

REZONANTNE MAGNETSKE METODE U BIOFIZICI

Slaven Garaj¹

Institut za fiziku kompleksne materije
Swiss Federal Institute of Technology Lausanne (EPFL), Švicarska

U biologiji trenutno vlada zlatna groznica u otkrivanju mnogobrojnih proteina i nalaženju njihovih funkcija u organizmu. Međutim, cijeli poduhvat se nalazi na vrlo tankom ledu. Čista taksionomija velikih molekula podsjeća na klasifikaciju flore i faune u 18. i 19. stoljeću, prije prihvatanja Darwinove teorije evolucije. Međutim, tek je teorija evolucije omogućila razumijevanje raznolikosti živih organizama i revoluciju u znanstvenoj misli.

Premda se strukture i funkcije raznih proteina vremenom otkrivaju, poznavanje mehanizma koji im omogućava biološku djelatnost još nedostaje. U naturalističkom pristupu biologije postavlja se pitanje «Što se događa?» umjesto da se postave pitanja «Kako se nešto događa?» ili još važnije «Zašto se događa?». Iako postoje opsežni projekti sakupljanja podataka, još uvijek smo vrlo daleko od razumijevanja što ti podaci u stvarnosti znače. Najbolji primjer za to je projekt ljudskog genoma. Sakupljena je ogromna količina podataka, nizova DNK baza, ali cijelo to znanje je beskorisno ako ne naučimo čitati genom. Knjiga puna slova je beskorisna ako ne znamo što predstavljaju određene riječi.

Fizika može pružiti novi pristup u razumjevanju bioloških problema, budući da pokušava donijeti općenite zaključke primjenom kvantitativnih i matematičkih metoda, umjesto da počiva na proučavanju pojedinačnih, različitih fenomena. Druga, ne manje važna, uloga fizike u biološkim znanostima je primjena i razvijanje fizikalnih eksperimentalnih metoda i procedura. Mnoštvo tehnika koje su se desetljećima razvijale u okviru fizike primijenjene su s velikim uspjehom u biologiji. Ovom aspektu biofizike posvećujemo najviše pažnje u daljnjem izlaganju. Naglasak stavljamo na metode magnetske rezonancije. Za otkriće rezonantnih magnetskih metoda Felix Bloch i Edward Purcell nagrađeni su Nobelovom nagradom iz fizike 1959. godine. Koliko su te metode postale važne u biologiji, svjedoči i činjenica da je 2002. godine prof. Kurt Wüthrich dobio Nobelovu nagradu iz kemije za primjenu magnetskih rezonantnih metoda u biologiji.

Počinjemo sa općenitim osvrtom na magnetske rezonantne metode, a nakon toga ćemo razmotriti nekoliko interesantnih primjera u biološkim znanostima. Uloga magnetske rezonancije u biologiji time nikako nije iscrpljena, a puna referenca daleko nadilazi opseg ovog izlaganja.

