitása'. A pöttyök az adott kísérletben besugárzott fehérje-protonokat jelölik, melyek laktóz körüli 'sűrűsége' befolyásolja a mérhető STD-effektus erősségét.

A bemutatott példán kívül számos további szénhidrát-, peptid- és polifenol-származék fehérjékhez történő kötődését jellemeztük STD NMR kísérlettel.¹⁸⁻²¹

Összefoglalás

Az NMR spektroszkópia immár közel hetvenéves története bizonyította, hogy ez a technika a molekulák szerkezetének, mozgási jellemzőinek és a molekuláris kölcsönhatások vizsgálatának rendkívül hatékony kutatási eszköze. Ezért talán minden elfogultság nélkül mondhatjuk, hogy az NMR spektroszkópia a szerkezetvizsgáló módszerek 'piramisát' mintegy megkoronázza (21. ábra).



21. Ábra. A szerkezetvizsgáló módszerek 'piramisa'.

Az utóbbi években az NMR egyre növekvő szerepet tölt be biopolimerek (fehérjék, nukleinsavak) szerkezetének és mozgásának atomi szintű leírásában is. A mai napig több mint 10 000 NMR szerkezetet töltöttek fel a fehérje (PDB) adatbázisba. Mivel pontos és megbízható adatokkal szolgál a szerkezet-dinamika-biológiai hatás összefüggéseinek felderítéséhez, ezért hozzájárul új, hatékony és nagy specificitású gyógyszerhatóanyagok tervezéséhez, kifejlesztéséhez. Az NMR sikertörténete tehát töretlenül folytatódik, és remélhetőleg a 'történet' folytatásának egyre több élvezője és aktív résztvevője lesz.

Köszönetnyilvánítás

Először szeretnék köszönetet mondani ajánlóimnak, Hargittai Magdolna, Blaskó Gábor, Medzihradzky Kálmán és Sohár Pál akadémikusoknak és a Kémiai Osztály tagjainak támogatásukért.

Köszönöm az NMR laboratórium minden munkatársának, volt és jelenlegi hallgatóinak sokoldalú segítségüket, támogatásukat és barátságukat. Szeretnék külön köszönetet mondani Szilágyi Lászlónak, aki tudományos munkámat mindvégig figyelemmel kísérte és támogatta. Köszönöm a szakmai együttműködést és megtisztelő barátságát. Köszönettel tartozom Batta Gyulának is a több évtizedes, eredményes szakmai együttműködésért és barátságáért.

Köszönöm a bemutatott kutatási témákban valamennyi hazai és külföldi kollégának és társszerzőnek a hatékony együttműködést.

Köszönöm a Szeretlen és Analitikai Kémiai Tanszék volt és jelenlegi tanszékvezetőinek – Sóvágó Imre és Fábán István professzoroknak –, hogy egy nehéz időszakban a tanszékre befogadtak, a kutató munka feltételeit számomra biztosították, és mindenben támogattak.

Köszönöm a Szerves Kémiai Tanszék volt és jelenlegi tanszékvezetőinek, hogy pályám kezdete óta – több mint 30 éven keresztül – a tanszék tiszteletbeli tagjának tekintenek, és szakmai előmenetelben támogattak illetve támogatnak.

Köszönettel tartozom a Kémiai Intézet és a Kémia Doktori Iskola vezetőinek és tagjainak a sokoldalú támogatásért és a szakmai együttműködésekért.

Köszönöm az NMR munkabizottság vezetőinek – Tóth Gábor professzornak és ifj. Szántay Csabának – valamint a bizottság minden tagjának, a mindig hasznos és motiváló szakmai programokat, bizottsági üléseket.

Köszönöm a barátoknak, biciklis- és úszótársaknak a sok együtt átélt élményt és kalandot.

Hálásan köszönöm családomnak, hogy szeretetükkel, támogatásukkal és megértésükkel, mindig erőt és biztonságot adtak kutatómunkámhoz. Örök hálával és soha el nem múló szeretettel emlékezem drága Édesapámra és drága Fiamra. A jelen dolgozatot az Ő emléküknél szeretném ajánlani.

