

Mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia a fehérjekutatásban

Dr. Tőke Orsolya
MTA Kémiai Kutatóközpont
Szerkezeti Kémiai Intézet
2007

A fehérjék szerkezetének és működésének megértése alapvető fontosságú a biológia és az orvostudomány számára. Az NMR spektroszkópia (Függelék A) azon ritka kísérleti módszerek egyike, mely a molekuláris kölcsönhatásoknak mind a szerkezeti, mind a dinamikai aspektusát képes megvilágítani. A módszer további előnye, hogy az így nyert atomi szintű információ makroszkopikusan mérhető termodinamikai és kinetikai paraméterekkel hozható összefüggésbe. Az alábbiakban áttekintjük az NMR spektroszkópia azon alkalmazási lehetőségeit, melyek napjainkban segítségünkre vannak a biomolekulák vizsgálatában. Összefoglalónk során elsősorban az oldatfázisú vizsgálatokra összpontosítunk (I-IV.), de röviden bepillantást nyújtunk az Olvasó számára azokba a szilárd fázisú NMR technikákba is (V.), melyek lehetővé teszik a rosszul oldódó, nehezen kristályosítható molekuláris rendszerek (pl. membránpeptidek) vizsgálatát.

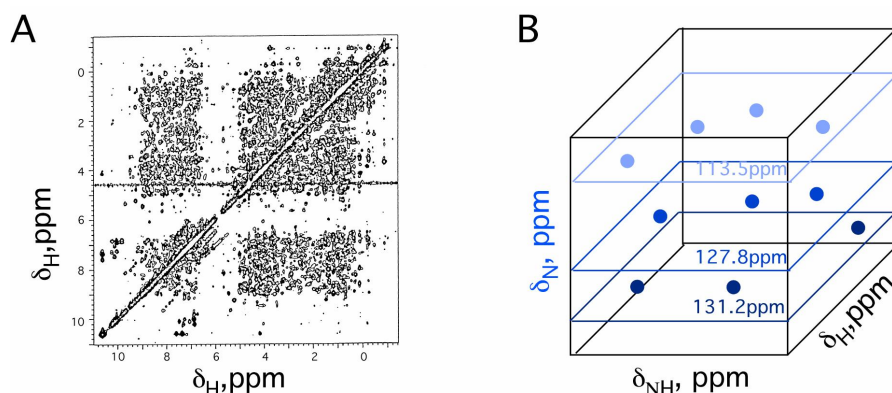
I. Szerkezetmeghatározás

Fehérjék oldatfázisú NMR szerkezetvizsgálata során a cél az aminosavszekvencia ismeretében a molekula három dimenziós térbeli szerkezetének a felderítése. Kismolekulák NMR vizsgálatához hasonlóan a szerkezetmeghatározás lépései három fő fázisra tagolódnak: a) jelhozzárendelés, b) ^1H - ^1H távolságkényszerek felállítása és c) szerkezetszámolás. Mivel fehérjék esetében igen nagy számú rezonanciajellel állunk szemben, elengedhetetlen a nagyterű, nagyfelbontású szupravezető mágnesek (≥ 500 MHz) használata, valamint a molekulamérettől függően izotópjelzés (Függelék B) alkalmazása. Az erre vonatkozó irányelveket az 1. táblázat mutatja.

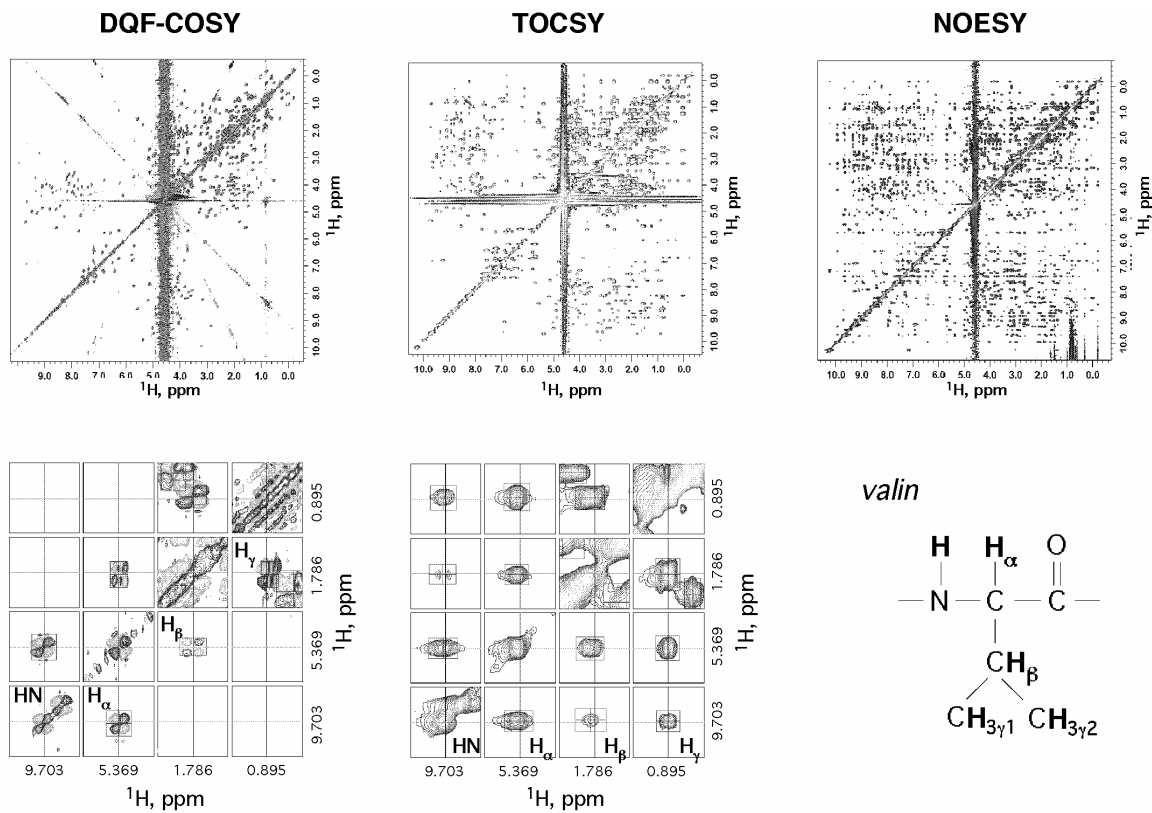
| Molekulatömeg | Stratégia |
|---------------|---|
| < 8 kDa | izotópjelzés nem szükséges (2D ^1H - ^1H homokorrelációs mérések) |
| 8-12 kDa | teljes ^{15}N -izotópjelzés (3D ^{15}N -editált ^1H - ^1H korrelációs mérések) |
| 12-25 kDa | teljes ^{13}C , ^{15}N izotópjelzés (3D, 4D hármaszonancia mérések) |
| > 25 kDa | teljes ^2H , ^{13}C , ^{15}N izotópjelzés (3D, 4D négyeszonancia mérések) |

1. táblázat Izotópjelzés teljes szerkezetmeghatározás céljából történő NMR vizsgálatokhoz

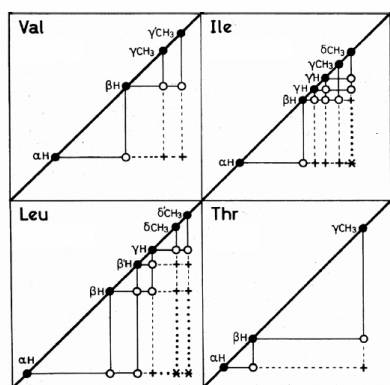
Míg a ^{13}C és ^{15}N izotópjelzés három vagy négy dimenziós spektrumokban szűrőként működve növeli a felbontást (1. ábra), a ^2H izotóp alkalmazása csökkenti azokat a nagy molekulatömegű fehérjékben előtérbe kerülő relaxációs folyamatokat, melyek jelszélesedéshez és ezáltal intenzitáscsökkenéshez vezetnek. Mivel a ^2H -jelzés a szerkezetmeghatározásban nem játszik közvetlen szerepet, a továbbiakban vele nem foglalkozunk.



1. ábra (A) Erős átfedés a rezonanciajelek között a lizozim fehérje (10 kDa) 2D homonukleáris NOESY spektrumában. (B) A ^{15}N -editált 3D NOESY-HSQC spektrum sematikus képe. A 2D spektrumban átfedő rezonanciajelek a ^{15}N kémiai eltolódásuknak megfelelően szétválnak.