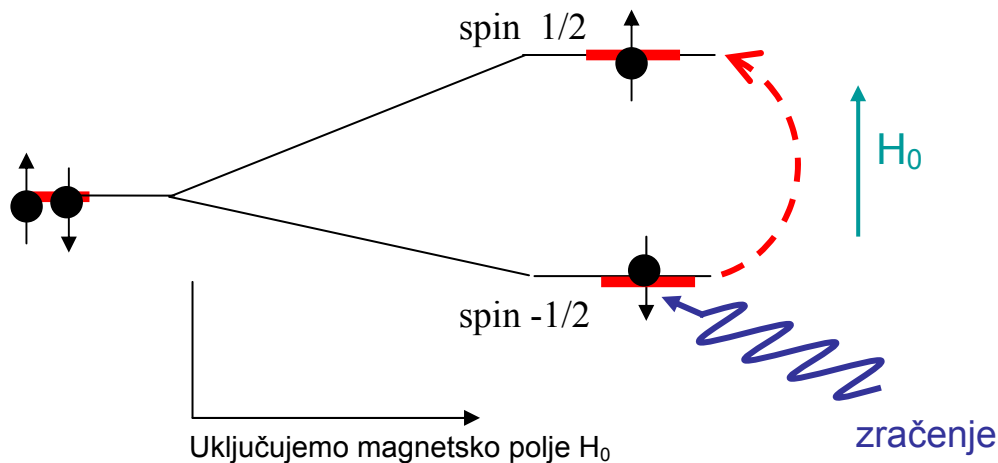
Osnove magnetske rezonancije

Magnetska rezonancija proučava ponašanja elektrona ili atomskih jezgara u magnetskom polju, uz istovremenu primjenu elektromagnetskog zračenja specifične (rezonantne) frekvencije. Osnove rada magnetskih rezonantnih metoda objasniti ćemo na primjeru elektrona, premda ista generalna rasprava vrijedi i za jezgre. Iako konceptualno vrlo slični, u eksperimentalnoj izvedbi mjerenje rezonancije elektrona i jezgre prilično se razlikuju, te stoga govorimo o dvije odvojene metode: Elektronska spinska rezonancija (ESR, ili elektronska paramagnetska rezonancija - EPR) za elektrone, te Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) za jezgre.

Što točno znači magnetska ili spinska rezonancija? Probajmo shvatiti riječ po riječ. Prvo, promotrimo što znači pojam rezonancije. Većina prirodnih sistema ima određenu prirodnu frekvenciju titranja, koja je dana unutrašnjim svojstvima sistema. Ukoliko sistemu dovedemo vanjsku pobudu (tj. nametnemo vanjsku silu) koja oscilira istom frekvencijom kao što je i prirodna

¹ <http://nanotubes.epfl.ch/garaj/>

frekvencija sistema, tada amplituda oscilacija počinje rasti do velikih vrijednosti, ponekad i s katastrofalnim efektima. Jednostavan primjer: zamislimo patuljka koji je sjeo na ljuljačku i počeo se ljuljati – takav sistem imat će određenu frekvenciju gibanja. Utom dolazi Snjeguljica iz šume, s košaricom jagoda, i počne periodično gurati ljuljačku. Ako je frekvencija guranja različita od prirodne frekvencije patuljka i ljuljačke, tada će u pojedinim trenucima Snjeguljica gurati patuljaka u smjeru njihanja, ali već u drugom trenutku će gurati kontra smjera njihanja patuljka. Zbrojeno, amplituda ljuljanja patuljka se neće puno mjenjati jer će Snjeguljica ponekad ubrzavati, a ponekad usporavati patuljka. S druge strane, ako Snjeguljica počne gurati tempom jednakim prirodnoj frekvenciji ljuljačke, tada će u svakom trenutku smjer guranja biti jednak smjeru gibanja ljuljačke i patuljka, što će konstantno povećavati amplitudu gibanja. Amplituda gibanja će se povećavati do velikih razmjera, do trenutka dok patuljak ne krikne „upomoć”, ili dok ne počne kočiti nogama. Amplituda će se ustaliti kad energija koju ljuljačka dobije od Snjeguljice postane jednaka energiji koju patuljak izgubi zbog kočenja nogama. Vratimo se na jezik fizike: govorimo o rezonanciji kad je frekvencija vanjske pobude jednaka prirodnoj frekvenciji titranja fizikalnog sistema, što dovodi do kontinuiranog transfera energije u sistem.



Slika 1. Shema magnetske rezonancije: Prije uključivanja magnetskog polja, energije elektrona sa spinom gore i spinom dolje su iste. Nakon što je uspostavljeno magnetsko polje, dolazi do razdvajanja energetske nivoa između dva spinska stanja (Zeemanov efekt). Ukoliko uključimo elektromagnetsko zračenje rezonantne frekvencije, ono će biti apsorbirano tijekom procesa prelaska iz jednog Zeemanovog nivoa u drugi (mjenjanje smjera spina).

Krenimo na sljedeće pitanje. Što je to spin? Kao masa i električni naboj, i spin je fundamentalno svojstvo svih čestica, kako elektrona tako i atomskih jezgri. Radi se o kvantnom svojstvu čestice, koje nema ekvivalenta u svakodnevnom svijetu, te se ne može jednostavno vizualizirati. Spin se očituje time što daje magnetski dipolarni moment čestice. Magnetski moment se može usporediti s iglom kompasa – zemaljsko magnetsko polje usmjeravat će iglu kompasa u smjeru sjevera. Stoga, vanjsko magnetsko polje djeluje silom na magnetski moment i pokušava ga okrenuti u smjeru polja. Magnetski moment je proporcionalan spinu čestice:

$$\vec{\mu} = -g\beta\vec{S} \quad (1)$$

U ovoj formuli μ predstavlja magnetski moment, a S predstavlja spin. $\beta = 9.274 \cdot 10^{-24}$ J/T je takozvani Bohrov magneton, a g je giromagnetski faktor (ili g -faktor) i predstavlja koeficijent proporcionalnosti između spina i magnetskog momenta. Vrijednost za slobodni elektron iznosi $g = 2.002319$, ali se mijenja u materijalu zbog djelovanja unutrašnjih polja. Spin elektrona može poprimiti samo dvije vrijednosti: $1/2$ (spin okrenut u smjeru magnetskog polja) i $-1/2$ (spin okrenut suprotno od smjera magnetskog polja).

Kao što smo već napomenuli, magnetsko polje utječe na magnetski moment, stoga energija elektrona ovisi o magnetskom polju i o smjeru spina (a time i magnetskog momenta):

$$E = \pm g\beta H_0 \cdot 1/2 \quad (2)$$

gdje $1/2$ predstavlja iznos spina elektrona, predznak $+$ se odnosi na spin okrenut u smjeru magnetskog polja (gore), a predznak $-$ na spin okrenut prema suprotno od smjera magnetskog polja (dolje).

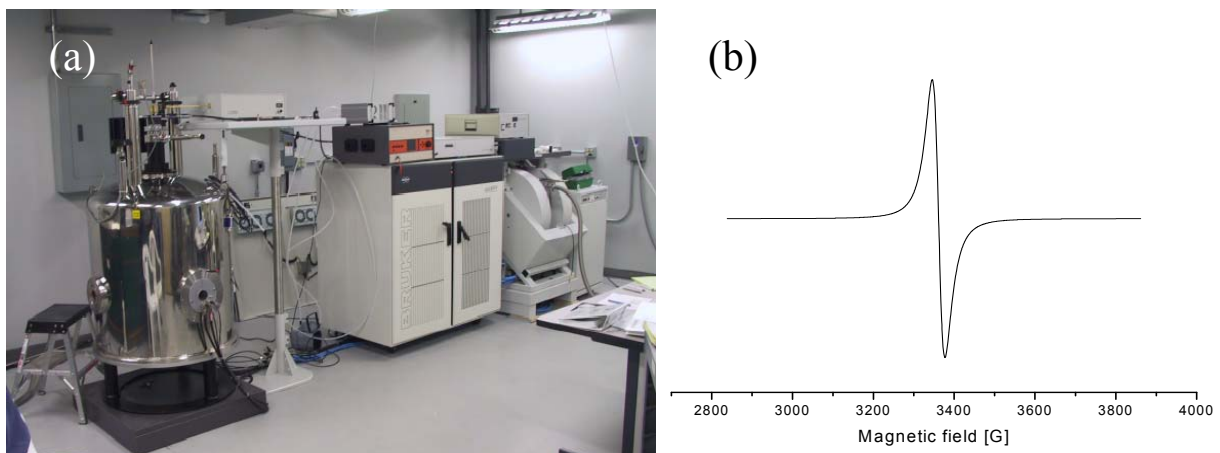
Promotrimo sad sliku 1. Kada je magnetsko polje isključeno, svi elektroni bez obzira na smjer spina imaju istu energiju. Nakon što uključimo magnetsko polje, energija elektrona sa spinom gore linearno raste s magnetskim poljem, a energija elektrona sa spinom dolje opada, kao što predviđa formula (2). Stoga govorimo da dolazi do cijepanja energetske nivoa, tj. energetske nivoi za različite spinove se razdvajaju. Ova fizikalna pojava cijepanja energetske nivoa elektrona pod utjecajem magnetskog polja naziva se Zeemanov efekt. Univerzalno svojstvo svih fizikalnih sistema je da teže minimalnoj energiji (odnosno, svaki kamen će kad-tad pasti na zemlju). Stoga svi elektroni u prisutnosti magnetskog polja pokušavaju okrenuti spin prema dolje i time zauzeti najniži energetske nivo.