Hivatkozások

1. Szilágyi, L.; Kövér, K.; Batta, G.; Bányai, I.; Tóth, I. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2011**, 117, 133-141.
2. Kövér, K.E.; Uhrin, D.; Hruby, V.J. *J. Magn. Reson.* **1998**, 130, 162-168.
3. Kövér, K.E.; Hruby, V.J.; Uhrin, D. *J. Magn. Reson.* **1997**, 129, 125-129.
4. Uhrin, D.; Batta, G.; Hruby, V.J.; Barlow, P.N.; Kövér, K.E. *J. Magn. Reson.* **1998**, 130, 155-161.
5. Williamson, R.T.; Marquez, B.L.; Gerwick, W.H.; Kövér, K.E. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, 38, 265-273.
6. Kövér, K.E.; Batta, G.; Fehér, K. *J. Magn. Reson.* **2006**, 181, 89-97.
7. Boros, S.; Kövér, K.E. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, 49, 106-110.
8. Kövér, K.E.; Kumar, A.A.; Rusakov, Y.Y.; Krivdin, L.B.; Illyés, T.-Z.; Szilágyi, L. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, 49, 190-194.
9. Rusakov, Y.Y.; Krivdin, L.B.; Kumar, A.A.; Szilágyi, L.; Kövér, K.E. *Magn. Reson. Chem.* **2012**, 50, 488-495.
10. Timári, I.; Illyés, T.Z.; Adams, R.W.; Nilsson, M.; Szilágyi, L.; Morris, G.A.; Kövér, K.E. *Chem-Eur J* **2015**, 21, 3472-3479.
11. Kövér, K.E.; Fehér, K. *J. Magn. Reson.* **2004**, 168, 307-313.
12. Fehér, K.; Berger, S.; Kövér, K.E. *J. Magn. Reson.* **2003**, 163, 340-346.
13. Timári, I.; Kaltschnee, L.; Kolmer, A.; Adams, R.W.; Nilsson, M.; Thiele, C.M.; Morris, G.A.; Kövér, K.E. *J. Magn. Reson.* **2014**, 239, 130-138.
14. Kaltschnee, L.; Kolmer, A.; Timári, I.; Schmidts, V.; Adams, R.W.; Nilsson, M.; Kövér, K.E.; Morris, G.A.; Thiele, C.M. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 15702-15705.
15. Kövér, K.E.; Batta, G. *J. Magn. Reson.* **2001**, 150, 137-146.
16. Kövér, K.E.; Bruix, M.; Santoro, J.; Batta, G.; Laurents, D.V.; Rico, M. *J. Mol. Biol.* **2008**, 379, 953-965.
17. El-Joubary, A.; Bruix, M.; Santoro, J.; Cafaro, V.; Scognamiglio, R.; Di Donato, A.; D'Alessio, G.; Kövér, K.E.; Batta, G.; Szilágyi, L.; Rico, M. *J. Biomol. NMR* **1999**, 15, 265-266.
18. Groves, P.; Kövér, K.E.; Andre, S.; Bandorowicz-Pikula, J.; Batta, G.; Bruix, M.; Buchet, R.; Canales, A.; Canada, F.J.; Gabius, H.J.; Laurents, D.V.; Naranjo, J.R.; Palczewska, M.; Pikula, S.; Rial, E.; Strzelecka-Kiliszek, A.; Jimenez-Barbero, J. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, 45, 745-748.
19. Péntzes, K.; Kövér, K.E.; Fazakas, F.; Haramura, G.; Muszbek, L. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2009**, 7, 627-633.
20. Murthy, B.N.; Sinha, S.; Surolia, A.; Jayaraman, N.; Szilágyi, L.; Szabó, I.; Kövér, K.E. *Carbohydr. Res.* **2009**, 344, 1758-1763.
21. Kiss, A.; Bécsi, B.; Kolozsvári, B.; Komáromi, I.; Kövér, K.E.; Erdődi, F. *FEBS J.* **2013**, 280, 612-626.
22. Fehér, K.; Groves, P.; Batta, G.; Jimenez-Barbero, J.; Muhle-Goll, C.; Kövér, K.E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 17148-17153.
23. Kövér, K.E.; Groves, P.; Jimenez-Barbero, J.; Batta, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11579-11582.
24. Kövér, K.E.; Weber, E.; Martinek, T.A.; Monostori, E.; Batta, G. *ChemBioChem* **2010**, 11, 2182-2187.