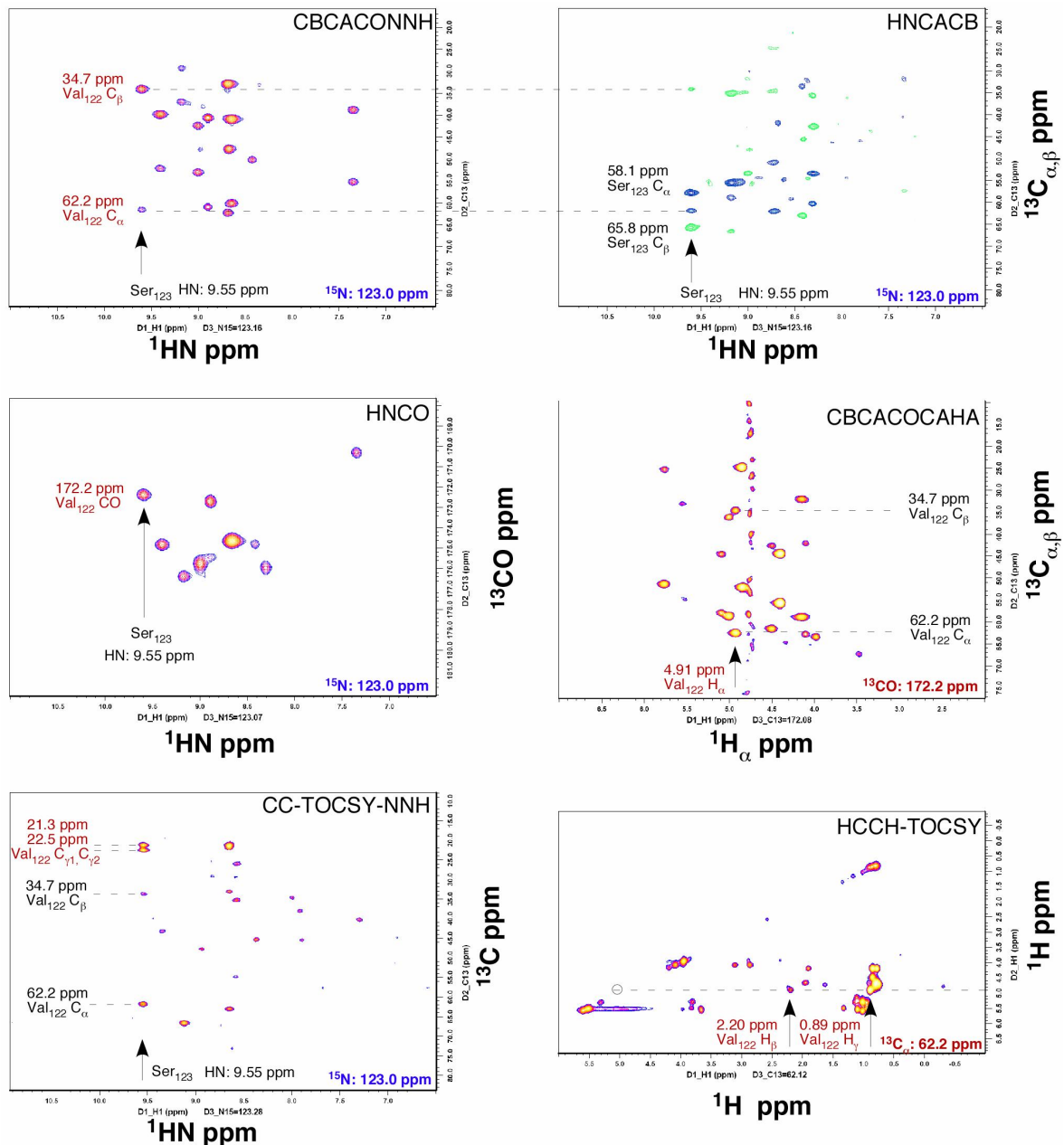


3. ábra Jelzetlen fehérjék asszignációja 2D homonukleáris korrelációs mérések kombinációjával. Az aminosavak típusát kémiai eltolódásuk és a keresztcsúcsok mintázata alapján COSY és TOCSY mérések segítségével azonosítjuk. Az alsó sorban az egyik valin aminosav asszignációja látható a rubredoxin fehérjében (5 kDa). A NOESY ^1H - ^1H távolságkényszerekből meghatározható az egyes aminosavegységeknek megfelelő rezonanciajelek i - $i+1$ konnektivitása a peptidláncban, valamint a teljes háromdimenziós szerkezet.

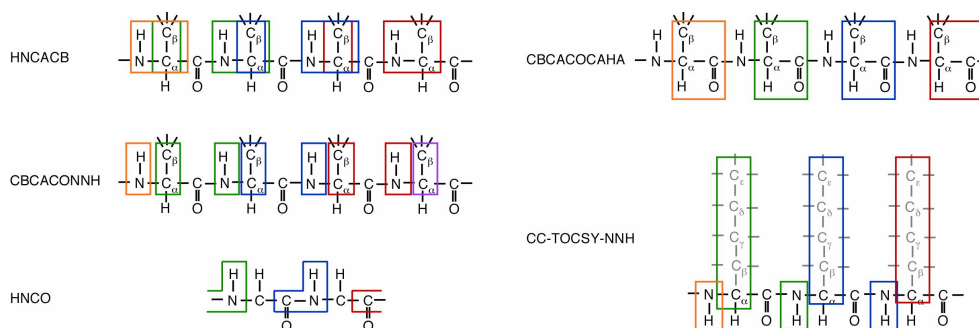


| aminosav | αH | βH | többi |
|-----------------|------------------|-----------------|---|
| valin (Val) | 4.18 | 2.13 | γCH_3 0.97, 0.94 |
| izoleucin (Ile) | 4.23 | 1.90 | γCH_2 1.48, 1.19 γCH_3 0.95 δCH_3 0.89 |
| leucin (Leu) | 4.38 | 1.65, 1.65 | γCH 1.64 δCH_3 0.94, 0.90 |
| treonin (Thr) | 4.35 | 4.22 | γCH_3 1.23 |

4. ábra Néhány aminosav COSY korrelációs mintázata és ^1H kémiai eltolódása.



5. ábra Asszignációs stratégia ¹³C, ¹⁵N-jelzett fehérjékben hármaszonancia mérések alkalmazásával.



6. ábra Néhány ¹H-¹³C-¹⁵N hármaszonancia mérés korrelációs szabályszerűségei. Az egyes mérések az azonos színnel bekeretezett atomok között teremnek korrelációt.

Távolságkényszerek. A rezonanciajelek asszignációjának birtokában a szerkezetmeghatározás következő lépése a ^1H - ^1H távolságkényszerek felállítása. A jelhozrendeléshez hasonlóan ez is többdimenziós, leggyakrabban ^{13}C - vagy ^{15}N -editált NOESY mérésekkel történik (1b. ábra). Ezen mérések során szénnel vagy nitrogénnel kémiai kötésben levő H-atomok korrelációját detektáljuk más, vele térközelségben ($<6 \text{ \AA}$) levő H-atomokkal. Egy jól definiált szerkezet eléréséhez aminosavanként átlagosan 15-20 kényszerfeltételre van szükség, ami egy 15-20 kDa-os fehérje esetén 3-4 ezer távolságkényszert jelent.

Szerkezetszámolás. A szerkezetmeghatározás végső fázisa a szerkezetszámolás. Ennek során az aminosavsorrend ismeretében és a ^1H - ^1H távolságkényszerek birtokában molekuladinamikai módszerek alkalmazásával szerkezeteket generálunk és finomítunk, s a két folyamat között addig iterálunk, míg további érdemi javulást már nem észlelünk. A távolságkényszerek mellett a szerkezetszámolást segíti a kémiai eltolódásból nyert másodlagos szerkezetre vonatkozó információ, valamint - amennyiben rendelkezésre áll - torziós szögek, orientációs kényszerek, ismert H- és diszulfid-kötések pozíciója a molekulában. A szerkezetszámolás eredménye egy a kényszerfeltételeknek eleget tevő tipikusan 10 vagy 20 legalacsonyabb energiájú szerkezetből álló sokaság (7. ábra), valamint az ún. átlagos szerkezet. A szerkezet határozottságát jellemző paraméter az RMSD (root mean square deviation = eltérések négyzetösszegének gyöke), a sokaságnak a fehérje adott típusú atomjaira (pl. C_α) vonatkozóan számított eltérése az átlagos szerkezettől.

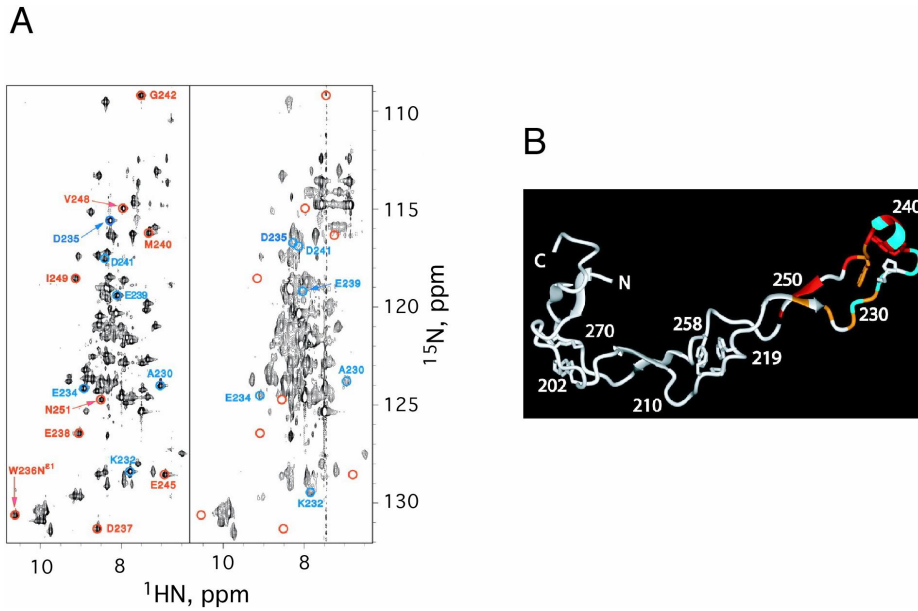


7. ábra Az intesztinális zsírsavkötő fehérje apo formájának 20 legalacsonyabb energiájú szerkezete az NMR szerkezetszámítás végén. A C_α atomokra számított RMSD érték 1.2 \AA . (Hodsdon & Cistola, *Biochemistry* 1997, 36, 1450-1460.)

Molekulakomplexek. Vizsgálódásaink során a fehérjéknek többnyire nem pusztán az önmagukban álló ún. apo (=külön, *görög*) formájára vagyunk kíváncsiak, hanem valamely ligandummal vagy makromolekulával (másik fehérje, DNS) képzett komplexének, az ún. holo (=teljes, *görög*) formának a szerkezetére. Konkrétan mire is keressük a választ ezekben a vizsgálatokban? Többek között arra, mely aminosavegységek vesznek részt a kölcsönhatásban, a kölcsönható partnerek között milyen másodlagos kötőerők működnek, mi a kölcsönhatás mechanizmusa és mozgatórugója.

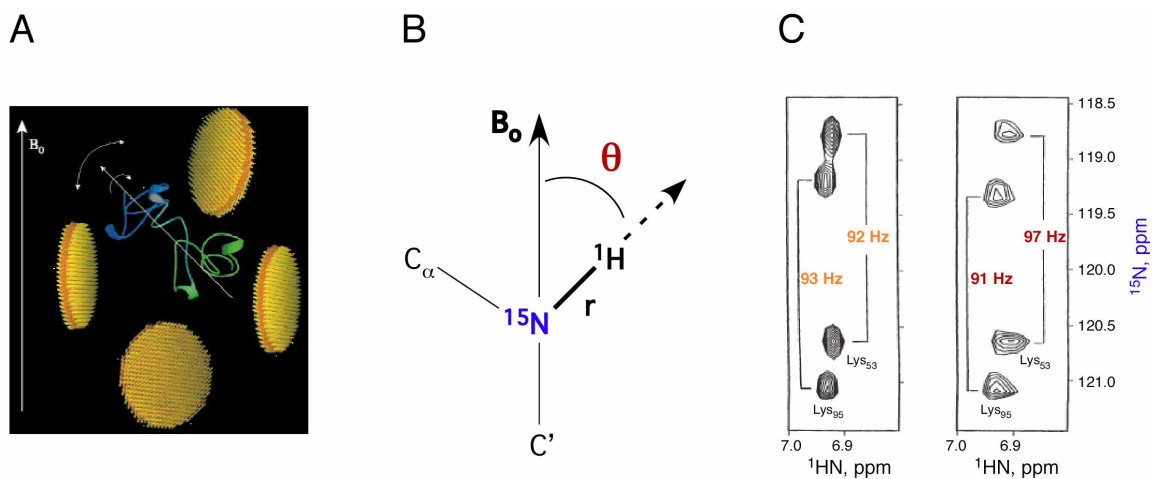
Az intermolekuláris határfelületek feltérképezésének legegyszerűbb módja a *kémiai eltolódás változásának monitorizálása*. Kiválóan alkalmasak erre azok a heterokorrelációs ún. ^{15}N -HSQC ("heteronuclear single quantum coherence") spektrumok, melyekben minden egyes keresztcsúcs egy-egy NH protonnak, azaz - a néhány NH protont tartalmazó oldalláncból (pl. Asn, Gln) eltekintve - egy-egy aminosavegységnek felel meg a fehérjében. Ezen mérések során tipikusan ^{15}N -jelzett fehérjét komplexálunk jelzetlen partnerével (8. ábra).