Sada u igru ulazi rezonancija. Ako spinove izložimo elektromagnetskom zračenju specifične frekvencije, čija energija zračenja točno odgovara razlici energije između Zeemanovih nivoa, dolazi do rezonantne apsorpcije energije. Elektroni sa spinom dolje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje i prelaze na gornji energetske nivo. Uvjet za rezonantnu apsorpciju zračenja je:

$$g\beta H_0 = h\nu \quad (3)$$

gdje lijeva strana jednadžbe predstavlja energetske razliku između Zeemanovih nivoa, a desna strana predstavlja energiju elektromagnetskog zračenja frekvencije ν . Faktor proporcionalnosti h između energije i frekvencije naziva se Planckova konstanta i predstavlja jednu od fundamentalnih fizikalnih konstanti.

U pojednostavljenom slučaju, Zeemanov efekt je osnova na kojoj počiva rad magnetskih rezonantnih uređaja. U eksperimentalnoj izvedbi, uzorak se postavi u vanjsko magnetsko polje i



Slika 2: (a) izgled ESR instrumenta (b) oblik najjednostavnijeg ESR spektra

promatra se apsorpcija elektromagnetskog zračenja rezonantne frekvencije. Iz tako dobivenog spektra, moguće je zaključiti koliko se spinova nalazi u uzorku, koja je njihova dinamika, u kakvom okruženju se nalaze i slično. Tipični, najjednostavniji ESR spektar dan je na slici 2, kao i izgled samog instrumenta. Nerijetko, spektri su puno kompliciraniji i za interpretaciju su potrebne zahtjevnije numeričke simulacije.

Primjena magnetske rezonancije u biologiji

Primjena magnetskih metoda u biofizici je vrlo raširena. Moguće je promatrati tijekom različitih kemijskih reakcija i dinamičkih procesa bitnih za život. Nadalje, moguće je promatrati i efekte oksidacije u različitim biološkim sustavima. Međutim, tijekom ovog predavanja mi ćemo se fokusirati na 3 specifična, vrlo interesantna problema. To su određivanje trodimenzionalne strukture proteina, proučavanje dinamike zamatanja proteina (*protein folding*) te prostorno snimanje magnetskom rezonancijom.

Prvo treba razlučiti između tehnike mjerenja NMR-om i ESR-om. NMR-om se najčešće snimaju jezgre vodika, kojih ima u izobilju u biološkim uzorcima. Mjerenjem spektra moguće je odrediti kemijsko okruženje u kojem se nalazi vodikov atom. S druge strane, NMR tehnika je sporija i manje osjetljiva od ESR-a.

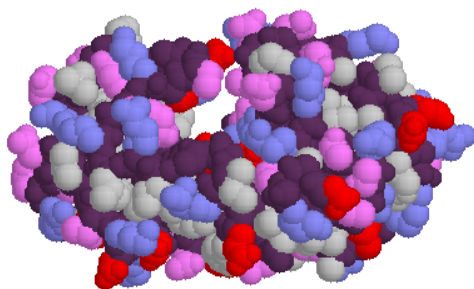
Većina biološki relevantnih molekula je stabilna i ima zatvorenu elektronsku ljusku – to znači da svaki elektron u molekuli ima svoj par koji ima spin okrenut u suprotnom smjeru. Stoga je ukupni spin koji ima molekula jednak nuli, te molekula nema ESR signal. Ova slabost ESR tehnike može postati vrlina, jer omogućava da se dijelovi proteina od interesa označe spinskim probama. Time se može pratiti ponašanje određenog, pažljivo odabranog dijela proteina. Spinske probe su male molekule koje imaju nespareni spin, te se mogu vidjeti pomoću ESR-a. Organske molekule sa slobodnim spinom obično se nazivaju slobodnim radikalima i često su vrlo reaktivne.

Na instrumentalnom nivou, razlika između ESR-a i NMR-a je velika. Rezonantna frekvencija elektromagnetskog zračenja za NMR iznosi stotinjak MHz, tj nalazi se u radio području, pa je dovoljno koristiti jednostavne zavojnice kao izvore i detektore zračenja. Rezonantna frekvencija za ESR je u mikrovalnom području (10 GHz ili više), pa je cijeli sustav ozračivanja, pripreme uzorka i detekcije kompliciraniji.

