

Populärvetenskaplig sammanfattning

Att proteiner har med livet att göra är allmänt känt, men exakt på vilket sätt engagerar en stor del av världens naturvetenskapliga forskare. Doktorsavhandling studerar två aspekter av förhållandet ”liv–proteiner”, nämligen hur proteiner kommunicerar – så kallad molekylär igenkänning – och hur proteindynamik kan te sig. Dynamik, till exempel hur en viss aminosyra i protein rör sig, eller hur proteinet förflyttas i sin helhet genom vätskan, sammanlänkas ofta med funktion. Vidare är dynamik en förutsättning för kommunikation för det går rimligtvis inte att kommunicera utan att något rör sig, typiskt läppar eller händer vid mänsklig kommunikation.

Två proteiner – del av ett bakterieprotein och ett sockerbindande protein

Två proteiner har studerats, galektin-3, ett sockerbindande protein, samt en domän av protein G, som är ett bakterieprotein som binder antikroppar. Forskning har bedrivits vid Lunds Universitet under decennier på dessa proteiner, sedan 70-talet för protein G. Avhandlingen är därmed bara en pusselbit i kartläggningen. Karaktären på forskningen får anses vara så pass allmän – grundforskningskaraktär – att man kan hävda att slutsatserna är giltiga för i stort sett alla proteiner. Studierna på galektin-3 är emellertid även inriktade mot medicinsk tillämpning då läkemedelsföretag involverats.

NMR-spektroskopi kräver flytande helium

Proteindynamiken har huvudsakligen studerats med NMR-spektroskopi. NMR står för *nuclear magnetic resonance*, kärnmagnetisk resonans och för att förstå NMR-mätningar av proteindynamik måste vi kortfattat beskriva metoden.

NMR-experimentet inleds med att provet placeras i ett enormt starkt magnetfält på 10–20 tesla, att jämföra med jordens magnetfält som är en miljon gånger svagare (30–60 mikrottesla). För att uppnå så starka magnetfält krävs supraledning, som i sin tur kräver extremt låg temperatur ner mot absoluta nollpunkten (0 K, eller $-273,15$ °C). Därför omsluts magneten av flytande helium med en temperatur kring 4 K. Helium är en sinande resurs och det är av vikt att materialforskning uppfinner material som är supraledande vid högre temperaturer.

När proteinprovet placeras i magneten skapas energinivåskillnader (s k *Zeeman-effekt*) mellan spinnenergier i atomkärnan. Spinn är en kvantmekanisk egenskap och liknelsen små roterande *magnetiska dipoler*, eller leksakssnurra brukar användas, men lika ofta påpekas att det inte finns något som verkligen korresponderar mot spinn i vår ”klassiska värld”. Max Plancks *kvanthypotes* säger i alla fall att spinnenerginivåskillnaden ska vara proportionell mot frekvensen, och eftersom det är små skillnader (trots enorma

magnetfält) bestrålas NMR-provet med lågfrekvent elektromagnetisk strålning, mer precist radiovågor i intervallet 50–1000 MHz.

Halvtaligt spinn

Väte som är den vanligaste atomen i biologisk materia, har en kärna som är särskilt relevant för NMR eftersom 99,9% av allt väte har så kallat halvtaligt kärnspinn. Typen av spinn, halv, hel, $3/2$ osv bestäms av sammansättningen av protoner och neutroner. Av vikt i teorin kring halvtaligt spinn är att det ger upphov till två energinivåer.

Andra viktiga biomolekylatomer är kol (C), kväve (N) och syre (O) men bara C och N har isotoper med halvtaligt kärnspinn. ^{13}C - och ^{15}N -isotoperna har emellertid bara ca 1% naturlig förekomst. Genom att mata bakterier som producerar galektin och protein G domänen med näringsämnen inmärkta med 100% ^{13}C och 100% ^{15}N erhålles nästan 100% NMR-aktiva kol- och kvävekärnor i proteinerna. Metoden för framställning av isotopinmärkta proteiner uppstod på 90-talet och har revolutionerat proteinforskningen.

Resonans effekt och kemiskt skift

Magnetfältet skapar således en polarisering, två energinivåer för atomkärnorna i proteinet, och nu kommer vi till en viktig del av experimentet för vid bestrålning med en radiovågfrekvens motsvarande *spinnenerginivåskillnaden* (kvanthypotesen) uppstår resonansfenomenet som gett NMR-metoden dess namn. Observera att radiovåg-amplituden inte behöver vara stor för att resonansfenomenet ska uppstå, det viktiga är frekvensen. Innebörden av resonans är just detta, en slags synkronisering av frekvenser, eller ”timing”. När radiosignalen stängs av fortsätter kärnspinnen sända samma frekvens, som klingar av under loppet av cirka en sekund. Mer korrekt beskrivet är att kärnspinnen sänder ut *aningens olika* frekvens, som sällan skiljer mer än 100 Hz. Skillnaden förklaras av att spinnfrekvensen beror på den kemiska strukturen, *elektrontätheten* kring atomen. Just att frekvensen som mäts är något skild från den frekvens som bestrålar provet är komplicerat och inte något vi går in på i en kort text, men den lilla skillnaden kallas *kemiskt skift* eftersom det har med ”kemin” att göra. Fysiker kom på namnet, möjligen då de inte förstod fenomenet. Tack vare kemiska skiftet har molekyler unika spektra. I synnerhet stora molekyler som proteiner har remarkabelt unika spektra.