Amennyiben nagyobb felbontású, atomi szintű információra van szükségünk a molekulakomplexek szerkezetét illetően, úgy *intermolekuláris távolságkényszerek* felállítása szükséges. Az intra- és intermolekuláris NOE-k megkülönböztetése azonban gyakran komoly kihívást jelent. Ennek megoldásában segítenek az ún. izotópszűrt NOESY mérések, melyek során a két kölcsönható partner közül csak az egyiket izotópjelezzük, és speciális pulzusszekvenciák alkalmazásával minden egyes jelzett ^{15}NH vagy ^{13}CH hidrogénatom számára az *egyik* molekulában csak olyan H-atomokat "láttatunk", amelyek nem jelzett szén- vagy nitrogénatomhoz kötődnek. Mivel ennek a feltételnek csak a *jelzetlen partner* molekula hidrogénatomjai felelnek meg, az izotópszűrt kísérlet során kizárólagosan intermolekuláris ^1H - ^1H kontaktusból származó rezonanciajelet detektálunk.



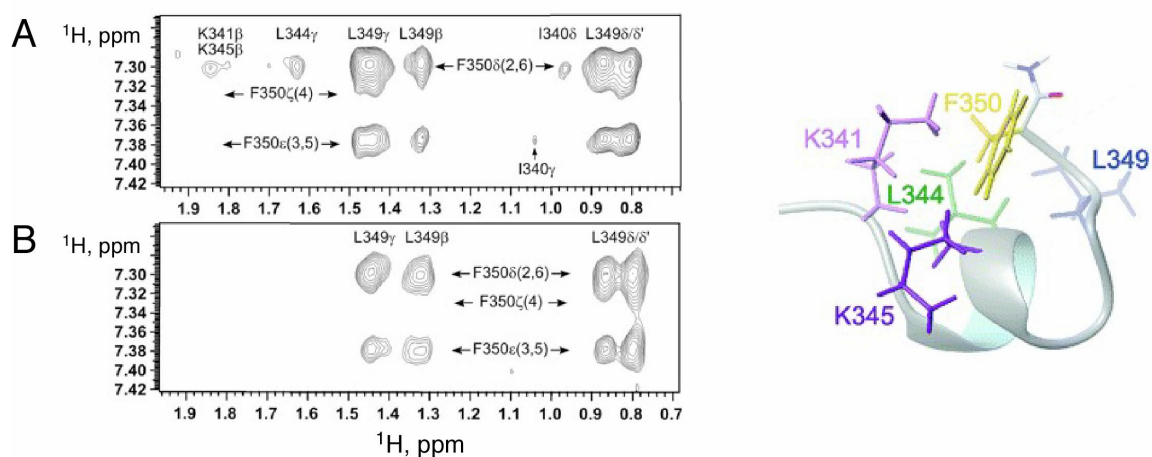
8. ábra (A) A calreticulin (CRT) nevű szénhidrátkötő fehérje ^{15}N -HSQC spektruma. Balra: apo forma, jobbra: az ERp57 nevű tiol-diszulfid oxidoreduktázzal képzett komplex. A színessel jelölt rezonanciajelek mutatják a legnagyobb kémiai eltolódásváltozást. (B) A kémiai eltolódásváltozások megjelenítése a CRT fehérje modelljén. (Frickel *et al.* PNAS, 2002, 99, 1954-1959.)

Több doménből álló nagyobb fehérjék, molekulakomplexek szerkezetvizsgálata során különlegesen hasznos a távolságkényszereket *orientációs feltételekkel* kiegészíteni. Amennyiben valamilyen módon a fehérjék izotróp rotációs diffúzióját sikerül lelassítani az oldatban (ez megoldható például bicellák vagy bakteriofágok alkalmazásával az oldatban), a magok közötti dipoláris csatolás nem átlagolódik ki tökéletesen. Az ún. maradék, idegen szóval *“reziduális” dipoláris csatolás*, előjelétől függően növeli vagy csökkenti az izotróp oldatban is jelenlevő J csatolást. Erre látunk példát a 9. ábrán egy szénhidrátkötő fehérje ^{15}N -HSQC spektrumában. A dipoláris csatolás szögfüggéséből ($\sim 3\cos^2\theta - 1$, ahol θ a dipoláris vektor, azaz jelen esetben a ^{15}N - ^1H kötésvektor és a külső mágneses tér (\mathbf{B}_0) által bezárt szög) meghatározható az egyes N-H kötésvektorok egymáshoz viszonyított iránya, ezáltal molekulaszegmensék, domének relatív orientációja.



9. ábra (A) Orientációs rendezettség indukálása bicellás oldatban. (B) A ^{15}N - ^1H dipoláris vektor a külső mágneses térben. (C) A BLBC nevű szénhidrátkötő fehérje ^1H -lecsatolás nélkül detektált ^{15}N -HSQC spektruma izotróp (balra) és 5% DMPC/DHPC 3:1 bicellás (jobbra) oldatban. (Prestegard, Nat. Str. Biol. NMR Suppl., July 1998, 517-522.)

Végül, de nem utolsósorban, a molekulakomplexek NMR vizsgálati lehetőségeinek sorában meg kell említenünk az ún. *transzfer NOE* technikát, mint a *kötött ligandum konformációjának* meghatározására irányuló vizsgálati módszert. Nagy molekulatömegű fehérjék esetén (MW>50 kDa), amennyiben a fehérje-ligandum kölcsönhatás gyenge (K_d : μM - mM) és a szabad és a kötött forma között gyors csere folyamatok működnek, a kötött ligandum ^1H - ^1H térközelségeiből eredő NOE effektus áttevődik a tipikusan nagy feleslegben jelen levő szabad ligandum rezonanciajeleire. A transzfer NOE kísérlet előnye, hogy nincs szükség sem a fehérje, sem a ligandum izotópjelzésére. A 10. ábrán egy, a látásban fontos szerepet játszó fehérje-peptid kölcsönhatásra látunk példát.

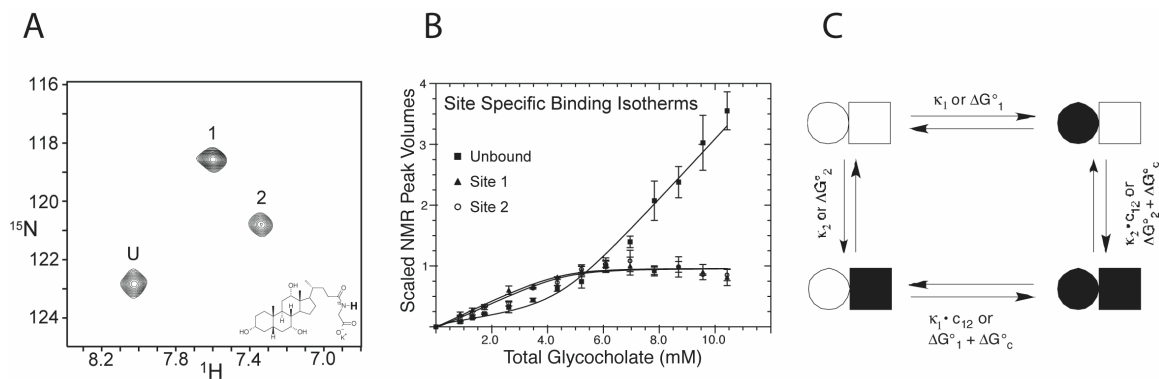


10. ábra A fényérzékelés G-fehérjéjének peptid epitópja rodopszinnal komplexálva. A fényaktivált (A) és a fénytől védett forma (B) transzfer NOESY spektruma. Extra keresztcsúcsok az A spektrumban a lizin oldallánc és a közelben levő aromás gyűrű között működő, ún. kation- π kölcsönhatás kulcsszerepére utalnak a fényaktivált komplexben. (Anderson *et al.*, JACS 2006, 128, 7531-7541.)

A fentiekben összefoglalt módszerek kombinációjával megfelelő külső mágneses térerő birtokában (800-900 MHz-es szupravezető mágnes), ^2H , ^{13}C , ^{15}N -izotópjelzés alkalmazásával, valamint a Nobel-díjas Kurt Wüthrich és kutatócsoportja által kifejlesztett, a relaxációs folyamatok további optimalizálását célzó mérési technikák segítségével (TROSY="transverse relaxation optimized spectroscopy") napjainkra lehetőség nyílt többszáz kDa-os tömegű fehérjék- és fehérjekomplexek NMR spektroszkópiái vizsgálatára.

II. Kötődésvizsgálatok, termodinamikai alkalmazások

Az előzőekben szó volt a fehérjekomplexek szerkezetvizsgálatáról. Míg a teljes szerkezetmeghatározás ezekben az esetekben hónapokat, gyakran éveket igénybe vevő folyamat, a kötődés pusztá tényének igazolása egyszerűbb feladat. Az NMR paraméterek közül a kémiai eltolódás megváltozása a legkézelfoghatóbb jele a komplexképződésnek. Monitorizálása a ligandum koncentrációjának függvényében lehetővé teszi kötődési izotermák felvételét, melyek elemzésével meghatározhatók a fehérje-ligandum komplexek egyensúlyi disszociációs állandói. Különös jelentősége van az NMR spektroszkópiának a több kötőzsebbel rendelkező fehérjék vizsgálatánál, hiszen a kémiai környezet és ezáltal a kémiai eltolódás különbözőségéből adódóan lehetőség nyílik kötőhely specifikus disszociációs állandók meghatározására. Ezek kombinálása más független vizsgálatokból (pl. fluoreszcenciás, kalorimetriás mérések) nyert makroszkópikus állandókkal további részletekkel szolgál a fehérje-ligandum kölcsönhatás termodinamikájára vonatkozóan, lehetővé téve például kooperatív rendszerekben a kooperativitás szabadenergia-járulékanak meghatározását. Erre látunk példát a 11. ábrán a humán epesavkötő fehérje vizsgálatának kapcsán.