Određivanje strukture proteina

Proteini su ključna karika u razumijevanju strukture i funkcioniranja živih organizama. Potiču (kataliziraju) bitne kemijske reakcije i odgovorni su za komunikaciju unutar stanice. Proteini su duge lančaste molekule koje sadrže do 1000 manjih molekularnih blokova – amonokiselina, koje se u stanici pojavljuju u 20-ak različitih oblika. Ipak, jednodimenzionalni lanac aminokiselina poredanih u specifičnom poretku neće funkcionirati kao protein. Način na koji je lanac aminokiselina izvijen u trodimenzionalnu strukturu određuje biološku funkciju proteina. Kako konačni oblik proteina određuje funkcioniranje proteina najbolje vidimo na primjeru probavnih enzima. Oni vežu molekule hrane u udubljenjima u svojoj strukturi i time se molekule hrane imobiliziraju vrlo blizu molekularnih grupa koje ih mogu razgraditi. Mnoge bolesti, kao što su Alzheimerova bolest, bolest ludih krava, pa čak i neke vrste tumora, uzrokovane su krivim izvijanjem i preoblikovanjem bitnih proteina u našem organizmu.

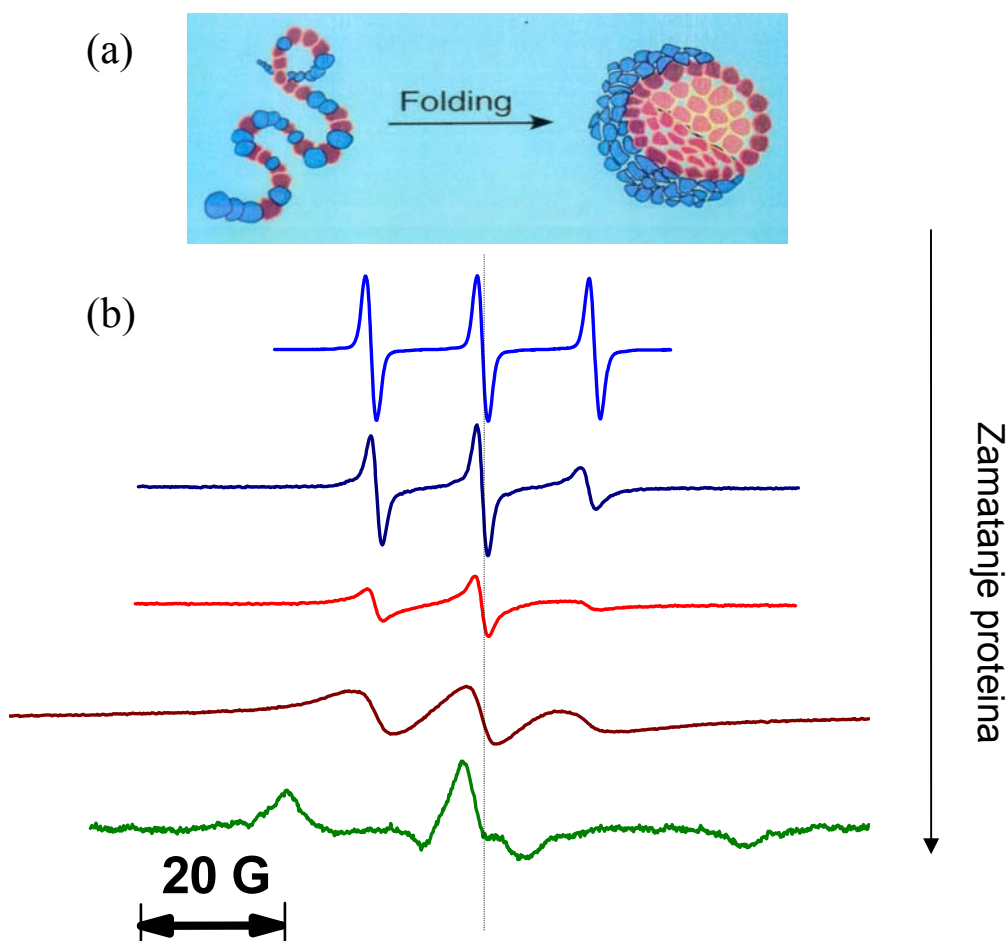
Proteini su vrlo velike molekule, koje se nerijetko sastoje od više tisuća atoma, pa je određivanje stvarne prostorne strukture proteina vrlo mukotrpan posao. Sredinom 1980-ih godina, NMR se predstavio kao jedna od najvažnijih metoda za određivanje strukture proteina. Do tada, glavna metoda određivanja strukture bila je difrakcija X-zraka. Za to je bilo potrebno proizvesti kristal proteina, što nije nimalo lako, a za neke proteine čak i nemoguće. S druge strane, oblik koji



Slika 3: Trodimenzionalna struktura proteina *T4 lysozyme* demonstrira kompleksnost problema određivanja strukture takvih makromolekula. Protein se sastoji od 1439 atoma.

preuzima protein u kristalu može biti drugačiji od oblika koji protein preuzima u otopini, odnosno u biološkom okruženju.