Proteindynamik mäts med kärnspinnrelaxation

Signalens avklingning anses vara komplicerad att förstå än skapandet och kräver en något längre utläggning. *NMR-spinnrelaxation* är benämningen på avklingningsfenomenet som i en mening är begripligt eftersom det är en återgång till jämvikt. Relaxationen är den mätbara storhet som ger information om proteindynamik på atomnivå. Avklingning på cirka en sekund kan låta snabbt men i atomernas värld är det en ansenlig tidsrymd. Skälet att det går långsamt är att NMR-metoden inte medger *spontan* eller *stimulerad relaxation* från exciterat till grundtillstånd, vilket är regeln för t ex optisk spektroskopi. Einstein beskrev detta och förenklat beror avsaknad av den sortens relaxation inom NMR på radiovågornas låga frekvens. Nej, det som relaxerar kärnspinnen är egeninducerade radiofrekvenser, av samma storleksordning som skapade signalen. Dessa uppstår när kärnspinnen, som alltså kan ses som små magnetiska dipoler och följaktligen också har

ett magnetfält, kommer nära varandra. Dipol–dipol-magnetfälten interagerar stokastiskt, eller slumpmässigt. Även här kommer Einsteins teorier in eftersom han först förklarade *brownsk rörelse* vilken kan sägas beskriva *rotationsdiffusionen* som leder till dipol–dipol-fluktuationerna. Rotationsdiffusion kan liknas vid en plastboll som guppar i en bassäng, små slumpmässiga ”störningar” får bollen, sett över längre tid, att rotera flera varv, i alla riktningar.

Alltså, det bör nu gå att föreställa sig att proteinstorlek har betydelse för *fördelningen av frekvenser* som rotationsdiffusionen, via dipol–dipol-fluktuationen, ger upphov till och då är vi nära metodens essens eftersom det uppenbarligen finns samband mellan kärnspinnrelaxation och proteiners dynamik. Ett annat ord för frekvensfördelning är *spektraltäthet* och relaxationskonstanter kan matematiskt skrivas som en serie av spektraltätheter. Återigen har ”timing” betydelse, för det råkar vara så att givet ett magnetfält (och dessa varierar mellan magneter) så är det bara en viss protein-storlek som skapar maximal relaxation. Detta illustreras i avhandlingen men är ett välkänt faktum.

Resultat

En mer ingående beskrivning, i frånvaro av matematik, om kärnspinnrelaxation bör nog inte göras i en förenklad sammanfattning. Jo en sak bör tilläggas, metoden är enormt kraftfull, och avhandlingen kan faktiskt visa på unika resultat. Till exempel har vi bestämt, på atomnivå, hur olika delar av galektin, särskilt de nära bindningsfickan, rör sig vid små ändringar av sockerarten. Detta åstadkoms genom att låta galektin binda till tre snarlika sockerarter och studera dynamikskillnader som då uppstår. Kärnspinnrelaxationen har även möjliggjort bestämning av hastighetskonstanter för vätejoner som hoppar av och på aminosyror i protein G-domänen. Det är en ny upptäckt och av visst värde för teoretisk modellering av proteindynamik. I framtiden kommer antagligen datorsimuleringar dominera proteindynamik-fältet, men experiment behövs likväl. För inte vill väl folk ta läkemedel som *enbart* simulerats fram?

Dynamik länkas till entropi och termodynamik

Vi har här beskrivit NMR-metoden och dess tillämpning på proteinforskning, men grunden för all fysikalisk kemi är termodynamik, om vilken Albert Einstein sagt ungefär (en tredje och sista Einstein-referens): ”Den klassiska termodynamiken är den enda fysikaliska teorin vilken jag är övertygad om att inte kommer kullkastas”. Proteiners dynamik kan relateras till frihetsgrader och detta begrepp är sammanlänkat med det kanske viktigaste begreppet inom termodynamiken – *entropin* (enhet: energi/temperatur). Fler frihetsgrader i ett system ökar entropin och den *totala* entropin strävar *alltid* efter ett maximum vid varje kemisk reaktion, följaktligen i alla livsprocesser. Som en motpol till entropin finns *energin*, det som upprätthåller ordningen genom att binda atomer samman och skapa strukturer. Dualismen entropi–energi är fundamental inom *termodynamiken*.

Sammanfattningsvis, avhandlingens *specifika* bidrag är en ökad förståelse om proteiners dynamik, kommunikation och funktion, men det finns även ett *allmänt* bidrag, av många bedömare nog betraktat som försvinnande litet men likväl inte noll, nämligen ett bidrag som skapar aningen mer *ordning* och förståelse av begreppen energi och entropi.