11. ábra Glikokólsav kötődés vizsgálata a humán epinephrine fehérjében. (A) Specifikusan ^{15}N -jelzett glikokólsav-fehérje komplex ^{15}N -HSQC spektruma 3:1-es fehérje:ligandum molaránynál. Három rezonanciajelet látunk. A ligandumok egyik populációja az 1-es számmal jelölt kémiai környezetben (1-es kötőzseb), másik populációja a 2-es számmal jelölt kémiai környezetben (2-es kötőzseb) tartózkodik, harmadik populációja pedig szabadon van az oldatban (U). Ez utóbbi asszignációja fehérjét nem tartalmazó glikokólsav-oldat azonos körülmények között végzett NMR vizsgálatával történt. (B) A három rezonanciajel NMR csúcsintegrálja a teljes ligandumkoncentráció függvényében. A kötődési izotermák elemzésével meghatározhatók a kötőzseb specifikus kötődési állandók (κ_1 , κ_2). (C) Fehérje-ligandum kölcsönhatás termodinamikai ciklusa két kötőhellyel rendelkező fehérjében. $K_1 K_2 = \kappa_1 \kappa_2 c_{12}$, ahol K_1 és K_2 a makroszkópikus kötődési állandók ($K_1 = [\text{FL}]/[\text{F}][\text{L}]$, $K_2 = [\text{FL}_2]/[\text{FL}][\text{L}]$, ahol $[\text{F}]$ a szabad fehérje, $[\text{L}]$ a szabad ligandum, $[\text{FL}]$ és $[\text{FL}_2]$ pedig az egy illetve két kötött ligandummal rendelkező fehérjekomplex koncentrációja), κ_1 és κ_2 a kötőhely specifikus kötődési állandók, c_{12} pedig a kooperativitási faktor. A makroszkópikus és kötőhely specifikus állandók ismeretében c_{12} számítható. Pozitív kooperativitás esetén ligandum kötődése az egyik kötőzsebhez megkönnyíti a másik ligandum molekula számára a másik kötőzseb elfoglalását. (Tochtrop et al. PNAS 2002, 99, 1847-1852.)

A kémiai eltolódás mellett számos más fehérje-ligandum kölcsönhatásra érzékeny NMR paraméter van. Ilyen a molekulamérettől függő relaxációs idő és ezzel összefüggésben a vonalszélesség, valamint az intermolekuláris ^1H - ^1H térközelség (NOE) jelenléte. NMR spektroszkópiai módszerekkel szintén meghatározható a diffúziós állandó, melynek szignifikáns csökkenése valamely ligandum (kismolekula) esetében fehérje-ligandum kölcsönhatást indikál.

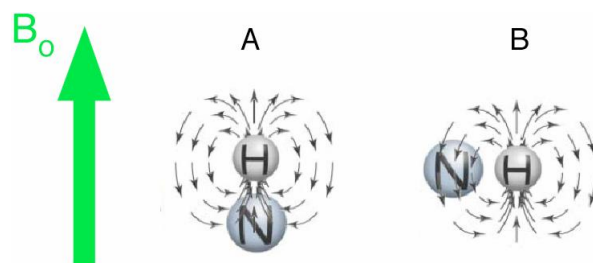
II. Dinamikai vizsgálatok

A fehérjékben jelen levő molekuláris mozgások időskáláját a 2. táblázatban foglaltuk össze. A kémiai reakciók lejátszódása szempontjából meghatározó rezgési folyamatok mellett a fehérjékben és kölcsönhatásaikban – ahol a gyengébb, másodlagos erők dominálnak -, kiemelkedő szerephez jutnak a lassabb folyamatok.

| Időskála | Mozgásforma | Amplitúdó |
|--------------------------|---|-------------|
| $10^{-15} - 10^{-12}$ s | vegyértékrezgés, deformációs rezgés, torziós mozgások | 0.001-0.1 Å |
| $10^{-12} - 10^{-9}$ s | szegmensmozgások (terminuszok, loop-ok), oldallánc rotációk | 0.1-10 Å |
| $10^{-9} - 10^{-6}$ s | peptidek felgombolyodása, hélix-coil átmenet | 1-100 Å |
| $10^{-6} - 10^{-3}$ s | globális konformációs változások, domén mozgások | 1-100 Å |
| $10^{-3} - 1$ s (1000 s) | fehérjék felgombolyodása (prolinizomerizáció) | 10-100 Å |

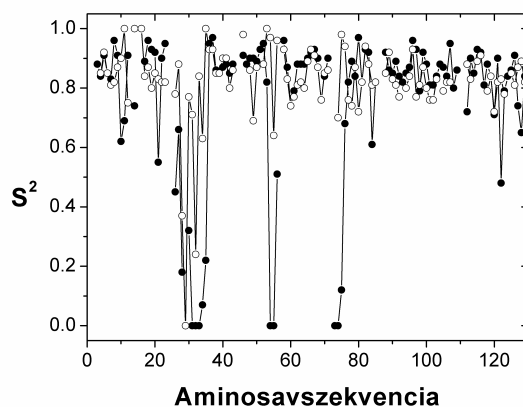
2. táblázat Molekuláris mozgások a fehérjékben

Ezek közül a ps-ns időskálán zajló folyamatok jól jellemezhetők az NMR relaxációs paraméterekkel, nevezetesen a spin-rács (T_1) és spin-spin (T_2) relaxációs idővel. Ennek megértése céljából tekintsünk egy ^{15}N - ^1H kötésvektort a külső mágneses térben (\mathbf{B}_0) (12. ábra). A ^{15}N spin által érzékelt mágneses tériert a kötésvektor irányától függően a szomszédos ^1H mag mágneses momentuma erősíti illetve gyengíti. A kötésvektor molekuláris mozgások révén történő reorientációja fluktuációt idéz elő a ^{15}N mag által érzékelhető lokális



12. ábra ^{15}N - ^1H kötésvektor a külső statikus mágneses térben. A ^{15}N spin által érzékelt mágneses térerőt a kötésvektor irányától függően a szomszédos ^1H mag mágneses momentuma (A) erősíti illetve (B) gyengíti.

mágneses térben, ami az NMR kísérlet során meggyorsítja a ^{15}N mag mágneszettségének csökkenését, relaxációját. A T_1 és T_2 relaxációs időkből számítható ún. általánosított rendezettségi paraméter (S^2) a peptidlánc flexibilitásának mérőszáma. A 13. ábrán az intesztinális zsírsavkötő fehérje amidnitrogénjeinek relaxációs ideje alapján számított rendezettségi paraméter látható az aminosavszekvencia függvényében. Az alacsony S^2 értékek a loop régiókban az adott szegmensek erőteljesebb mozgékonyágát tükrözik. Hasonló relaxációs és rendezettségi paraméterek határozhatók meg ^{13}C mérésekkel az oldalláncokra vonatkozóan.



13. ábra Az intesztinális zsírsavkötő fehérje általánosított rendezettségi paramétere az aminosavszekvencia függvényében (apo fehérje: teli karika, holo fehérje: üres karika) (Hodsdon & Cistola, *Biochemistry*, 1997, 36, 2278-2290.)

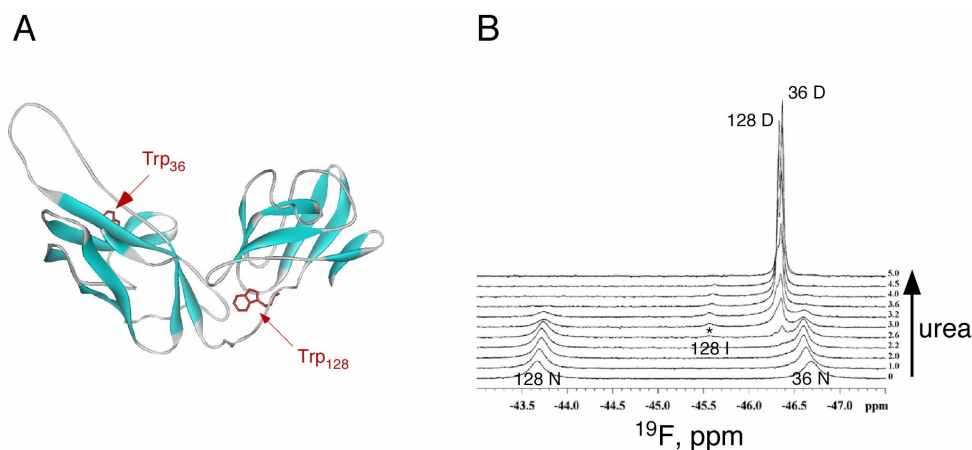
Míg a ps-ns időskálán zajló erőteljesebb mozgások általában a szerkezet határozatlanságát jelzik (pl. H-kötések hiánya), a μs -ms időskálán zajló konformációs változások gyakran konkrét összefüggésbe hozhatók a hatásmechanizmussal, így például valamely enzim molekula ún. átalakítási számával (“turnover”), azaz az egy másodperc alatt egy enzim molekula által átalakított szubsztrát molekulák számával.

A fehérjék másodperceket, percek, esetenként órákat, napokat is igénybe vevő feltekeredési folyamatainak NMR vizsgálatáról a következő fejezetben lesz szó.

IV. A felgombolyodás (folding) vizsgálata

A fehérjék kitekeredett peptidláncok formájában szintetizálódnak a riboszómán. Feltekeredésük, felgombolyodásuk mechanizmusa a szerkezeti biológia egyik központi kérdése. Ahogyan összefoglalónk során számos alkalommal utaltunk rá, a kémiai eltolódás az atommagok elektronikus árnyékolásának, ezáltal kémiai környezetének érzékeny mérőszáma. Míg kitekeredett (denaturált) fehérjékben egy adott funkciós csoportnak megfelelő (pl. NH) protonok árnyékolása egy átlagos (“random coil”) értékhez közelít, felgombolyodott (natív) fehérjékben a protonok változatos, egymástól igencsak eltérő kémiai környezetben helyezkedhetnek el. Ennek megfelelően ez utóbbi esetben a kémiai eltolódások eloszlása, diszperzitása szélesebb.

A kémiai eltolódás-változás monitorizálása a denaturálószer (pl. urea (=karbamid), guanidium · HCl) koncentrációjának függvényében lehetővé teszi a fehérje stabilitására vonatkozó termodinamikai paraméterek megállapítását, valamint bizonyítékkal szolgálhat a natív és a denaturált állapot közötti intermedierek jelenlétére vonatkozóan. A mágneses momentummal rendelkező magok sorában különösen érzékeny a kémiai környezetben történő változásokra a ^{19}F mag. Érzékenysége és kis méretének köszönhetően jól alkalmazható fehérjék NMR vizsgálatában. Erre látunk példát a 14. ábrán az uropatogén *E. coli* adhéziós szervecskéjének (pilus) felgombolyodását segítő chaperon, a PapD fehérje vizsgálata kapcsán. Ez tehát egy feltekeredést segítő fehérje feltekeredés-vizsgálata.