Proučavanjem kompliciranih NMR spektara jezgri vodika u molekulama, moguće je, uz snažno



Slika 4: (a) shema zamatanja (folding) proteina iz lančaste strukture u biološki aktivnu strukturu. (b) Evolucija ESR signala spinske probe tijekom različitih etapa zamatanja proteina (NN grupa, EPFL, Lausanne)

kompjutersko modeliranje, zaključiti koja je stvarna struktura proteina. NMR mjeri trodimenzionalne strukture proteina u otopini, što daje rezultate koji su biološki puno relevantniji. Koliko su NMR metode važne za strukturnu biologiju svjedoči činjenica da je Prof. Kurt Wüthrich (Švicarski institut za tehnologiju u Zürichu, ETHZ), pionir primjene NMR-a u biologiji, dobio Nobelovu nagradu za kemiju 2002. godine.

Istraživanje promjene oblika proteina pomoću ESR-a

Pokazali smo da oblik proteina (konformacija) kritički utječe na njegovu funkciju u živom organizmu. NMR se pokazao kao vrlo ozbiljna metoda za određivanje strukture i oblika proteina u prirodnom okruženju. Međutim, NMR tehnika nije jako uspješna u dinamičkim procesima, kao i u određivanju strukture proteina većih od 2000 atoma, što obuhvaća veliku količinu (~30%) proteina, uključujući i izuzetno bitne proteine membrane stanica.

Da bi se nadvladao taj problem, koristiti se elektronska spinska rezonancija. Dinamika elektronskih spinova je puno brža, a i signal je puno jači. Kao što smo već naglasili, većina molekula, a naročito proteini, nemaju ESR signal jer su im svi elektronski spinovi spareni. Stoga se primjenjuje tehnika označavanja spinovima točno definiranih pozicija na proteinu (*site directed spin labeling*). Na određene molekularne grupe u proteinu veže se mala molekula sa nesparenim spinom (tzv. spinski marker). Ako se veže više spinova na različitim mjestima na molekuli, spinovi međusobno reagiraju i to omogućava određivanje međusobne prostorne udaljenosti spinova. Proučavanje interakcije spinova za mnoge različite položaje na proteinu daje uvid u strukturu velikih proteina.

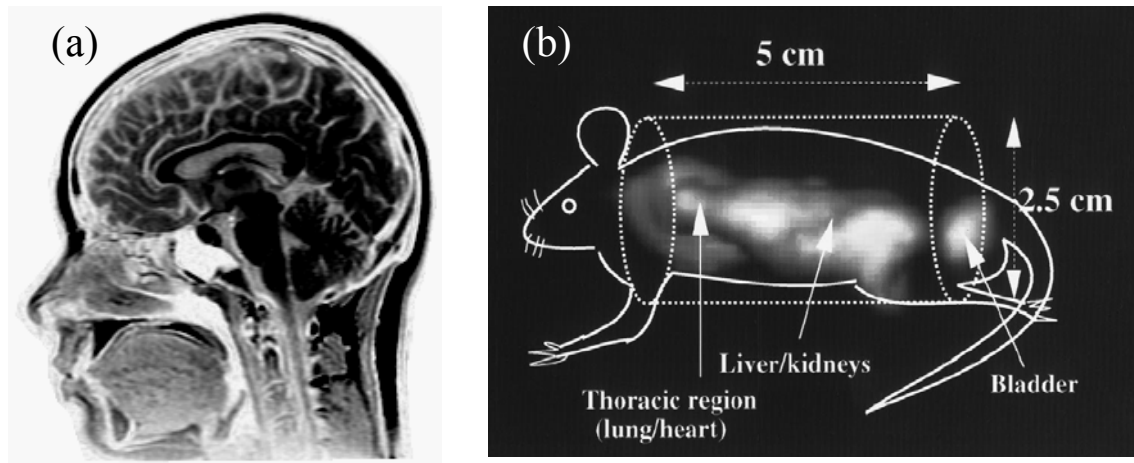
Međutim, postoji još interesantniji problem. Proteini koji nastaju kao lanac aminokiselina moraju se smotati u trodimenzionalnu strukturu kako bi ispunili svoju biološku funkciju. Isto tako, nepotrebni proteini u stanici se moraju odmotati kako bi bili razgrađeni. Međutim, sam mehanizam zamotavanja proteina (*«protein folding»*) trenutno je jedna od najvećih zagonetki bioloških znanosti. Ako zamislimo da imamo lanac od 100 aminokiselina, od kojih svaka može imati jedan od tri oblika, onda je broj raznih kombinacija motanja lanca iznosi $3^{100} \approx 10^{48}$. Čak i uz najbržu promjenu oblika molekule (jednako rotaciji kemijske veze u maloj molekuli) vrijeme da se protein zamota u specifični oblik trebalo bi trajati mnogo više nego što je starost svemira. U stvarnosti vrijeme zamotavanja proteina iznosi između 1/10 sekunde i 10ak minuta. Stoga je očito da postoje dodatni mehanizmi koji omogućavaju zamatanje proteina u specifični i točno definirani oblik. Koji su točno uzroci i kako djeluju razni mogući mehanizmi još nije u potpunosti jasno.