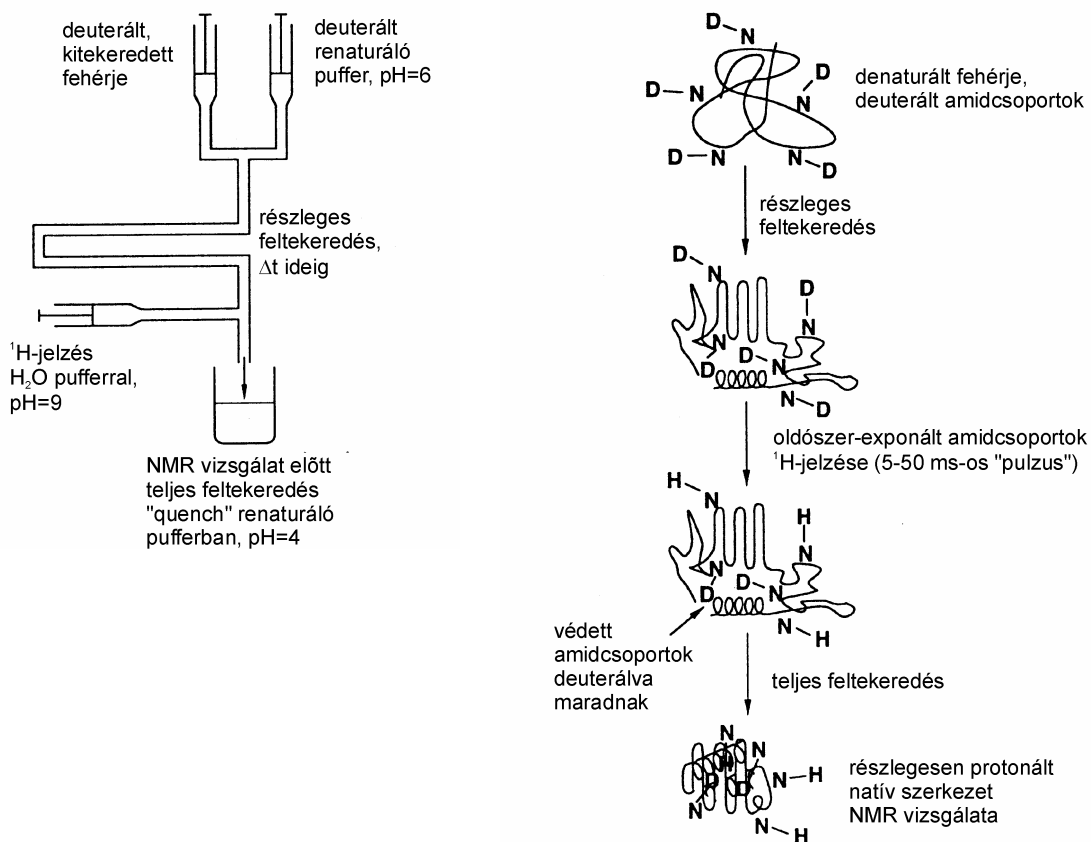


14. ábra (A) A folding vizsgálathoz alkalmazott ^{19}F -jelzett Trp aminosavak pozíciója a PapD fehérjében. (B) A ^{19}F -jelzett PapD fehérje 1D ^{19}F NMR spektruma az urea koncentráció függvényében. A natív (N), denaturált (D) és intermedier (I) állapotoknak megfelelő rezonanciajelek asszignációja pontmutánsok ($[^{19}\text{F}\text{-Trp}_{128}, \text{Trp}_{36}\text{Phe}]$ -PapD és $[^{19}\text{F}\text{-Trp}_{36}, \text{Trp}_{128}\text{Phe}]$ -PapD) segítségével történt. (Bann et al. PNAS 2002, 99, 709-714.)

Az egyensúlyi vizsgálatokat kiegészíthetjük kinetikai, ún. “*stopped-flow*” NMR mérésekkel. Ennek alapja, hogy a magas denaturálószer-koncentráció mellett (pl. 7 M urea) kitekeredett fehérjét $t=0$ időpillanatban hirtelen renaturáló pufferba hígítva, feltekeredés indul meg. A denaturált állapotnak megfelelő rezonanciajelek intenzitásának csökkenéséből, illetve a natív állapotnak megfelelő rezonanciajelek kiépüléséből az idő függvényében meghatározható a feltekeredési folyamat sebességi állandója. Aminosav-specifikus izotópjelzéssel a fehérje különböző pontjain következtetések vonhatók le a feltekeredési folyamat mechanizmusára vonatkozóan. Hasonló kinetikai mérésekkel Friedennek és munkatársainak sikerült megállapítania, hogy a PapD fehérjében az N- és C-terminális domén harmadlagos szerkezetének kialakulása előfeltétele a közöttük létrejövő, további stabilizációt eredményező interdomén kölcsönhatásnak, valamint fény derült arra is, hogy a sebességmeghatározó lépés a feltekeredési folyamatban egy *transz-cisz* prolin izomerizáció az N-terminális doménban.

Az előzőekben aminosav-specifikus ^{19}F -izotópjelzés alkalmazásával példát láttunk a fehérjék felgombolyodásának kinetikai és mechanizmus vizsgálatára. Amennyiben bővebb szerkezeti információra vagyunk kíváncsiak az intermedier állapotok konformációját illetően, úgy egy másik izotóphoz, a deutériumhoz (^2D) kell fordulnunk. A kitekeredett fehérjék amidprotonjai ugyanis gyors cserélődésben vannak az oldószerrel, ennek megfelelően nehézvízes pufferoldatban a deutériummal. Ezzel szemben a natív forma amidprotonjai nagyságrendekkel lassabban cserélődnek az oldószerrel. Ennek oka az amidprotonok védettsége a natív szerkezetben, mely egyrészt a szerkezet kompaktságából, másrészt a H-kötések nyújtotta stabilitásból ered. A denaturált és natív állapotok közötti intermedierek részleges védettséggel rendelkeznek, ami lehetővé teszi, hogy H/D cserélődési folyamatok vizsgálatával információt nyerjünk a konformációjukról. Egy tipikus ún. “quenched-flow” H/D mérés vázlatát a 15. ábrán szemléltetjük. A kísérlet alapja a cserélődési sebesség pH-függése. Míg erősen lúgos közegben a cserefolyamat sebességi állandója akár az 1000 s^{-1} -et is elérheti, savas közegben mindössze $0.001 \text{ s}^{-1} - 1 \text{ s}^{-1}$ között változik. A mérés kezdetén a fehérje denaturálószeres D_2O -oldatban kitekeredett állapotban van, és ennek megfelelően az NH protonok nagy része deuterálódik (pH=6). Ezt

követően az oldatot renaturáló – még mindig D₂O-os - pufferoldattal Δt időtartamig keverve a feltekeredés megindul. Ezt megszakítja egy rövid, 5-50 ms-os keveredés könnyűvízes pufferral magas pH-n (pH=9), mely a fehérje még rendezetlen szegmensein visszacsereéli a deutériumokat protonra, a már védett amidcsoportok viszont továbbra is deuteráltak maradnak. Az NMR mérés előtt pH=4-es renaturáló pufferban a feltekeredés teljessé válik. Az alacsony pH-nak köszönhetően a H/D csere folyamat ekkor már olyan lassú, hogy a deuteráció foka tovább nem változik, így az mintegy “befagyaszttva” megőrzi az intermedier konformációjának megfelelő állapotot. Az amidprotonok asszignációjának ismeretében meghatározhatók a H/D-cserélődéssel szemben védettséggel rendelkező aminosav egységek az intermedierben, melyből következtetések vonhatók le az intermedier konformációjára vonatkozóan. A Δt időtartam változtatásával lehetővé válik a feltekeredés során keletkező intermedier állapotok időbeli követése.



15. ábra Folding intermedierek konformációs vizsgálata H/D kicserélődéssel “quench-flow” technika alkalmazásával.

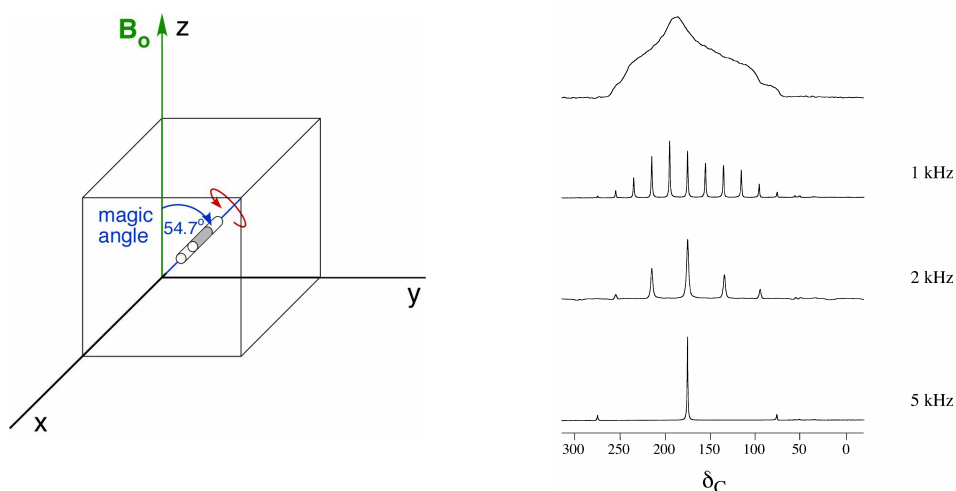
V. Biomolekulák vizsgálata szilárd fázisú NMR spektroszkópiával

A kémiai-, anyag- és biológiai vizsgálatok tárgyát gyakran képezik olyan makromolekuláris rendszerek (pl. szintetikus polimerek az iparban, membránfehérjék a biológiában), melyeknek tulajdonságait, működését – a molekulák belső szerkezetén kívül – nagymértékben befolyásolja az egymással és környezetükkel történő szerveződésük. A szilárd fázisú NMR spektroszkópia alkalmazásával lehetőség nyílik arra, hogy e makromolekuláris rendszereket a természetes előfordulásukat maximálisan megközelítő fizikai állapotban vizsgálhassuk. Ezen kívül praktikus okai is lehetnek a szilárd fázisú NMR választásának. Rosszul oldódó,

rosszul kristályosítható molekulák és heterogén rendszerek esetén jelenleg ez az egyetlen fizikai módszer, mellyel nagy pontosságú (Å) molekulaszervezeti információ nyerhető.

Az oldatfázisban jelen levő gyors rotációs diffúziós mozgások hiányában a szilárd fázisú NMR spektrumot a gyakran több száz, több ezer Hz erősségű, irányfüggő (*anizotróp*) spin-spin kölcsönhatások dominálják. Ilyen például a kémiai eltolódás anizotrópiája, amely az eddig látott oldatfázisú példákban a gyors Brown mozgásnak köszönhetően keskeny jellel, az ún. *izotróp* kémiai eltolódássá átlagolódott. Nem így a szilárd fázisban (16. ábra felső spektrum). Egy másik, igen fontos irányfüggő kölcsönhatás a magok között fellépő, téren át ható dipoláris csatolás. Távolságfüggő tulajdonságának köszönhetően ($\sim 1/r^3$, ahol r a két egymással kölcsönhatásban lévő mag közötti távolság) ez a paraméter rendkívüli hasznossággal bír a szerkezetkutatás számára. Ahhoz azonban, hogy ezeket a kölcsönhatásokat a vizsgálódásainkhoz hasznosítani tudjuk, meg kell szabadulnunk a széles, átfedő rezonanciajelektől, hogy láthatóvá váljanak a miniatűr részletek, amelyek az igazi, számunkra fontos szerkezeti információt hordozzák.

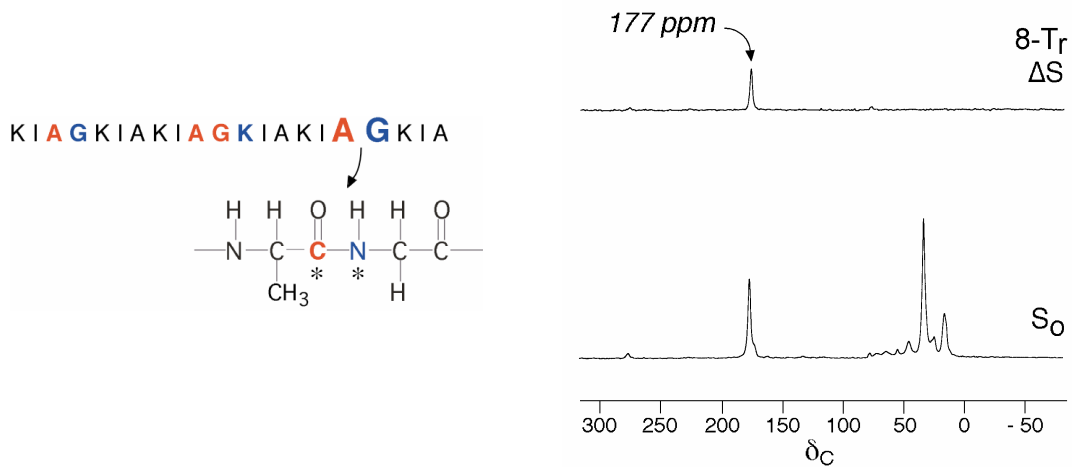
Az anizotróp kölcsönhatásoktól való megszabadulás egyik módja a minta mechanikus pörgetése egy a külső mágneses térrel 54.7° -ot (ún. mágikus szög) bezáró tengely körül (MAS=„magic angle spinning”) (16. ábra). Matematikai levezetéssel igazolható, hogy a MAS pörgetés az oldatfázisú rotációs diffúzióhoz hasonlóan kiátlagolja az irányfüggő spin-spin kölcsönhatásokat, és az oldatfázisú NMR spektrumhoz *hasonló*, keskeny rezonanciajeleket eredményez. Másik lehetőség az anizotróp kölcsönhatások kiküszöbölésére a spektrumból a minta mechanikus vagy mágneses úton történő orientációja a külső mágneses térben.



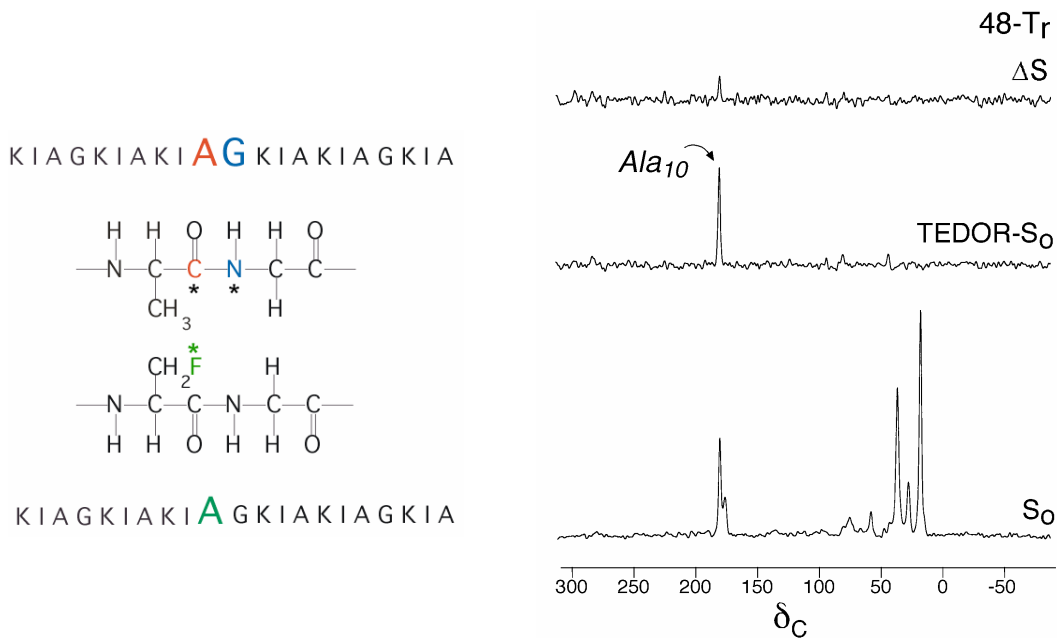
16. ábra Speciális mérőfej konstrukcióval az NMR mintatartó (ún. rotor) 54.7° -os szöget zár be a külső mágneses térrel. Szilárd fázisú NMR spektrum felbontásának javítása MAS pörgetéssel. $[1-^{13}\text{C}]$ -alanin porminta szilárd fázisú NMR spektruma MAS nélkül (felső spektrum) és különböző MAS pörgetési sebességek mellett. A pörgetés következtében forgási oldalsávok jelennek meg az izotróp kémiai eltolódás két oldalán. A pörgetési sebesség növelésével a rezonanciajelnek egyre nagyobb hányada koncentrálódik az izotróp kémiai eltolódásban.

Ezen technikák alkalmazása mellett is azonban a szilárd fázisú NMR spektrum felbontása jelentősen alulmarad az oldatfázisban megszokottak. Ennek tudatában nem lepődünk meg azon, hogy bár újabban a szilárd fázisú NMR spektroszkópia területén is vannak törekvések az oldatfázisban megszokott teljes szerkezetmeghatározásra, a hangsúly szilárd fázisban a specifikus szerkezeti információ van. Ennek megfelelően a mintakészítés stratégiája is más: teljes izotópjelzés helyett specifikus izotópjelzés szükséges. Erre látunk két példát az alábbiakban egy membránokban pórust képző peptid vizsgálata kapcsán.

Az első példában a lipid kettősrétegbe ágyazott peptid másodlagos szerkezetére voltak kíváncsiak a kutatók. ^{13}C és ^{15}N izotópok jól megválasztott helyre történő beépítésével az aminosavszekvenciába (17. ábra), a ^{13}C - ^{15}N dipoláris csatolást kihasználva az ún. REDOR („rotational-echo double resonance”) technika alkalmazásával azonosították az Ala₁₇-es aminosavegység karbonilcsoportjának kémiai eltolódását a spektrumban. Mivel α -hélix és β -redő esetén az alanin ^{13}CO rezonanciajele majdnem 8 ppm különbséget mutat szilárd fázisban, a mérésből egyértelműen kiderült: a vizsgált peptid 17-es pozíciójú alaninja α -hélix konformációban van a membránban. (A mérést a peptidlánc mentén két másik pozícióban is elvégezték, és hasonló eredményre jutottak.)



17. ábra Balra: Specifikus ^{13}C - és ^{15}N -izotópjelzés a KIAGKIAKIAGKIAKIAGKIA (K3) peptid másodlagos szerkezetének meghatározására lipid kettősrétegben. Jobbra: Lipid kettősrétegbe ágyazott K3 peptid teljes echo (S_0) és $^{13}\text{C}\{^{15}\text{N}\}$ REDOR differencia spektruma (ΔS) 1.6 ms (8 rotor ciklus) dipoláris evolúciós idő elteltével. MAS pörgetés: 5000 Hz. (Toke et al. *Biophys. J.* 2004, 87, 662-674.)



18. ábra Balra: Specifikus ^{13}C -, ^{15}N - és ^{19}F izotópjelzés a KIAGKIAKIAGKIAKIAGKIA (K3) peptid aggregációs tulajdonságainak vizsgálata céljából. Jobbra: Lipid kettősrétegbe ágyazott K3 peptid teljes echo (S_0), 4-rotor ciklusos $^{13}\text{C} \rightarrow ^{15}\text{N}$ TEDOR-echo, és $^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$ REDOR differencia spektruma 9.6 ms (48 rotor ciklus) dipoláris evolúciós idő után. MAS pörgetés: 5000 Hz. (Toke et al. *Biophys. J.* 2004, 87, 675-687.)

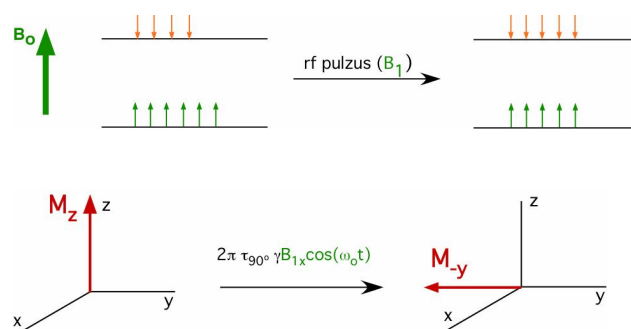
A 18. ábrán ugyanennek a peptidnek egy további vizsgálatát mutatjuk be. A másodlagos szerkezet meghatározását követően a kérdés az volt, aggregálódnak-e egymással a peptidláncok a membránban, és ha igen, milyen mértékben és milyen módon. Ennek a kérdésnek a megközelítésére a peptidláncok felét az előzőekhez hasonlóan specifikus ^{13}C és ^{15}N izotópjelzéssel látták el a lánc közepén, a peptidláncok másik felébe pedig a szekvencia ugyanazon pontján egy ^{19}F izotópot építettek be. A mérés két lépésben történt. Első lépésben az erős ^{13}C - ^{15}N dipoláris csatolás segítségével az Ala₁₀ ^{13}CO jelet "kiválasztották" a spektrumból" (TEDOR- S_0), majd a következő lépésben meghatározták a ^{13}C - ^{19}F intermolekuláris dipoláris csatolást. A kísérletek specifikus kölcsönhatásra utaltak a peptidláncok között a membránban, majd a továbbiakban sikerült azt is kideríteni, hogy monomer és dimer peptidok foszfolipid molekulákkal asszociálódva alkotják a membrán pórust.