Promatranje spinski označenih proteina pomoću ESR-a pokazalo se izuzetno uspješnom metodom i u izučavanju dinamike zamatanja proteina. Mjenjanjem oblika proteina, mjenja se i njegova rotacija u otopini, a s time i ESR spektar. Prirodno zamotani proteini mogu se odmotati (denaturirati) mjenjanjem fizikalnih i kemijskih osobina okoline u kojoj se nalaze (tj dodavanjem kiselina, stavljanje pod tlak i sl.). Tijekom tih procesa moguće je pomoću ESR-a pratiti kako se mjenja oblik proteina. Sve to daje vrijedan uvid u sam proces zamatanja i odmatanja proteina.

Dinamika reakcija u organizmu – prostorno oslikavanje

Za kraju, podsjetimo se možda najpoznatije upotrebe magnetskih metoda u biologiji. To je oslikavanje magnetskom rezonancijom (MRI- magnetic resonance imaging) te oslikavanje elektronskom paramagnetskom rezonancijom (electron paramagnetic resonance imaging, EPR). Ove metode su se pokazale od izuzetne važnosti u medicini i fiziologiji. Metode omogućavaju trodimenzionalnu, volumnu sliku unutrašnjosti tijela.

MRI metoda, koja je bazirana na NMR-u može pratiti signal vode (vodika) u cijelom tijelu. Pojedina meka tkiva u organizmu imaju različiti postotak vode, time i jezgi vodikovih atoma koje



Slika 5: (a) MRI slika ljudske glave (b) EPRI slika distribucije spinske probe TAM u tijelu miša. TAM je unesen introvenozno u miša i vidljivo je da se nakuplja u jetri, bubrezima i mokraćnom mjehuru.

se promatraju preko MRI tehnike. Stoga će različiti organi imati različite kontraste, što omogućava, uz dodatne tehnike, stvaranje trodimenzionalne slike organizma.

EPRI omogućava praćenje slobodnih radikala koji su nastali u tijelu ili su ubačeni u organizam. Primjer je dan na slici 5(b). Spinske probe (radikali) su unesene introvenozno u tijelo živog miša i iz slike je vidljivo da se radikali nakuplja u određenim unutrašnjim organima.

Kao zaključak možemo reći da biološka znanost i biotehnologija prolaze kroz munjevitu revoluciju i niti jedan znanstvenik, naročito fizičar, ne smije zanemariti njihov utjecaj na modernu znanstvenu misao. U ovom smo kratkom izlaganju demonstrirali nekoliko vrlo zanimljivih primjena metoda magnetske rezonancije u biologiji. Cijelo područje je izuzetno razgranatano i nije moguće spomenuti sve primjene. Za više informacija, potražite dodatne tekstove, linkove i ilustracije na internet adresi: <http://nanotubes.epfl.ch/garaj/skola2003>.