A fenti két példa pusztán illusztrációja a szilárd fázisú NMR spektroszkópia lehetséges alkalmazásainak. Membránpeptideken és -fehérjéken kívül más rosszul oldódó, rosszul kristályosítható molekuláris rendszerek (receptor-ligandum komplexek, aggregációra hajlamos fibrilláris peptidláncok) vizsgálatánál szintén ez az egyetlen olyan szerkezetvizsgálati módszer, mellyel napjainkban atomi szintű molekuláris szerkezeti információ nyerhető.

FÜGGELÉK

A. A mágneses magrezonancia spektroszkópia alapjai

A mágneses magrezonancia (NMR) kísérlet alapja az a megfigyelés, mely szerint a mágneses momentummal, más néven spinnel rendelkező atommagok (pl. ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{19}F , ^{113}Cd , ^{119}Sn) energiaszintjei erős külső mágneses térben (\mathbf{B}_0) felhasadnak, és egy újabb, a külső statikus mágneses tér irányára merőleges, szinuszosan váltakozó mágneses tér alkalmazásával (\mathbf{B}_1) ezen felhasadt energiaszintek között átmeneteket idézhetünk elő. (1. ábra) A felhasadt energiaszintek távolsága, s ennek megfelelően a detektált rezonanciajel frekvenciája (ún. kémiai eltolódás) a szóban forgó atommagot érő mágneses árnyékolás, azaz a kémiai környezet függvénye.

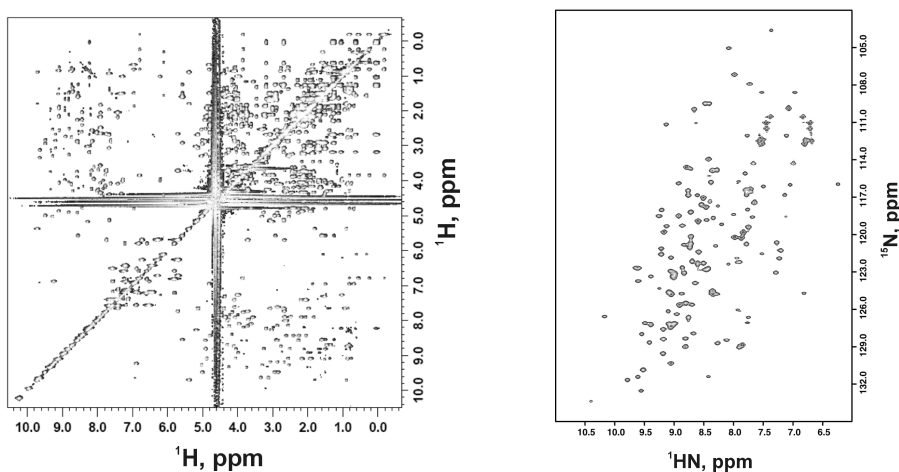


1. ábra Spin-1/2 magok felhasadt (ún. Zeeman) energiaszintjei a külső statikus mágneses térben (\mathbf{B}_0). Energiakvantum elnyelése a rádiófrekvenciás térből (\mathbf{B}_1) átmeneteket idéz elő az energiaszintek között, melynek hatására a minta makroszkópikus mágnesezettsége megváltozik.

Az egymással kémiai kötésben levő magok között az elektronok közvetítésével megvalósuló ún. skaláris (J)-csatolás eredményeképpen a rezonanciajel a legtöbb esetben nem szingulett, hanem finomszerkezettel rendelkezik. A multipliett vonalainak távolságából meghatározhatjuk a csatolási állandókat. A kémiai eltolódás és a csatolási állandók ismeretében a vizsgált molekulában funkció csoportokat, spinrendszereket azonosíthatunk. Ezt a folyamatot hívjuk *jelhozzárendelésnek*, idegen szóval *asszignációnak*. A J-csatolás másik fontos tulajdonsága, hogy információval szolgál az illető funkció csoportok geometriájáról (torziós szögek), valamint hogy segítségével mágnesezettséget vihetünk át egyik spinről a másikra.

Az NMR kísérlet során rádiófrekvenciás (rf) pulzusokkal gerjesztett magok relaxációs folyamatok révén „igyekeznek” visszatérni az alapállapotba. A relaxációs mechanizmusok egyike egy a téren át ható spin-spin kölcsönhatáson, az ún. dipoláris csatoláson alapszik. Ez utóbbi távolságfüggésének köszönhetően mag-mag *távolságkényszerek* állíthatók fel a molekula egyes szegmensei között. Sőt, mivel a J-csatolással ellentétben a dipoláris kölcsönhatás nem kötések mentén, hanem téren át hat, intermolekuláris távolságkényszerek is megállapíthatók. Az effektus felfedezőjéről ezeket a 6 Å-nél rövidebb ^1H - ^1H térközelségeket NOE (nukleáris Overhauser effektus) kontaktusoknak nevezte el az irodalom.

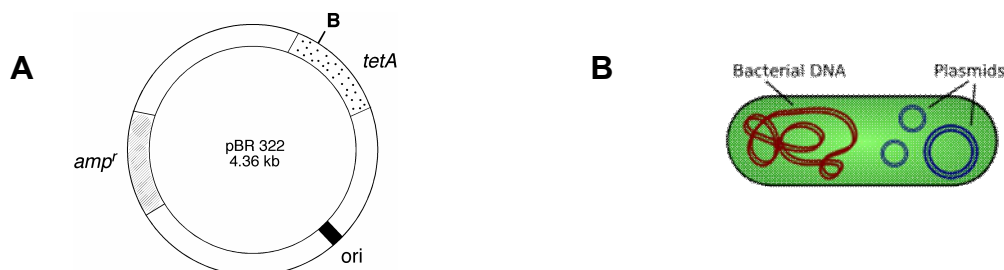
Míg kismolekulák NMR spektroszkópia vizsgálata során gyakran egydimenziós spektrumokból is elegendő információhoz jutunk, nagyobb molekulák vizsgálata esetén a felbontás növelése érdekében két- vagy többdimenziós mérésekhez kell folyamodnunk. Ezek lehetnek homo- (^1H - ^1H) vagy heterokorrelációs (pl. ^1H - ^{15}N) mérések (2. ábra).



2. ábra Jelzetlen rubredoxin fehérje TOCSY („total correlation spectroscopy”) és ^{13}C , ^{15}N -jelzett humán epesavkötő fehérje ^{15}N -HSQC („heteronuclear single quantum coherence”) spektruma.

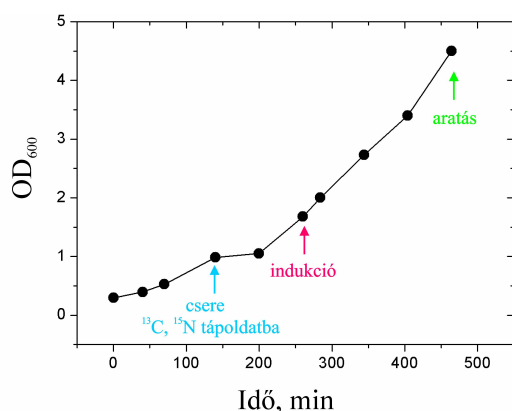
B. ^{13}C , ^{15}N -izotópjelzett fehérjék bioszintetikus úton történő előállítása NMR spektroszkópai vizsgálatok céljából

Az NMR spektroszkópai vizsgálatokhoz szükséges izotópjelzett fehérjék rekombinációs úton állíthatók elő. Ennek során a vizsgálni kívánt fehérje aminosavszekvenciáját kódoló komplementer DNS-t bakteriális (leggyakrabban *E. coli*) vagy más organizmusnak (pl. élesztőgomba) megfelelő ún. plazmidvektorba építik be (1a ábra). A plazmidok a kromoszómán kívüli gyűrű alakú DNS molekulák, amelyek könnyen a sejtekbe juttathatók (1b ábra). Számuk egy *E. coli* sejtben a többszázat is elérheti, így a későbbi kifejtés (expresszió) során fokozottan érvényesül az önszaporító hatás.



1. ábra (A) Fehérjék bioszintetikus úton történő előállítására kifejlesztett expressziós vektor (ori: a replikáció megindítását kódoló DNS szakasz; *tetA* és *amp^r*: antibiotikummal szembeni rezisztenciát kódoló gének; B: egy ún. restriktív endonukleáz felismerési pontja a DNS szekvenciában, melynek segítségével a plazmidvektor az adott helyen felhasítható, majd az expresszálni kívánt gén beépítését követően ismét összezárható. (B) Baktériumsejt sematikus képe.

Az oldatfázisú NMR vizsgálatok többségéhez szükséges teljes, idegen szóval „uniform” $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ izotópjelzés ^{15}N -jelzett szerves ammóniumsó (pl. $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) illetve ^{13}C -jelzett glükóz, mint kizárólagos nitrogén- illetve szénforrás alkalmazásával valósítható meg a táptalajban. Különböző stratégiák léteznek arra vonatkozóan, hogy a termelékenység maximalizálása (mg célfehérje/L táptalaj) és az izotópvesztés minimalizálása érdekében (hiszen a ^{15}N és a ^{13}C izotóp nem pusztán a vizsgálni kívánt fehérjébe épül be, hanem az organizmus valamennyi fehérjéjébe) az izotópjelzett tápanyagot mikor, milyen körülmények között (sejtkoncentráció, hőmérséklet) juttatják a tenyésztetbe. Legtöbb esetben elegendő, ha az izotópjelzett tápanyagot csak közvetlenül a fehérjexpresszió indukálása előtt adják az oldathoz (2. ábra).



2. ábra ^{13}C , ^{15}N -jelzett humán epesavkötő fehérje expresszálása MG1655 *E. coli* sejtekben minimál táptalajon. A baktérium-kultúra 600 nm-nél mért optikai diszperzitása az idő függvényében (növekedési görbe).

Maga az indukció egy az alkalmazott plazmidvektorra specifikus anyagnak a tápoldatba adagolásával történik, mely a plazmid megfelelő DNS-szakaszát felismerve, megindítja a fehérjeszintézist. Az indukció időtartama organizmusonként változik. Míg bakteriális expresszió esetében a kívánt sejtsűrűség elérése általában néhány órát vesz igénybe, élesztőgombában történő expresszió esetén a folyamat több hétig is eltarthat. A megfelelő sejtkoncentrációt elérve a tápoldatot centrifugálják, majd a kiülepedett sejtmasszából szuszpenziót képezve a sejteket ozmotikus sokknak vetik alá. A sejtekből kiszabaduló makromolekulák sokaságából a célfehérjét kromatográfiás módszerek kombinációjával tisztítják.

Vannak olyan NMR vizsgálatok is, melyekhez nem teljes izotópjelzésre van szükség, hanem csak bizonyos aminosavak izotópjelzésére a fehérjemolekulában. Ebben az esetben az egyes aminosavakat, közöttük a jelezni kívánt aminosavat is külön-külön kell a tápoldatba adagolni. Az izotópjelzés hígulásának elkerülése érdekében ezen fehérjék előállításához speciális, ún. *auxotróf* baktériumtörzsekre van szükség. Ezek sajátossága, hogy önállóan nem képesek a jelezni kívánt aminosavat előállítani. A mai modern molekuláris biológiai módszerekkel néhány aminosavtípus esetében az is megoldható, hogy a peptidláncban egy bizonyos aminosavegységet lássunk el jelzéssel (pl. Trp₆₇, Phe₁₁₅).

Irodalomjegyzék

- [1] Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York, 1986.
- [2] Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G., Skelton, N. J. *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*; Academic Press: New York 2006
- [3] Gardner, K. H., Kay, L. E. *The Use of ^2H , ^{13}C , ^{15}N Multidimensional NMR to Study the Structure and Dynamics of Proteins*; Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1998, 27:357-406.
- [4] Hodsdon, M. E., Cistola, D. P. *Ligand Binding Alters the Backbone Mobility of Intestinal Fatty Acid-Binding Protein as Monitored by ^{15}N Relaxation and ^1H Exchange*; Biochemistry 1997, 36, 2278-2290.
- [5] Frickel, E.-M., Riek, R., Jelesarov, I., Helenius, A., Wüthrich, K., Ellgaard, L. *TROSY-NMR Reveals Interaction between ERp57 and the Tip of the Calreticulin P-Domain*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99:1954-1959.
- [6] Prestegard, J. H. *New Techniques in Structural NMR – Anisotropic Interactions*; Nat. Struct. Biol. NMR Suppl., July 1998, 517-522.
- [7] Anderson, M. A., Ogbay, B., Arimoto, R., Sha, W., Kisselev, O. G., Cistola, D. P., Marshall, G. R. *Relative Strength of Cation- π vs Salt-Bridge Interactions: The $G_{\alpha}(340-350)$ Peptide/Rhodopsin System*; J. Am. Chem. Soc. 2006, 128:7531-7541.
- [8] Tochtrop, G. P.; Richter, K., Tang, C., Toner, J. J., Covey, D. F., Cistola, D. P. *Energetics by NMR: Site-Specific Binding in a Positively Cooperative System*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99:1847-1852.
- [9] Bann, J. G., Pinkner, J., Hultgren, S. J., Frieden, C. *Real-Time and Equilibrium ^{19}F -NMR Studies Reveal the Role of Domain-Domain Interactions in the Folding of the Chaperone PapD*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99:709-714.
- [10] Schmidt-Rohr, K., Spiess, H. W. *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*; Academic Press: New York, 1997
- [11] Thompson, L. K. *Solid-State NMR Studies of the Structure and Mechanisms of Proteins*; Curr. Opin. Struct. Biol. 2002, 12:661-669.
- [12] Toke, O.; Maloy, W. L.; Kim, S.-J.; Blazyk, J.; Schaefer, J. *Secondary Structure and Lipid Contact of a Peptide Antibiotic in Phospholipid Bilayers by NMR*; Biophys. J. 2004, 87:662-674.
- [13] Toke, O.; O'Connor, R. D.; Weldeghiorghis, T. K.; Maloy, W. L.; Glaser, R. W.; Ulrich, A. S.; Schaefer, J. *Structure of (KIAGKIA)₃ Aggregates in Phospholipid Bilayers by Solid-State NMR*; Biophys J 2004, 87:675-687.
- [14] Turner, P. *Instant Notes in Molecular Biology*; BIOS Scientific Publ. 3rd ed. 2005

Szakkifejezések jegyzéke

anizotrópia: irányfüggés, preferencia a tér kitüntetett irányában

átlagos szerkezet: a szerkezetszámolás során nyert adott számú legalacsonyabb energiájú konformer X, Y, Z koordinátáinak átlagolásával előállító konformáció

bicella: „binary bilayered mixed micelles”, rövid és hosszú alkálláncsal rendelkező foszfolipid molekulák megfelelő arányú összekeverésével előállítható korong alakú, lipid kettősréteggel bíró speciális micella

COSY: „correlation spectroscopy”, kétdimenziós ^1H - ^1H korrelációs spektroszkópia, melynek segítségével azonosíthatjuk az egymással skaláris (J) csatolásban levő protonpárokat

CBCACOHA: a peptidgerinc asszignációját célzó háromdimenziós mérések egyike, amely az i-dik aminosavvegyesség alfa protonja, karbonil szénatomja, valamint alfa és béta szénatomja között teremt korrelációt

CBCACONNH: a peptidgerinc asszignációját célzó hármaszonancia mérések egyike, amely az i-dik aminosavvegyesség amidprotonja, amidnitrogénje és őt a szekvenciában eggyel megelőző, i-1-dik aminosavvegyesség alfa és béta szénatomja között teremt korrelációt

dipoláris csatolás: mágnesesen aktív magok között téren át ható kölcsönhatás, mely függ a kölcsönható magok minőségétől, távolságától ($1/r^3$), valamint az őket összekötő egyenes és a külső mágneses tér által bezárt szögtől

HNCACB: a peptidgerinc asszignációját célzó hármaszonancia mérések egyike, amely az i-dik aminosavvegyesség amidprotonja, amidnitrogénje, valamint a saját és őt a szekvenciában eggyel megelőző, i-1-dik aminosavvegyesség alfa és béta szénatomja között teremt korrelációt

HNCO: a peptidgerinc asszignációját célzó hármaszonancia mérések egyike, amely az i-dik aminosavvegyesség amidprotonja, amidnitrogénje és őt a szekvenciában eggyel megelőző, i-1-dik aminosavvegyesség karbonil szénatomja között teremt korrelációt

HSQC: „heteronuclear single quantum coherence”, kétdimenziós heterokorrelációs mérés, melynek során valamely heteroatommal (pl. ^{13}C , ^{15}N) közvetlen kémiai kötésben levő protonokat detektáljuk

J-csatolás (skaláris csatolás): mágnesesen aktív magok között az elektronok közvetítésével megvalósuló, azaz kémiai kötések mentén ható spin-spin kölcsönhatás, amely függ a kölcsönható magok minőségétől, helyzetétől (torziós szög), valamint a közöttük lévő kötések számától és jellegétől

kémiai eltolódás: a magot körülvevő elektronok mágneses árnyékoló hatásából eredő (ezáltal a kémiai környezetre jellemző) energiahozzájárulás, ami meghatározza a rezonanciajel - valamely referenciaanyaghoz viszonyított - pozícióját az NMR spektrumban

MAS: „magic angle spinning”, az anizotróp (irányfüggő) spin kölcsönhatások kiátlagolását célzó, és ezáltal az oldatfázisú NMR-hez hasonló, nagy felbontású spektrumok felvételét lehetővé tevő szilárd fázisú NMR technika, melynek alkalmazása során a mintát a külső állandó mágneses térrel (B_0) 54.7° -os szöveget bezáró tengely mentén forgatjuk

NOE (nukleáris Overhauser effektus): valamely molekula adott magját gerjesztve a hozzá térben közel levő magok kvantumállapota megváltozik, melynek hatására változik a jelintenzitás; mivel az effektus a kölcsönható magok távolságának függvénye ($\sim 1/r^6$), az intenzitásváltozásokból atom-atom (többnyire ^1H - ^1H) távolságkényszerek nyerhetők

NOESY: „nuclear Overhauser-effect spectroscopy”, az NOE-effektuson alapuló kétdimenziós NMR spektroszkópia mérés, amely az egymáshoz térben közel eső protonok között ($< 6 \text{ \AA}$) teremt korrelációt

REDOR: „rotational-echo double resonance”, izolált spinek közötti heteronukleáris dipoláris csatolás nagy felbontású, MAS körülmények közötti meghatározását lehetővé tevő szilárd fázisú NMR spektroszkópia mérés; segítségével heteroatomok közötti intra-/intermolekuláris távolságkényszerek állíthatók fel (pl. $r_{^{13}\text{C}-^{15}\text{N}}$ valamely specifikusan ^{13}C , ^{15}N izotópjelzett rendszerben)

S^2 (általánosított rendezettségi paraméter): valamely molekulaszegmens mozgásának térbeli korlátozottságát jellemző paraméter, $0 \leq S^2 \leq 1$, ahol $S=0$ az izotróp, $S=1$ a maximálisan korlátozott mozgás

szerkezetszámolás: az NMR spektroszkópiai mérésekből nyert távolság-, orientációs és egyéb kényszerfeltételeknek (pl. diéderes szögek, diszulfidhíd) eleget tevő konformáció meghatározása molekuladinamikai módszerek segítségével

T_1 (longitudinális vagy spin-rács) relaxáció: a z irányú mágneszettség visszatérése az egyensúlyi (Boltzmann-eloszlásnak megfelelő) helyzetbe

T₂ (transzverz vagy spin-spin) relaxáció: a mágnesezettségnek a spinek egymás közötti energiacsereje, kémiai cserefolyamatok, és egyéb hatások következtében történő csökkenése az x-y síkban; a rezonanciajel félértékszélességét meghatározó paraméter (gyors relaxáció = rövid T₂ = nagy Δν)

távolságkényszer: a magok közötti távolságfüggő kölcsönhatások (pl. dipoláris csatolás) kiaknázásán alapuló mérési módszerekkel nyert kényszerfeltétel

TEDOR: „transferred-echo double resonance”, izolált spinek közötti heteronukleáris dipoláris csatolást kihasználó spektrumszűrési technika a szilárd fázisú NMR spektroszkópiában

TOCSY: „total correlation spectroscopy”, kétdimenziós teljes ¹H-¹H korrelációs spektroszkópia, melynek segítségével spinrendszereket azonosíthatunk illetve különíthetünk el

TROSY: „transverse relaxation optimized spectroscopy”, a magok közötti spin-spin (T₂) relaxáció optimalizálását célzó és ezáltal a rezonanciajelek félértékszélességét csökkentő speciális mérési technika